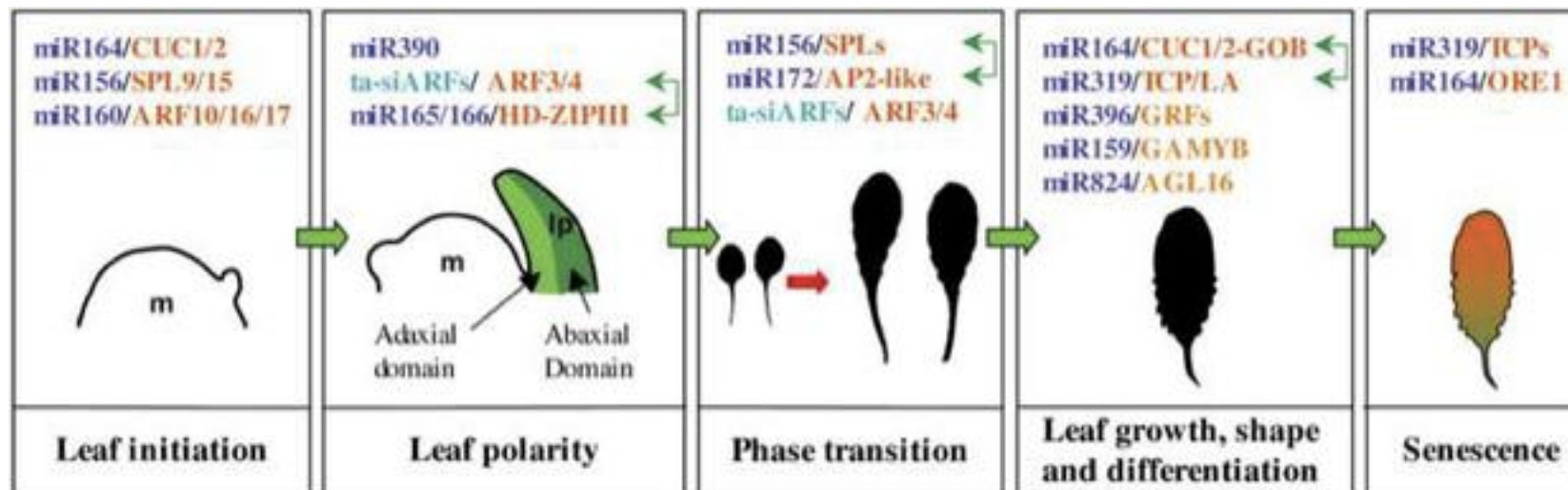


Rola miRNA w procesach rozwojowych, ścieżkach sygnałowych i odpowiedzi na stres

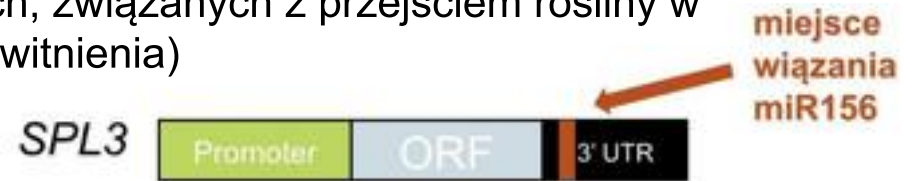


miRNA i zmiany faz wzrostu wegetatywnego

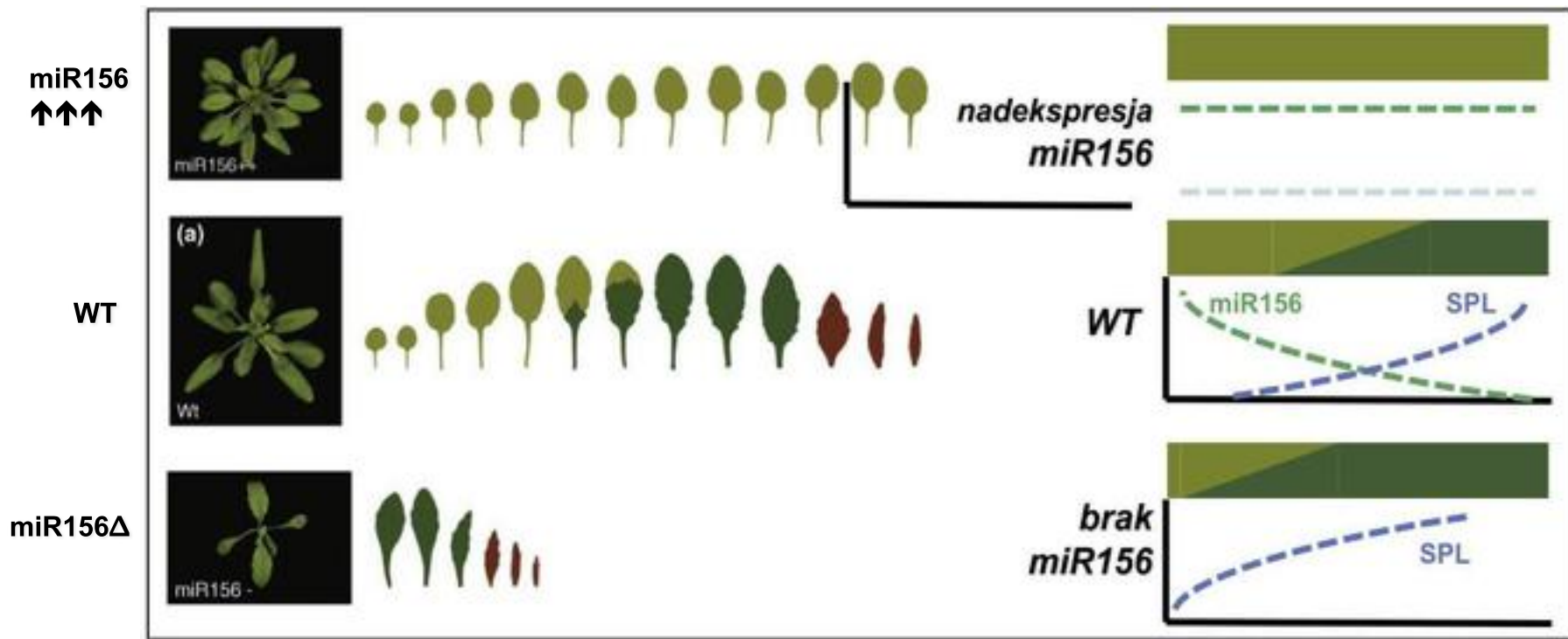


miR156 reguluje ekspresję genów *SPL* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*)

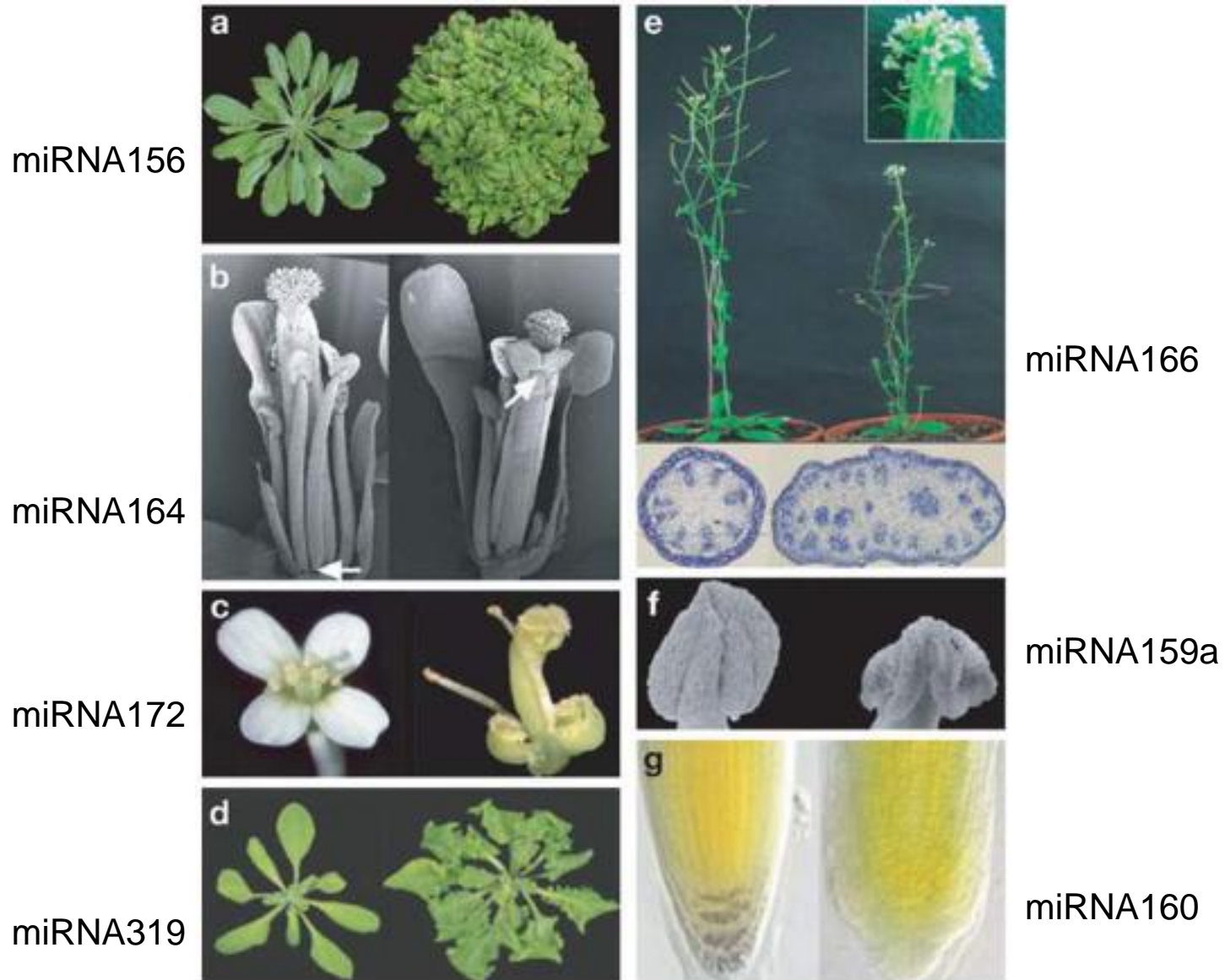
SPL – rodzina czynników transkrypcyjnych, związanych z przejściem rośliny w fazę rozwoju generatywnego (regulacja kwitnienia)



Mutanty *A. thaliana* **pozbawione mir156** – przedwczesna indukcja rozwoju generatywnego



Defekty morfologiczne wywołane nadekspresją miRNA w Arabidopsis

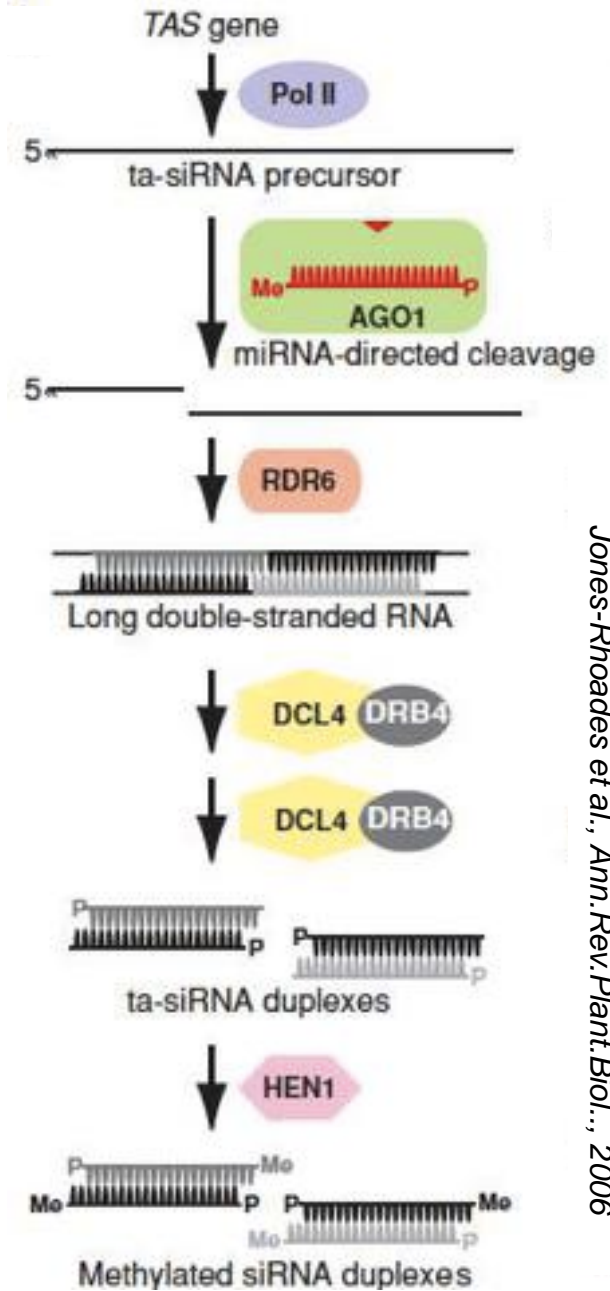
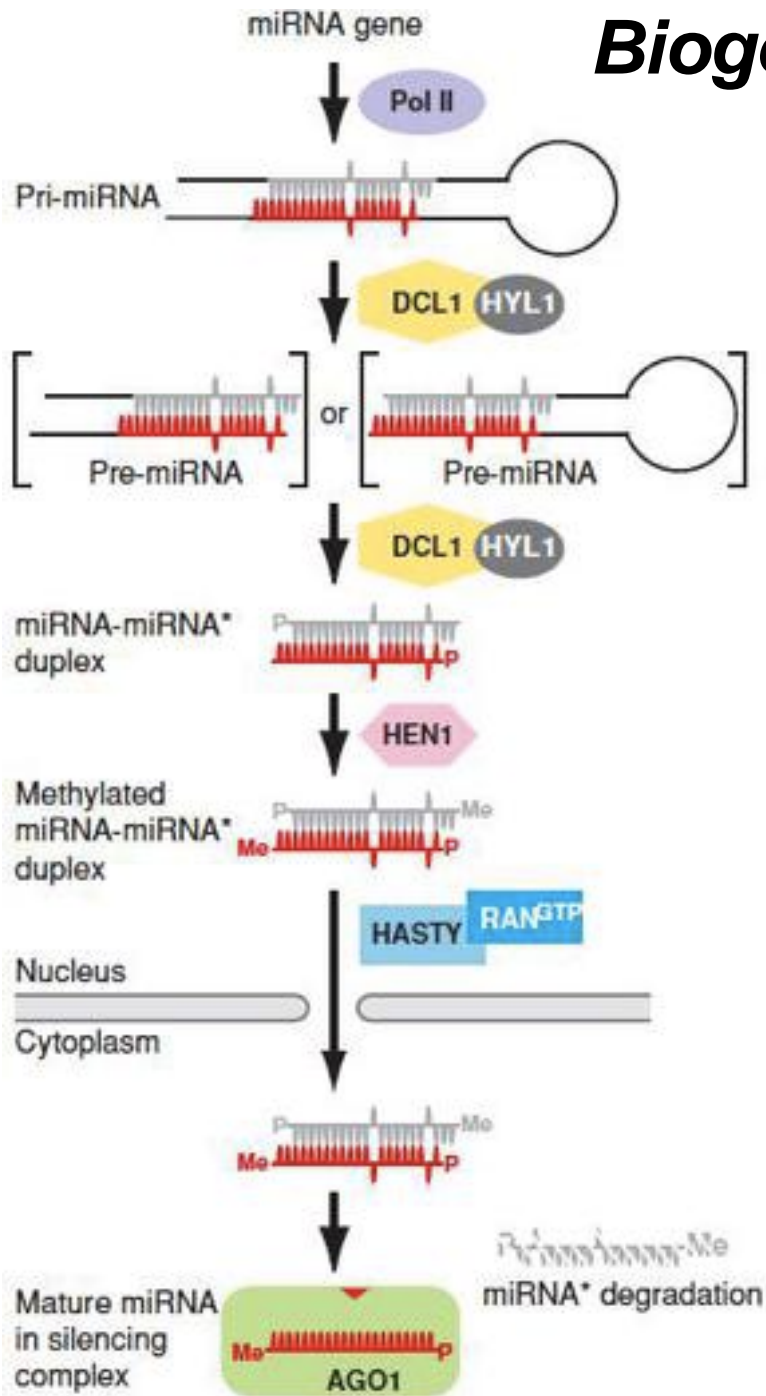


Funkcije miRNA u Arabidopsis

Role	miRNA family	Target families/genes
Auxin signaling	miR160	ARF10
	miR164	NAC1
	miR167	ARF8
	miR390	ARF
	miR393	TIR1/F-box AFB
Leaf development	miR159	MYB
	miR164	NAC1
	miR166	HD-ZIPIII
	miR172	AP2
	miR319	TCP
Leaf polarity	miR166	HD-ZIPIII
	miR168	AGO1
Floral organ identity	miR390	ARF
	miR160	ARF10
	miR164	NAC1
	miR172	AP2
	miR319	TCP
Flowering time	miR156	SBP
	miR159	MYB
	miR172	AP2
	miR319	TCP...

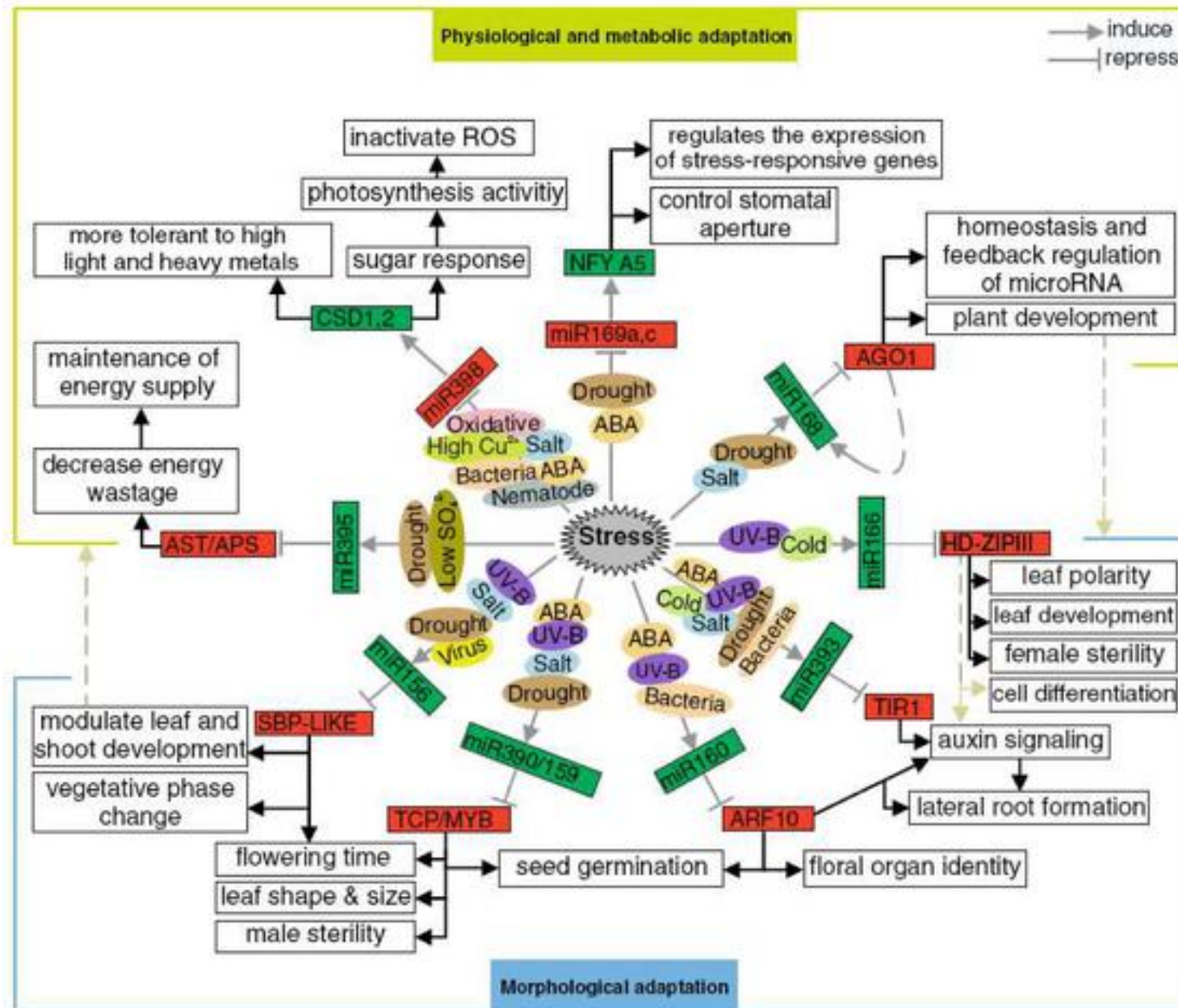
Role	miRNA family	Target families/genes
Adaptive responses to stress	miR156	SBP
	miR159	MYB
	miR160	ARF10
	miR167	ARF8
	miR168	AGO1
	miR169	NFY/MtHAP2-1
	miR171	SCL
	miR319	TCP
	miR393	TIR1/F-box AFB
	miR395	APS/AST
	miR396	GRF
	miR397	Laccases, Beta-6-tubulin
	miR398	CSD
	miR399	UBC24/PHO2
Regulation of miRNA	miR408	Plastocyanin
	miR162	DCL1
Others	miR168	AGO1
	miR403	AGO2
	miR158	At1g64100
	miR161	PPR
	miR163	At1g66700, At1g66690
	miR173	At3g28460
	miR174	At1g17050
	miR175	At5g18040, At3g43200, At1g51670
miR394	F-box	

Biogeneza miRNA u rošlin



Jones-Rhoades et al., *Ann. Rev. Plant Biol.*, 2006

Regulatorowa sieć stresowych miRNA u *Arabidopsis*



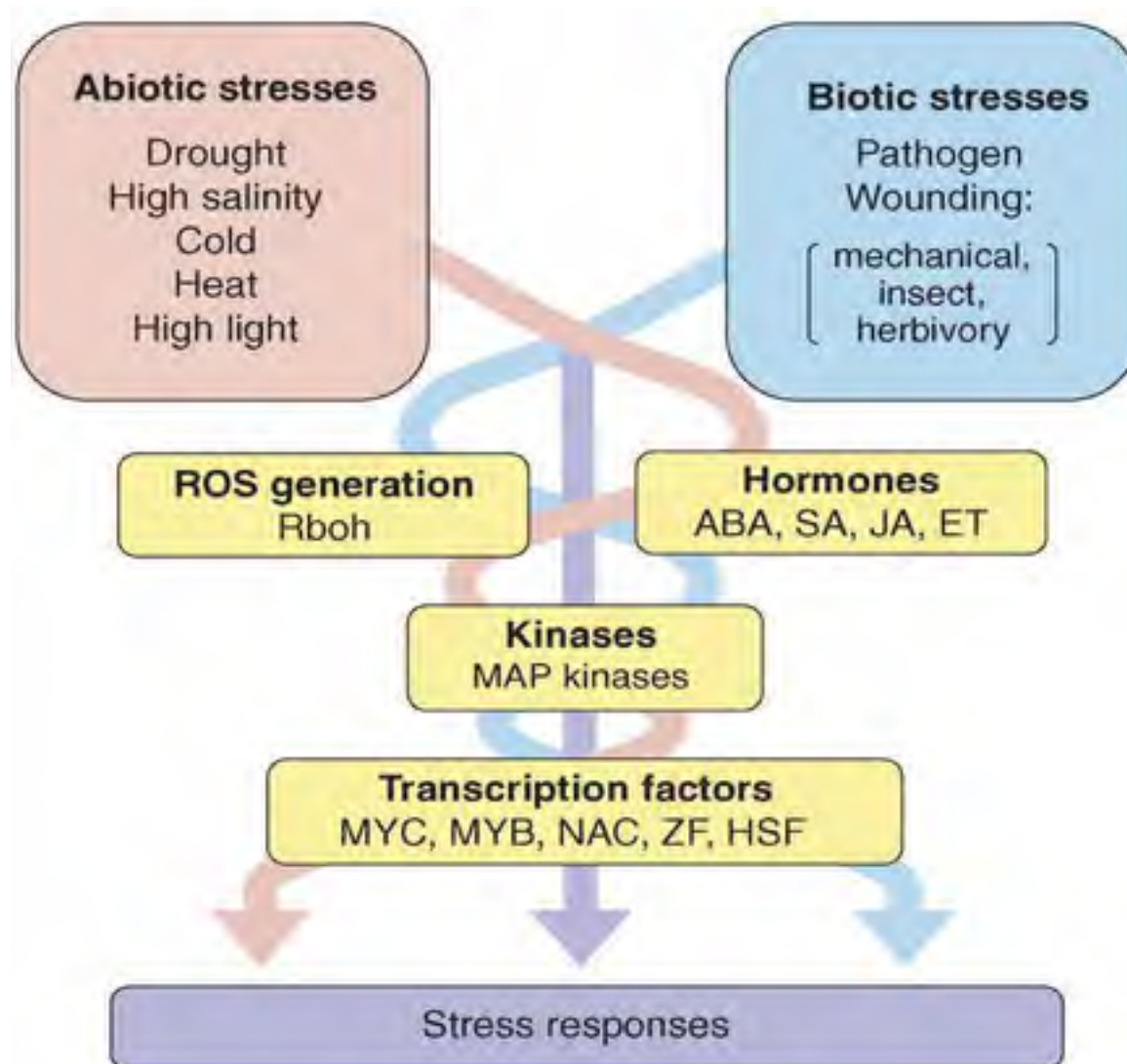
miRNA regulowane przez stres

Biotic stress				Abiotic stress											
Viral infection		Bacterial infection		Hypoxia stress		ABA stress		Cold stress		Salt stress		Drought stress			
ALNC miR158	SBP-LIKE	At-miR160	HD-ZIPIII	Zm-miR159	MYB	At-miR319/159	TCP/MYB	At-miR168	HD-ZIPIII	At-miR156	SBP-LIKE	At-miR157	SBP-LIKE		
Ni-miR160	ARF	At-miR167	ARF	Zm-miR166	HD-ZIPIII	At-miR160	ARF	At,Bd,Pt-miR169	NFY/MiHAP2-1	Zm-miR156	SBP-LIKE	At-miR167	ARF		
ALNI miR164	NAC	At-miR393	TIR1/AFB	Zm-miR167	ARF	Os-miR167	ARF	At,Bd-miR172	AP2-LIKE	At-miR158	PPR	At-miR168	AGO		
Br-miR1885	TIR-NBS-LRR	At-miR398	CSD	Zm-miR171	Spry-2	ALOs-miR169	NFY	At-miR393	TIR1/AFB	Zm-miR162	DCL	At-miR169	NFY		
Br-miR158	PPR	At-miR825	Zinc finger	At-miR395	APS	ALPv-miR393	TIR1/AFB	At-miR396	GRF	At-miR167	ARF	Os,Mi-miR169	MiHAP2-1		
Nematode infection		At-natsiRNA TGB2	PPRL	Os-miR396	WRKY	At-miR397	Laccase	At,Bd,Pt-miR397	Laccase	Zm-miR167	ARF	At-miR171	SCL		
At-miR160	ARF	At-tasiRNAs	AtRAP	Pi-miR474	Acyl-CoA thioesterase	At-miR398	CSD	At-miR408	PCL	At,Zm-miR168	AGO	At-miR319/159	TCP/MYB		
At-miR164	NAC	Fungal infection		Os-miR528	Aldehyde dehydrogenase	At-miR389a	Unknown	Pt-miR168 _{a,b}	AGO	ALZm-miR169	NFY/MiHAP2-1	At,Os,Mi,Pv-miR393	TIR1/AFB		
At-miR167	ARF	Pla-miR156	SBP-LIKE	At-tasiR289 (TAS1a,b,c)	PPRs	At-miR402	HhH-GPD	Pt-miR477 _{a,b}	GRAS	At-miR171	SCL	At-miR396	GRF		
At-miR171	SCL	Pla-miR160	ARF	Nutrient homeostasis				At-miR417	RDRP	At-miR394	F-box	At-miR397	Laccase		
At-miR396	GRF	Ta-miR156	SBP-LIKE	High N				Pv-miR2118	U170K-related	At-miR399	TIR1/AFB	At-miR398	CSD		
At-miR398	CSD	Ta-miR159	MYB	At-miR167a	ARF	Low PO₄³⁻				At-miR475 _{a,b}	PPR	At-miR397	Laccase		
At-siRNA9	At5g18900	Ta-miR164	NAC	At-miR399	E2-UBC	Low SO₄²⁻				Pt-miR476a	PPR	Mt-miR398	CSD		
At-siRNA32	RC/Helitron	Ta-miR171	SCL	Bn-miR160	ARF	Bn-miR164	NAC	Heat stress				At-miR399	F-box	At-miR408	Plastocyanin
At-siRNA41	At1g50890	Ta-miR171	SCL	Bn-miR164	NAC	Bn-miR394 _{a,c}	F-box	Ta-miR156	SBP-LIKE	Zm-miR395	AST/APS	Os-miR156	SBP-LIKE		
At-siRNA46	At1g72860	Ta-miR393	TIR1	Bn-miR394 _{a,c}	F-box	At-miR395	AST/APS	Ta-miR159	MYB	At-miR396	GRF	Os-miR168	AGO		
Symbiotic nitrogen fixation		Ta-miR396	GRF	At-miR1026	bHLH	At-miR1026	bHLH	Ta-miR160	ARF	At-miR397	Laccase	Os-miR172	AP2-LIKE		
Gm-miR159	MYB	Oxidative stress		UV-B radiation				Ta-miR402	HhH-GPD	At-miR398	CSD	Os-miR319	TCP		
Gm-miR160	ARF	At-miR398	CSD	At,Pt-miR156	SBP-LIKE	At,Pt-miR156	SBP-LIKE	Ta-SiRNA 005047_0654_1904.1		At-miR398	CSD	Os-miR396	GRF		
Gm-miR164	NAC	Mechanical stress		At-miR395	AST/APS	At-miR159	MYB	Ta-miR156	SBP-LIKE	Pt-miR482.2	DRP	Os-miR397	Laccase		
Gm-miR166	HD-ZIPIII	Pv-miR156	SBP-LIKE	At-miR396	CSD	ALPv-miR160	ARF	Ta-miR159	MYB	Pt-miR1450	L-RTMK	Os-miR408	Plastocyanin		
Gm-miR168	AGO	Pt-miR162	DCL	At-miR397	Laccase	ALPv-miR166	HD-ZIPIII	Ta-miR160	ARF	Pt-miR171 ₁₋₃	SCL	Pt-miR1446 _{a-e}	GRML		
Gm-miR169	MiHAP2-1	At-miR408	PCL	At-miR408	PCL	ALPt-miR166	HD-ZIPIII	Ta-miR166	HD-ZIPIII	Pt-miR530a	Zinc knuckle (CCHC-type)	Pt-miR1444 _a	Polyphenol oxidase		
Gm-miR172	AP2-LIKE	At-miR857	Laccase	At-miR857	Laccase	At,Pt-miR167	ARF	Ta-miR168	AGO	Pt-miR1445	DHPM	Pt-miR1447	Ankyrin repeat		
Gm-miR393	TIR1	Heavy metal (Cd²⁺)		Bn-miR160	ARF	Pv-miR168	AGO	Ta-miR169	MiHAP2-1	Pt-miR1446 _{a-e}	GRML	Pt-miR1450	L-RTMK		
Gm-miR396	GRF	Bn-miR164	NAC	Bn-miR164	NAC	At-miR169	NFY/MiHAP2-1	Ta-miR172	AP2-LIKE	Pt-miR1447	Ankyrin repeat	Pv-miR2118	U170K-related		
Gm-miR482	Gm12g28730	Bn-miR394 _{a,c}	F-box	Bn-miR184	NAC	At-miR171	SCL	Ta-miR393	TIR1	Pv-miR1447	Ankyrin repeat	Pv-miR159.2	Chlatrin heavy chain		
Gm-miR482	Gm12g28730	Os-miR602	XET	Bn-miR394 _{a,c}	F-box	At-miR172	AP2-LIKE	Ta-miR827	Unknown	Pv-miR159.2	Chlatrin heavy chain	Ta-SiRNA 002061_0636_3054.1			
Gm-miR1521	Gm08g12340	Os-miR604	WAK-LIKE	At-miR481	Unknown	ALPt-miR398	CSD	Ta-SiRNA 005047_0654_1904.1		Pv-miR159.2	Chlatrin heavy chain	Ta-SiRNA 005047_0654_1904.1			
Mt-miR169	MiHAP2-1					At-miR401	Unknown	Ta-SiRNA 080621_1340_0098.1		SRO5-P5CDH-natsiRNA	P5CDH	Ta-SiRNA 002061_0636_3054.1			

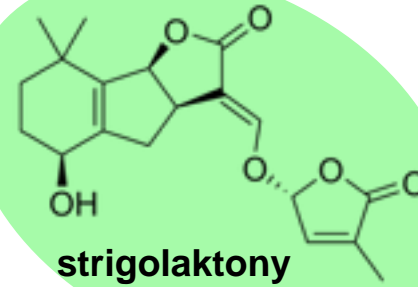
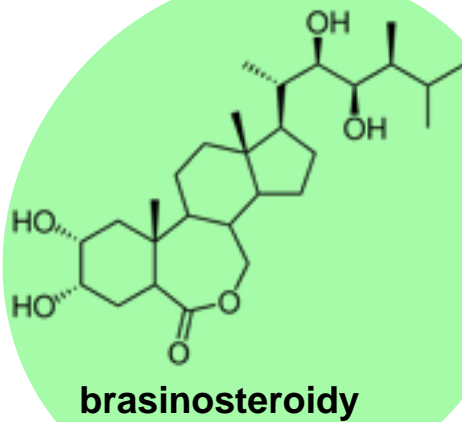
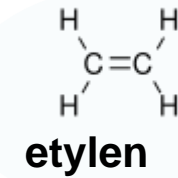
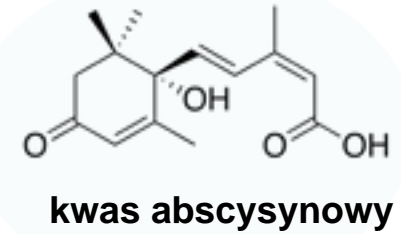
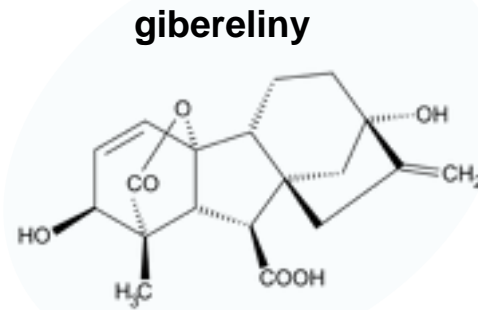
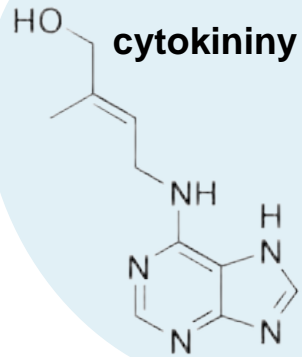
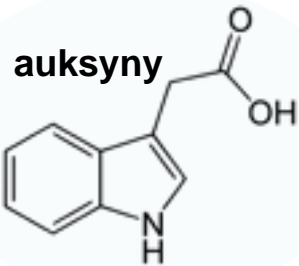
zielone – miRNA o podwyższonej ekspresji
 czerwone – miRNA o obniżonej ekspresji

2. Odpowiedź na stres

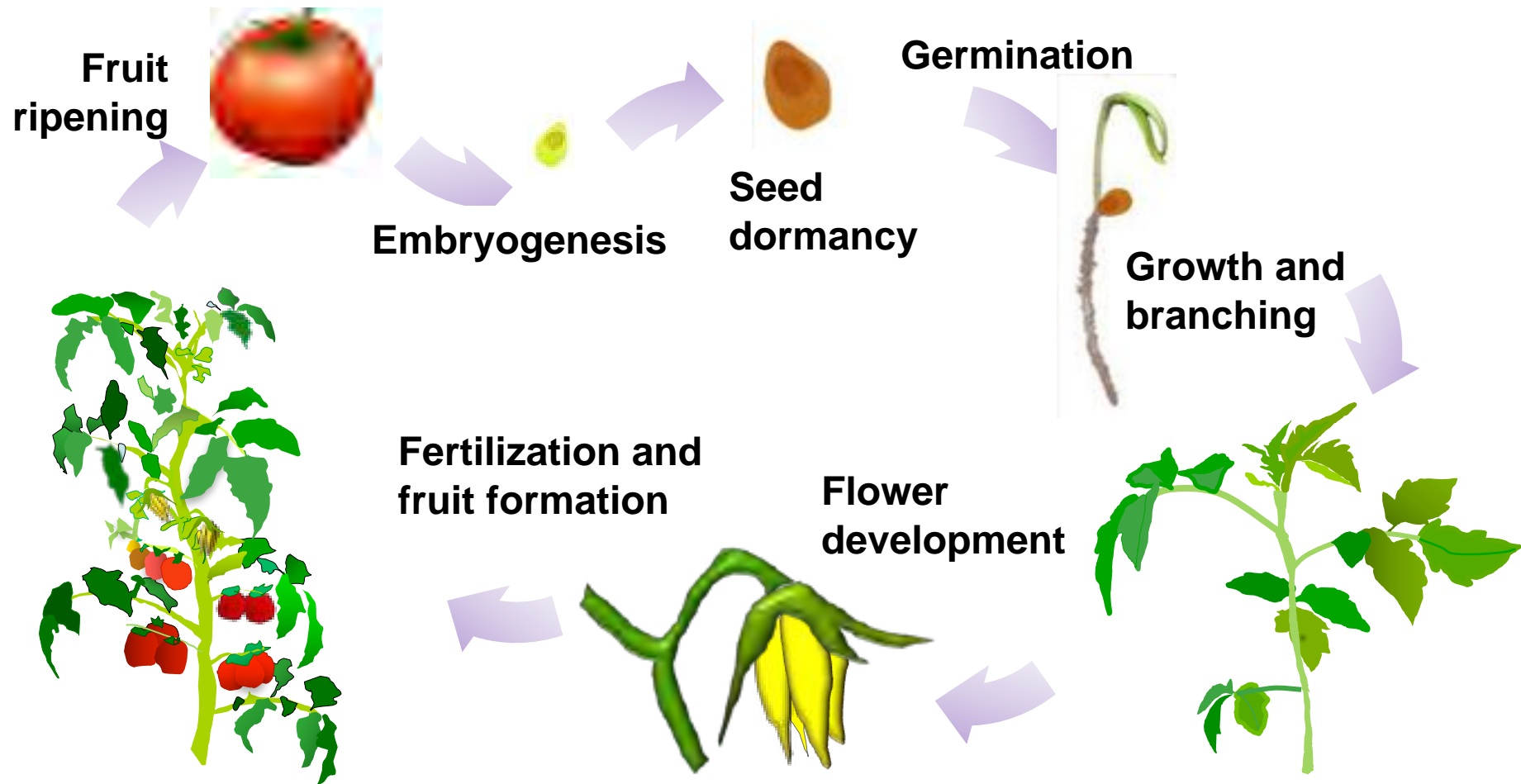
Połączenie sieci sygnałowych odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny



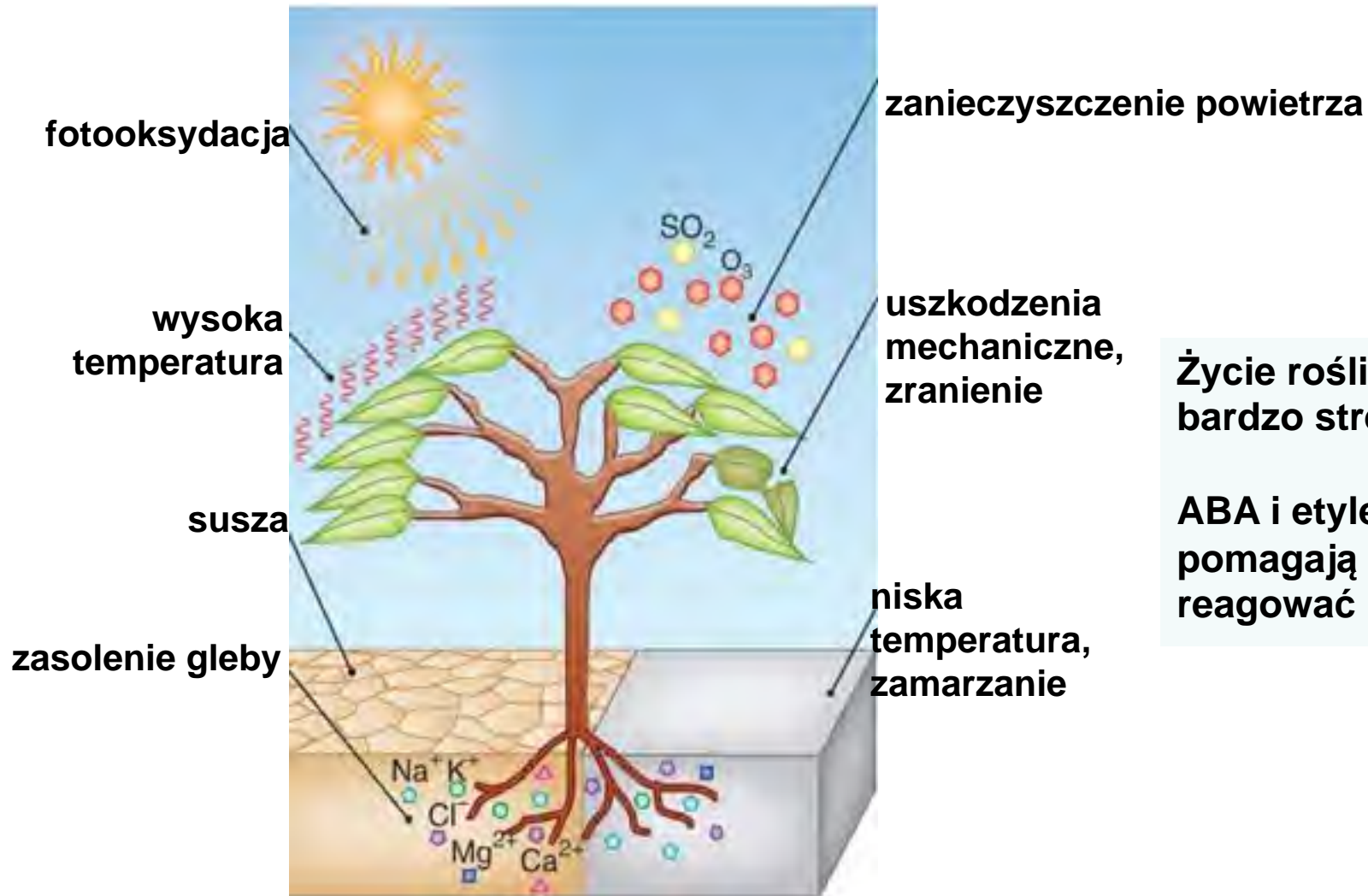
Fitohormony



Fitohormony regulują wszystkie etapy cyklu życiowego roślin



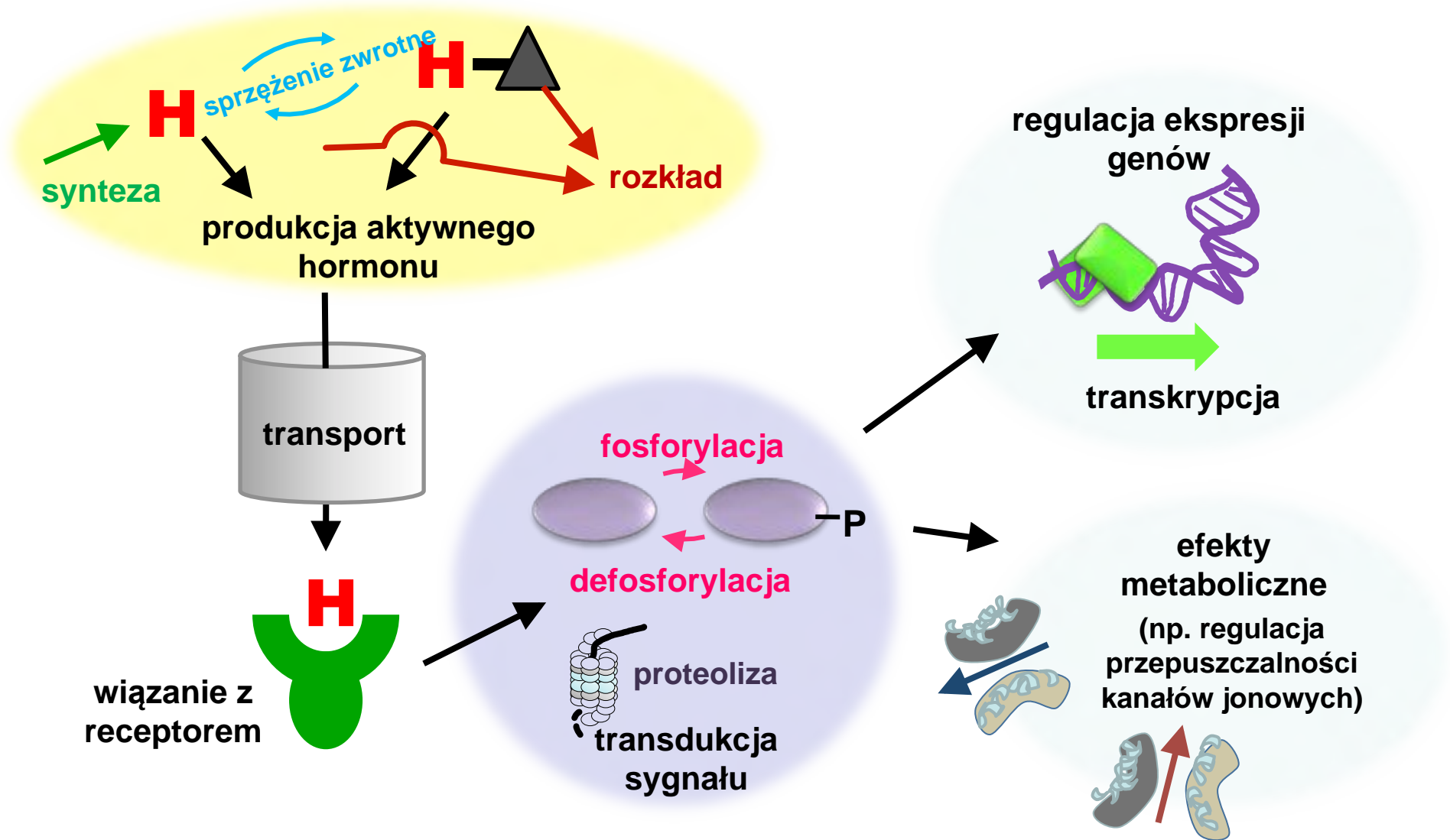
Stres abiotyczny



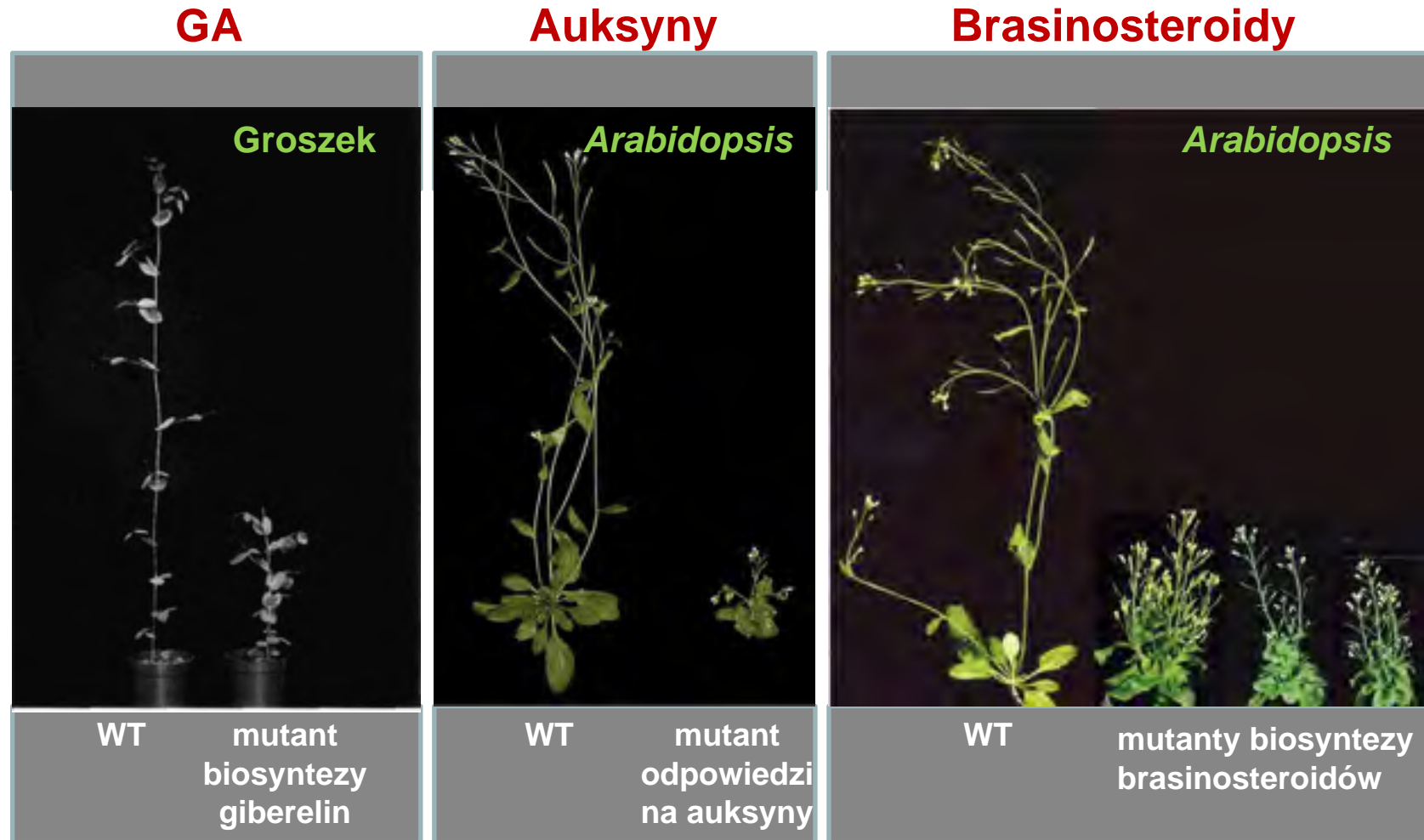
Życie roślin jest bardzo stresujące.....

ABA i etylen pomagają roślinom reagować na stres.

Fitohormony: synteza, szlak sygnałowy i odpowiedź



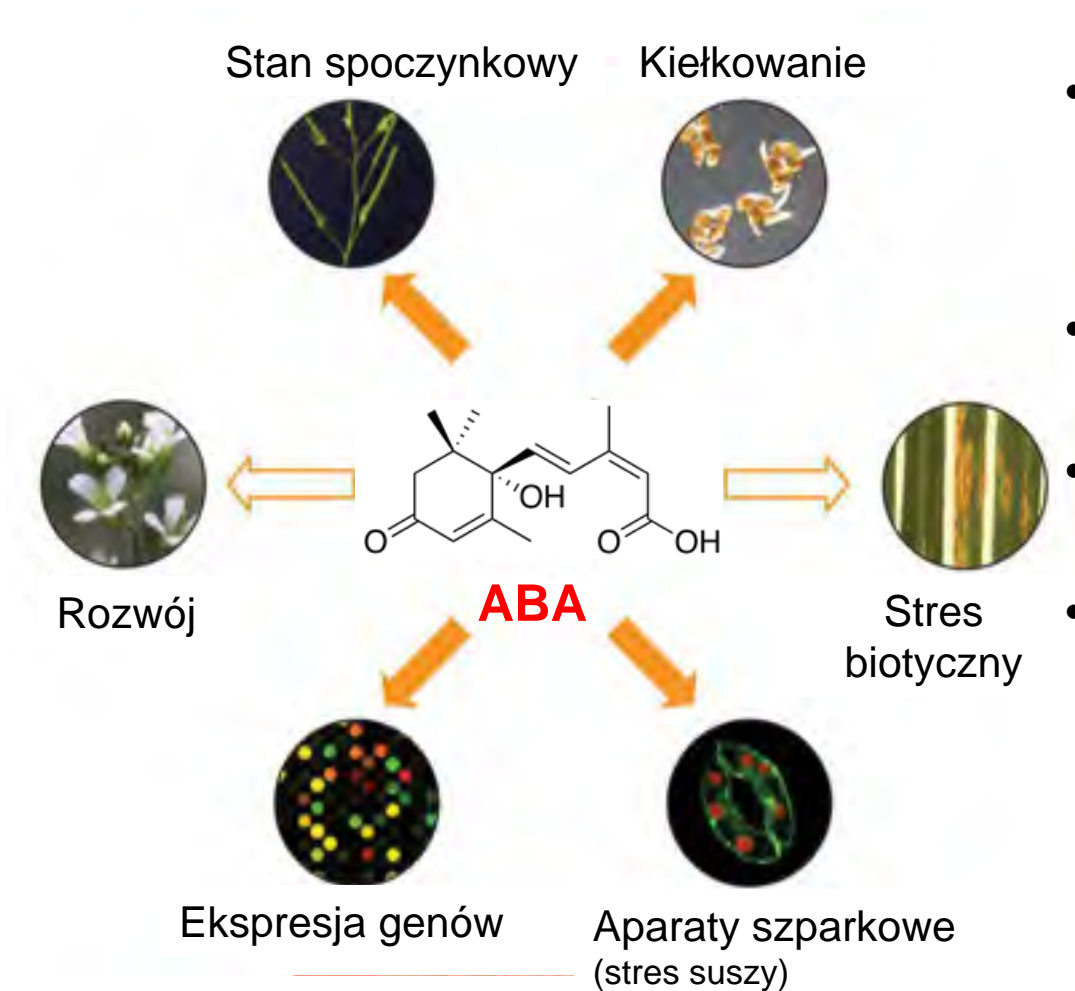
Mutanty syntezy lub odpowiedzi hormonalnej: zaburzenia wzrostu i rozwoju



Lester, et al, (1997) Plant Cell; Gray (2004) PLoS Biol; Clouse (2002) The Arabidopsis Book

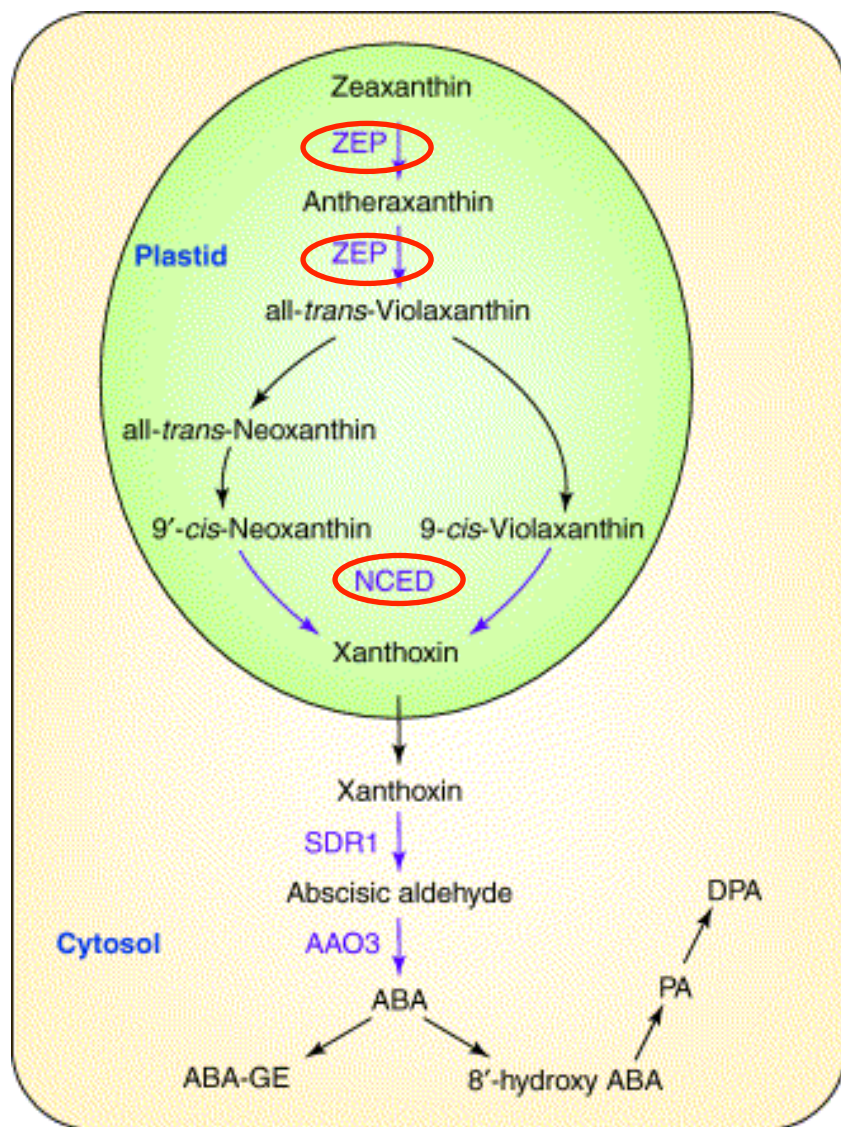
Kwas abscysynowy (ABA)

kontroluje procesy rozwojowe, rozmnażanie i odpowiedź na stres



- Hamuje wzrost objętościowy komórek, fotosyntezę i syntezę chlorofilu, transport jonów przez błony komórkowe
- Przyspiesza procesy starzenia organów i tkanek
- Inhibitor kiełkowania, odpowiada za stan spoczynku nasion
- Podwyższony poziom ABA jest reakcją roślin na stres np. podczas suszy ABA zamyka aparaty szparkowe, ogranicza transpirację i zwiększa pobieranie wody przez korzenie.

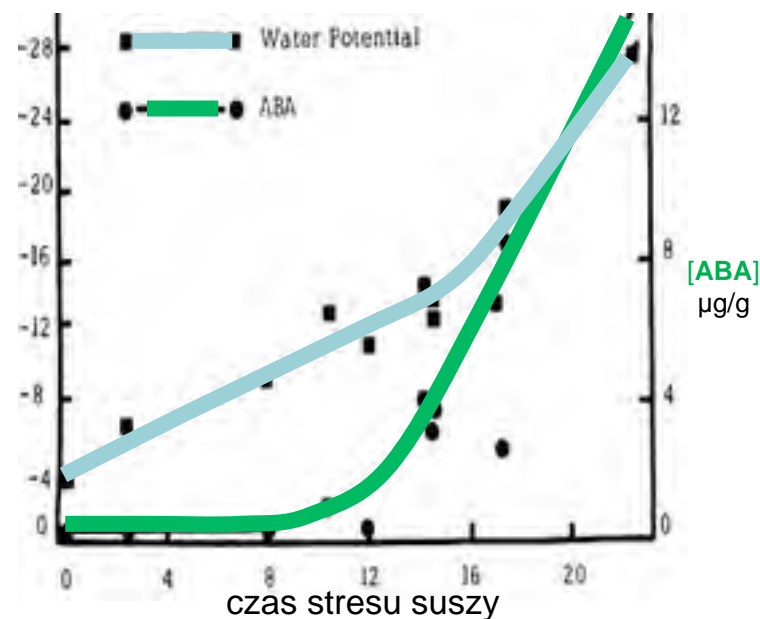
Szlak biosyntezy ABA jest precyzyjnie regulowany



Nambara and Marion-Pol (2003) Trends Plant Sci.

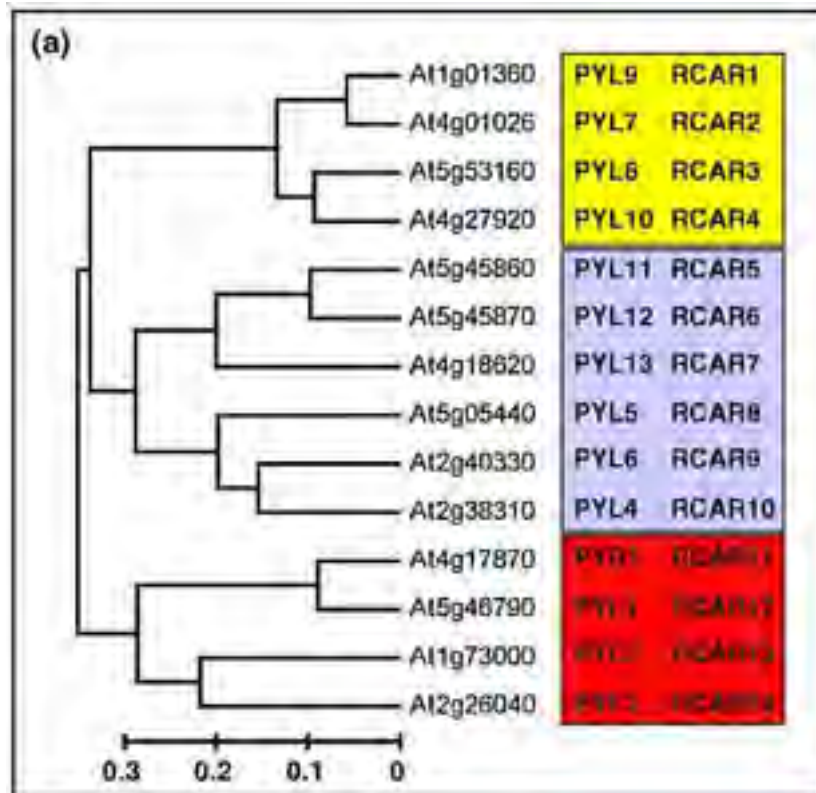
Kluczowe etapy biosyntezy ABA zależą od ekspresji regulowanych genów, co umożliwia kontrolę poziomu ABA w komórce i szybką odpowiedź na zmiany środowiska.

Synteza ABA jest indukowana podczas odpowiedzi na stres



Receptory ABA: PYR/PYL/RCARs

14 PYR/RCARs w *Arabidopsis*



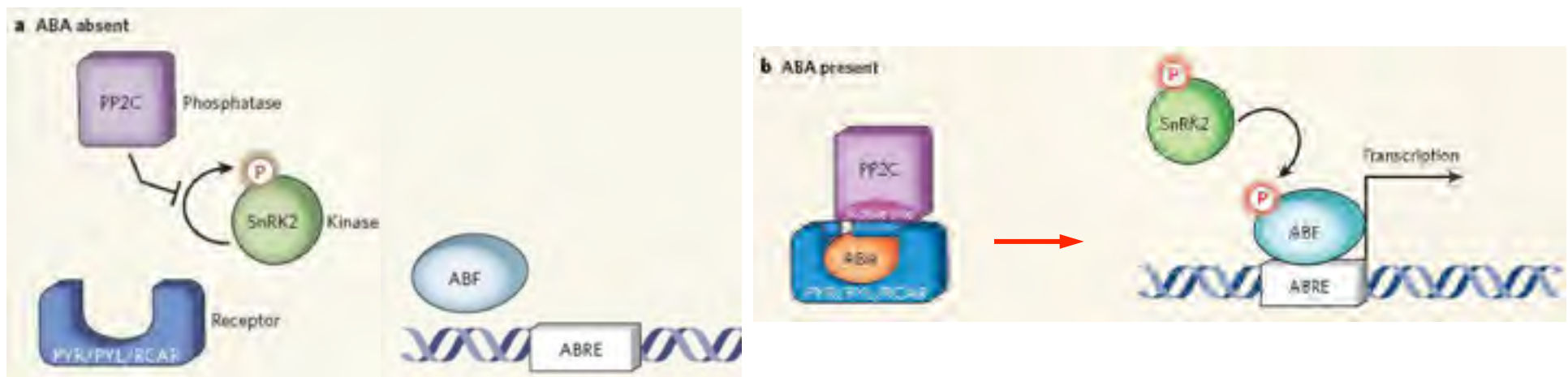
Common Name	Species	Number of genes
Soja	<i>Glycine max</i>	23
Kukurydza	<i>Zea mays</i>	20
Topola	<i>Populus trichocarpa</i>	14
Ryż	<i>Oryza sativa</i>	11
Winogrono	<i>Vitis vinifera</i>	8
Sorgum	<i>Sorghum bicolor</i>	8
Strączkowe	<i>Medicago truncatula</i>	6
Rzodkiewnik	<i>Arabidopsis thaliana</i>	14

ABA aktywuje ekspresję genów odpowiedzi na stres

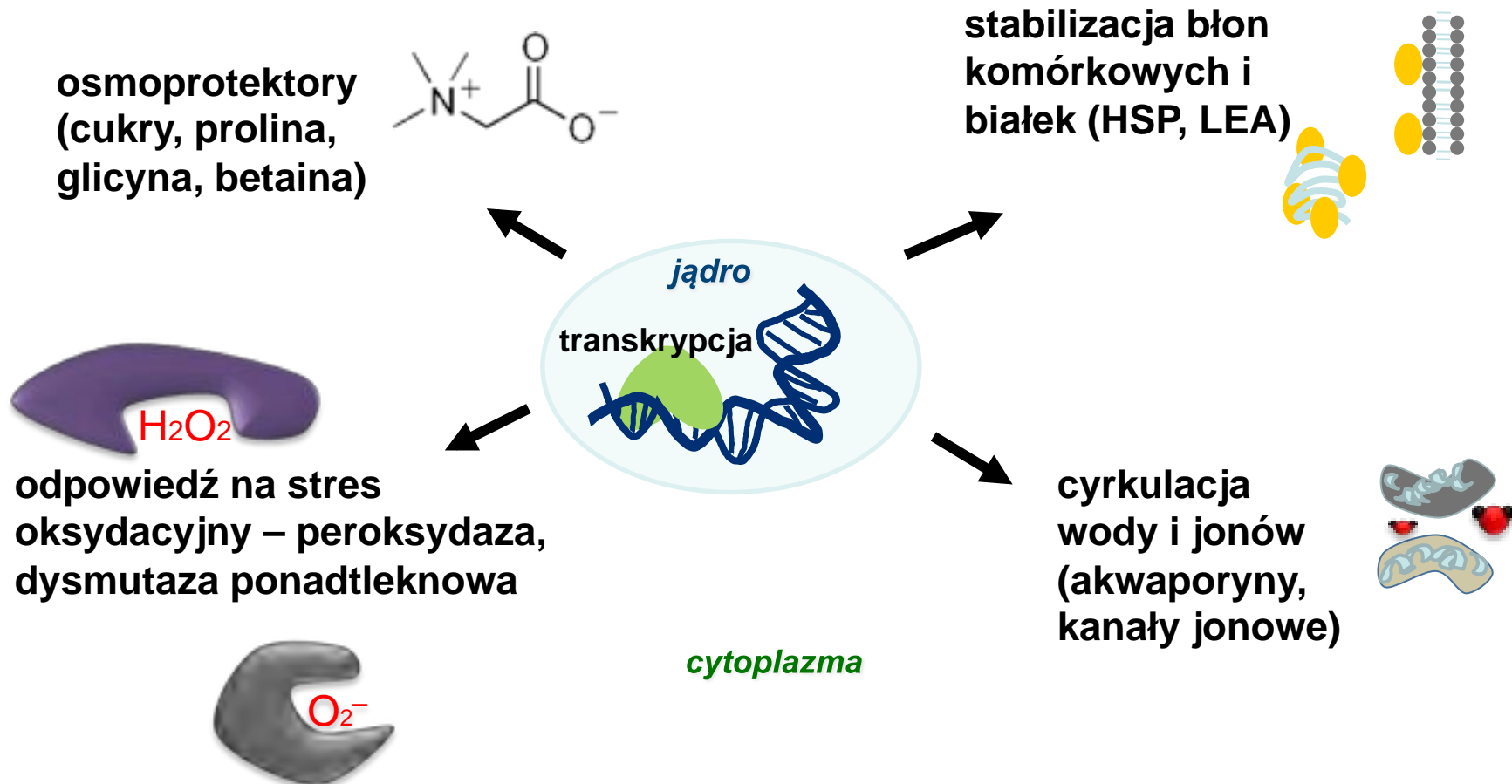
Wiązanie **ABA** do receptorów (**PYL1**) umożliwia wiązanie i inhibicję fosfatazy **PP2C**.



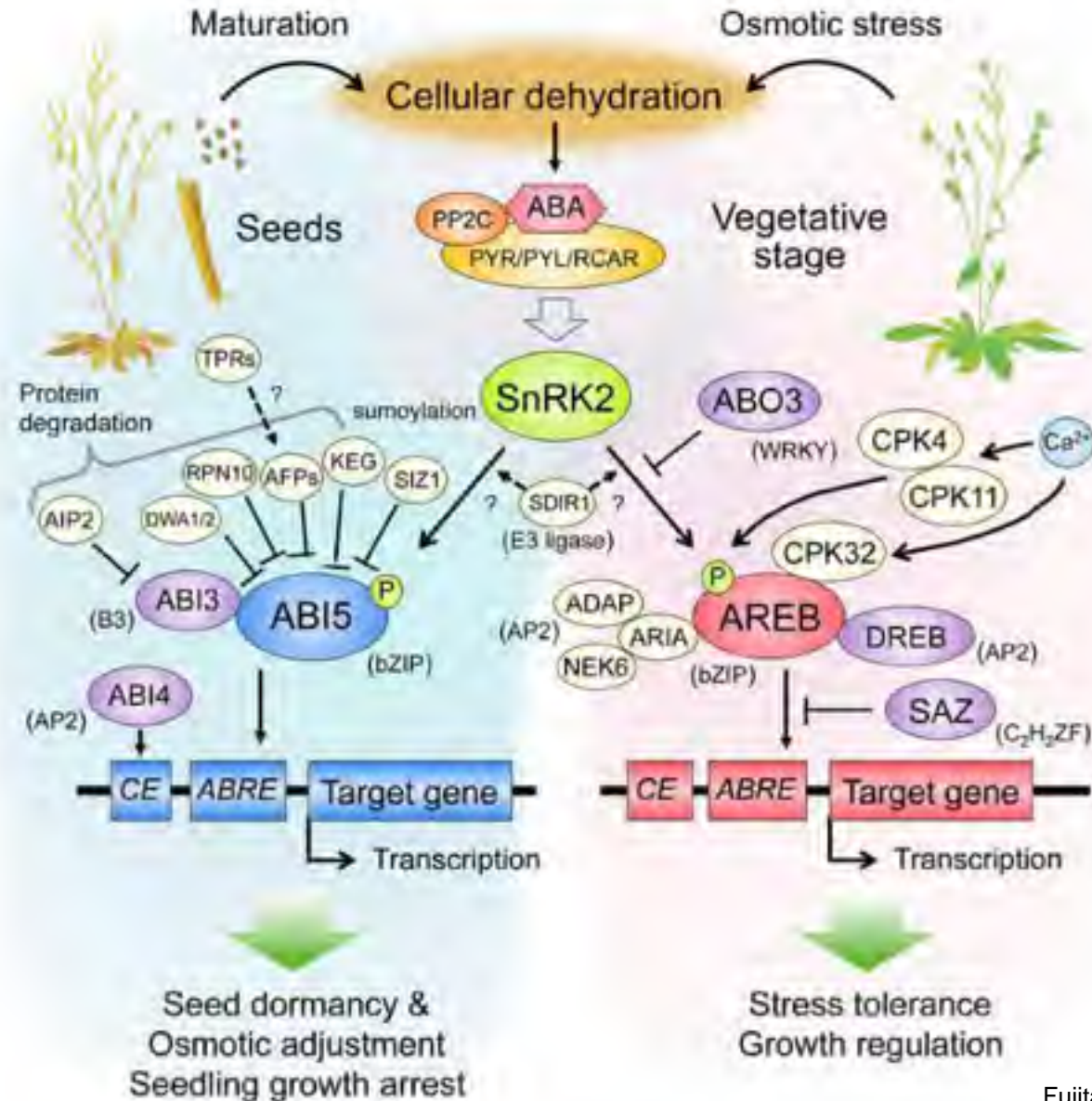
Inaktywacja **PP2C** w obecności **ABA** → fosforylacja białek przez kinazy **SnRK** → aktywacja czynników transkrypcyjnych → ekspresja genów zależnych od **ABA**

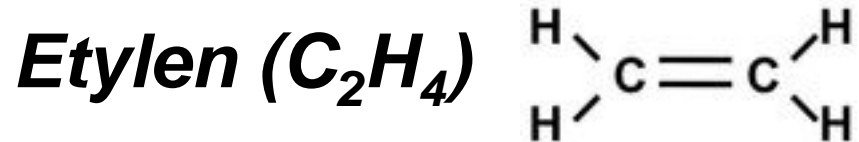


ABA aktywuje ekspresję genów odpowiedzi na stres



Regulacja przekazywania sygnału ABA na poziomie transkrypcji przez czynniki AREB/ABF i ABI5

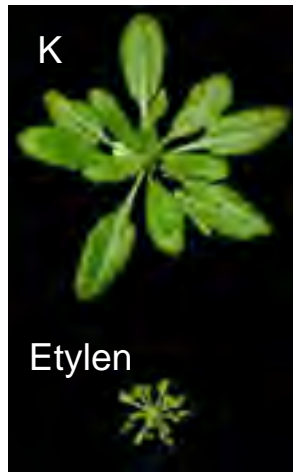
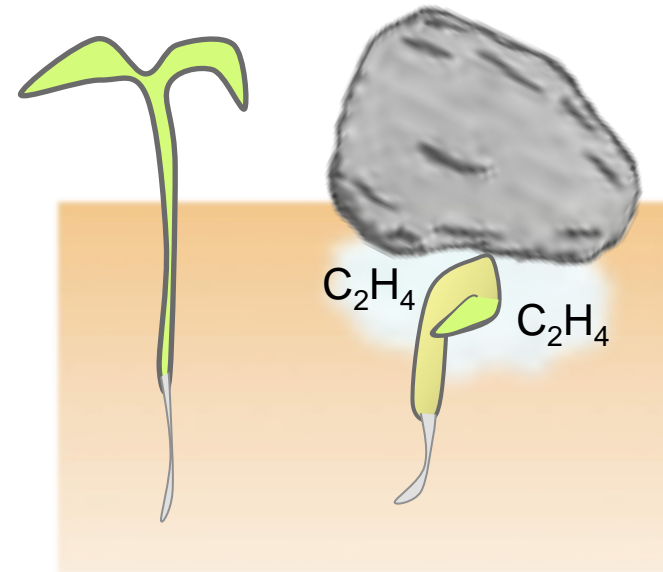




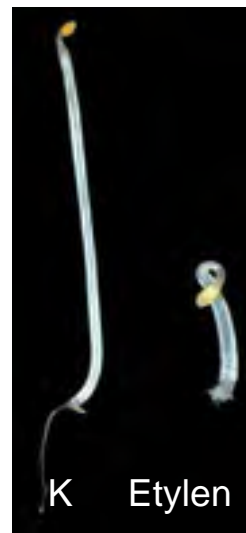
- Regulacja rozwoju, kontrola wzrostu i podziałów komórkowych
- Odpowiedź na czynniki stresujące: susza, uszkodzenie mechaniczne itp.
- Regulacja wzrostu korzenia
- Dojrzewanie owoców, apoptoza

Etylen wywołuje potrójną odpowiedź:

- zahamowanie wzrostu
- grubienie hipokotyli
- tworzenie tzw. haka wierzchołkowego



Zahamowanie rozwoju liści



Zahamowanie rozwoju siewki



Zahamowanie wzrostu korzenia

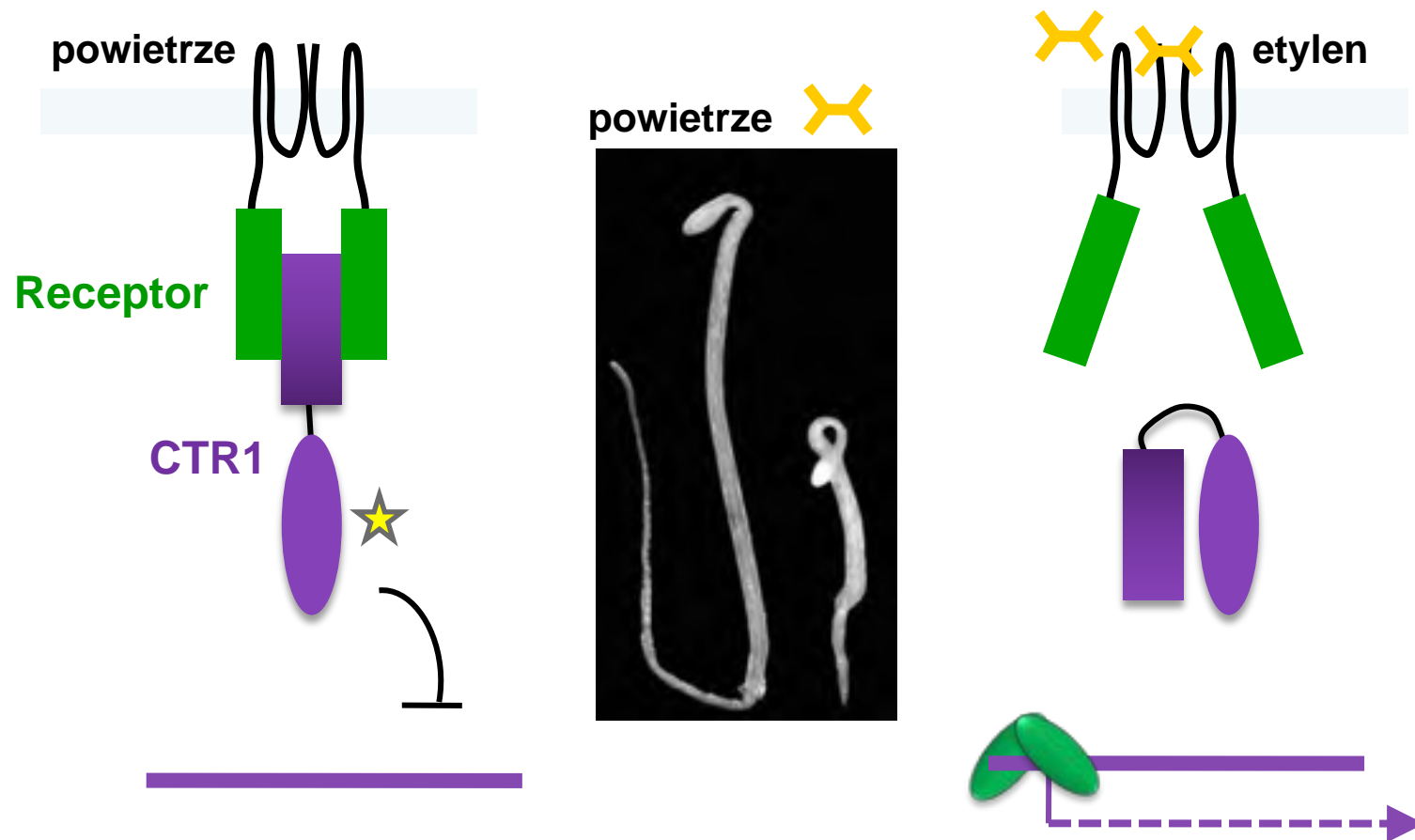


Przyspieszone starzenie

Regulacja ekspresji genów zależnych od etylenu

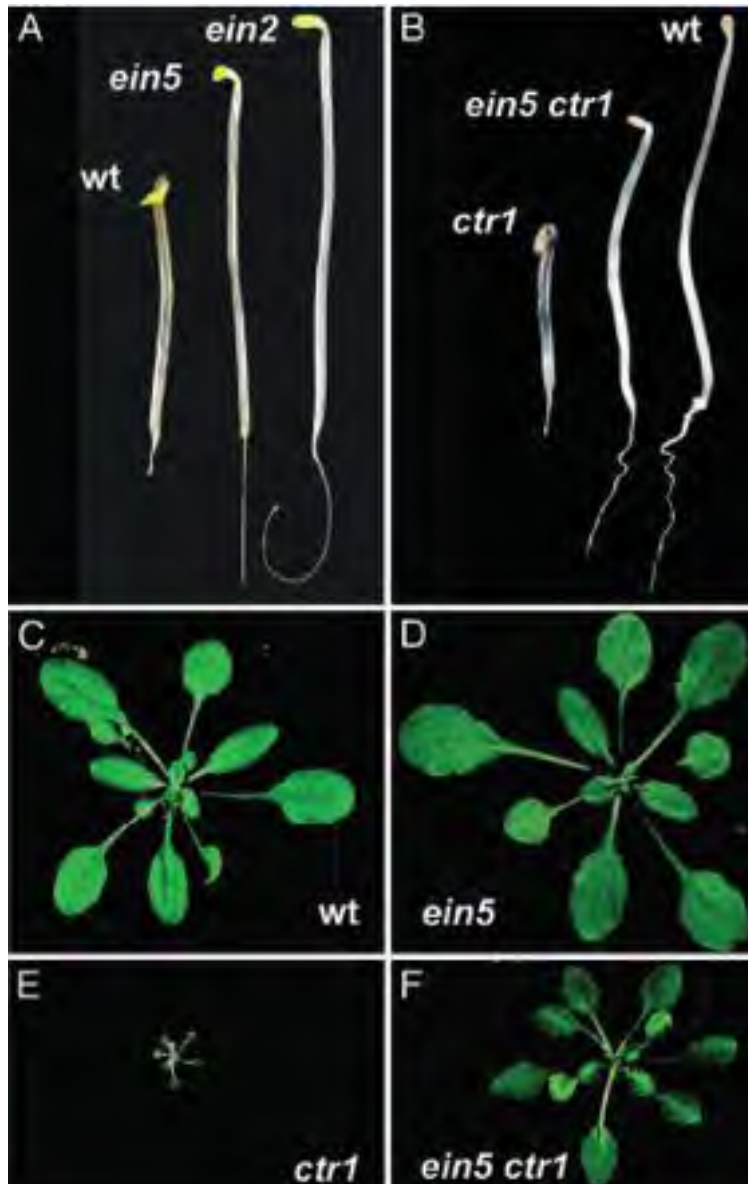
Przy braku etylenu kinaza CTR1 (negatywny regulator odpowiedzi na etylen) wiąże się z receptorem i blokuje transkrypcję.

Związanie etylenu z receptorem uwalnia CTR1, umożliwiając transkrypcję.



Benavente and Alonso (2006) Mol. Biol. Syst.
Cuo and Ecker (2004) Curr. Opin. Plant Biol.

Mutanty szlaku odpowiedzi na etylen

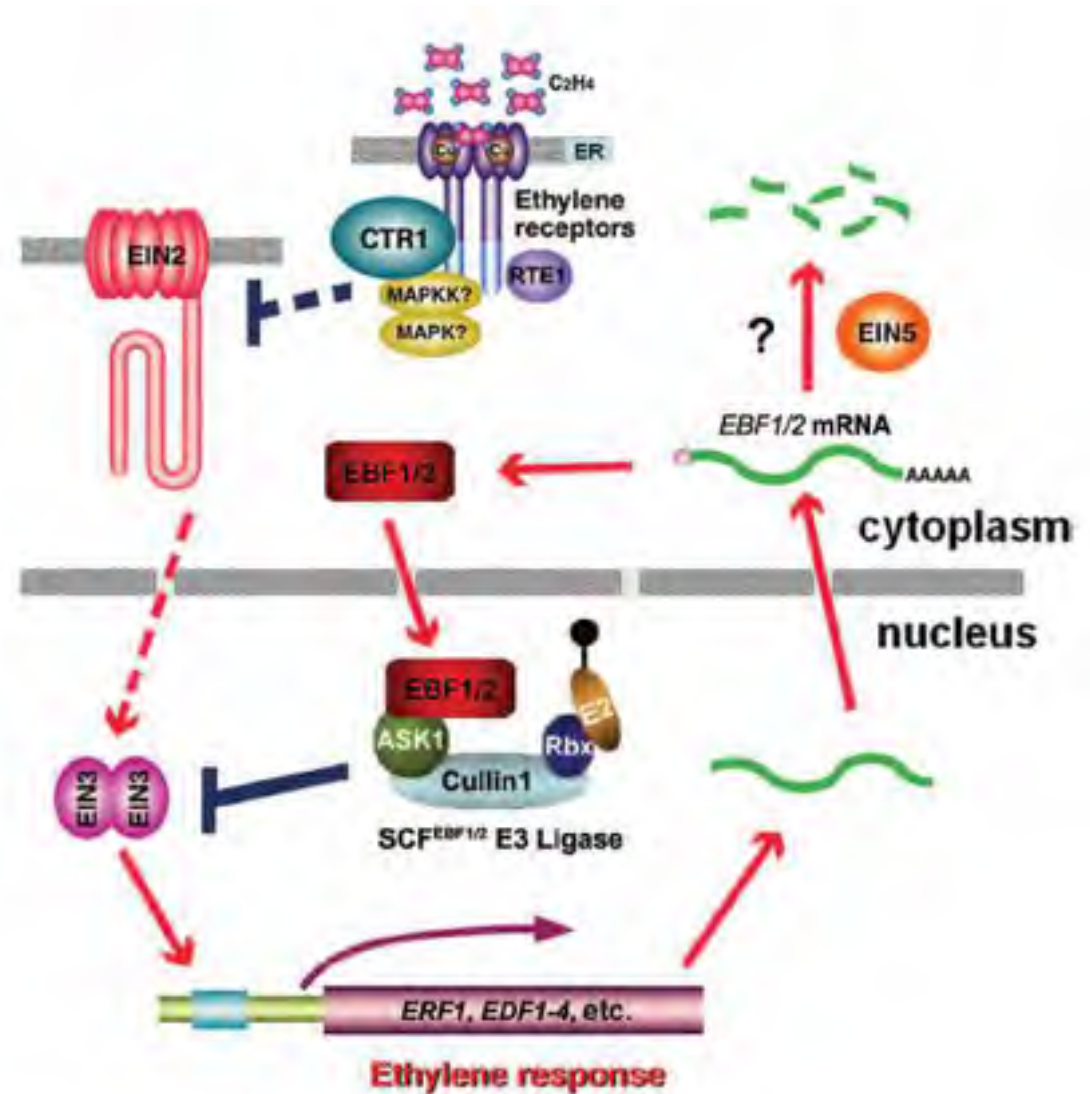


- mutacja **ein5** – brak wrażliwości na wysokie stężenie etylenu
- mutacja **ctr1** – fenotyp konstytutywnej potrójnej odpowiedzi
- podwójny mutant **ein5/ctr1** – częściowe odwrócenie fenotypu **ctr1**

Rola EIN5 w szlaku transdukcji sygnału etylenowego

EIN5 został zidentyfikowany jako egzorybonukleaza *AtXRN4*

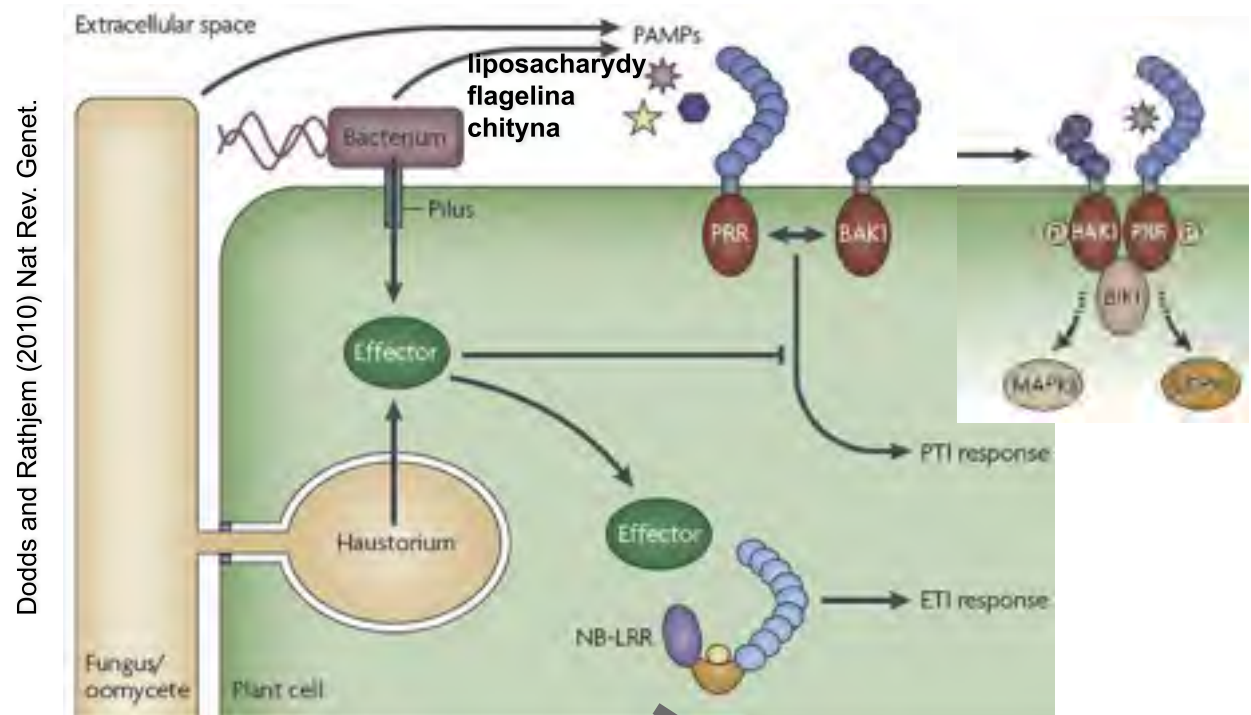
EIN5 rozkłada mRNA *EBF1/2* →
akumulacja *EIN3* →
wzmocnienie odpowiedzi na etylen



3. Obrona przed patogenami: grzyby, bakterie



Pieterse et al. (2009) Nat Chem Biol



Dodds and Rathjem (2010) Nat Rev. Genet.

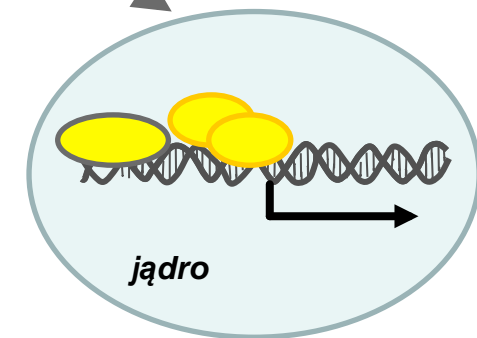
PAMP

pathogen-associated molecular patterns

Cząsteczki uwalniane przez patogeny do przestrzeni międzykomórkowej rośliny są rozpoznawane przez receptory PRR i wywołują odpowiedź odpornościową. Niektóre receptory są transportowane do jądra, gdzie oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi aktywując ekspresję specyficznych genów.

Odpowiedź rośliny na infekcję patogenem: zmiany transkrypcji

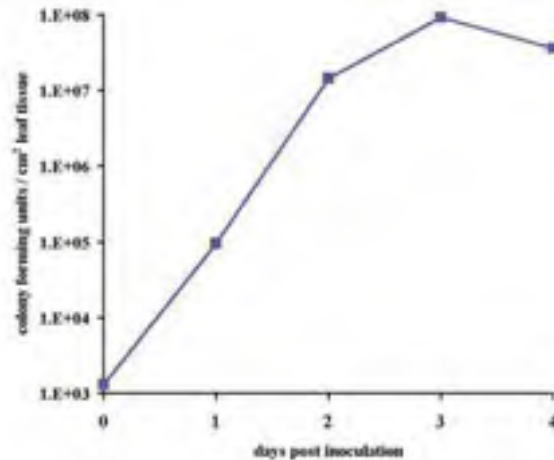
- **synteza hormonów stresu**
- **ekspresja genów PR (pathogenesis-related)**
- **synteza związków antybiotycznych (m.in. fitoaleksyn)**
- **produkcja reaktywnych form tlenu (ROS)**
- **synteza kalozy**



Pseudomonas syringae: modelowy patogen roślinny



Pseudomonas syringae



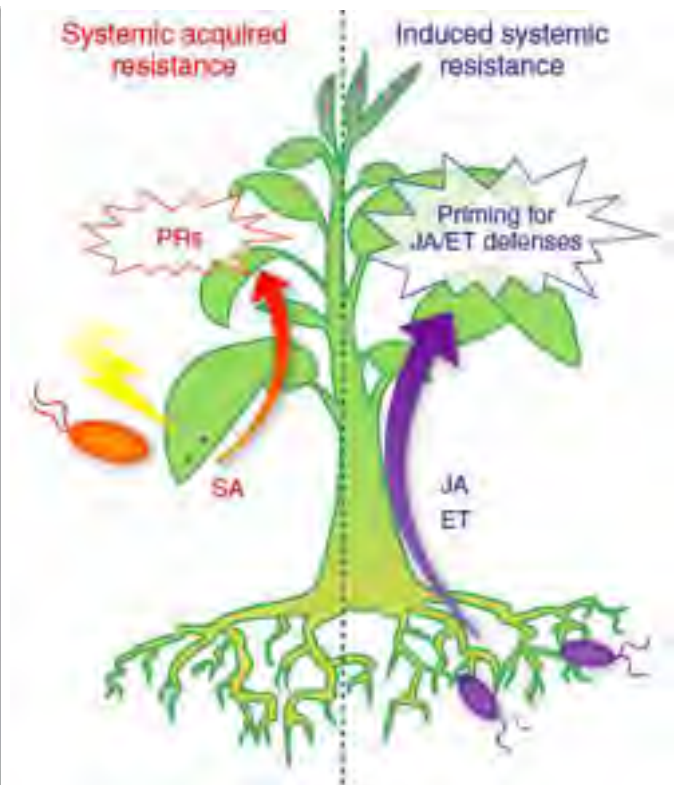
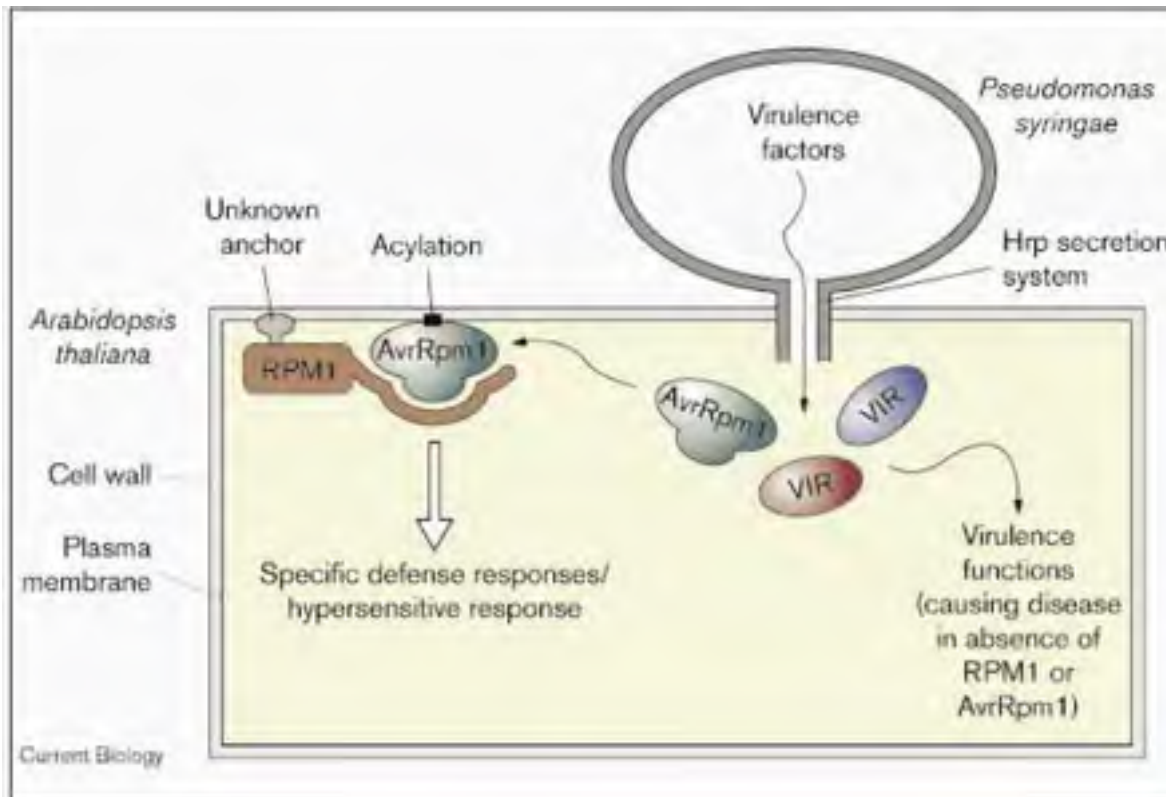
Krzywa wzrostu bakterii *P. syringae* wyizolowanych z liści *A. thaliana* po infekcji



Arabidopsis thaliana infekowana *Pseudomonas syringae*

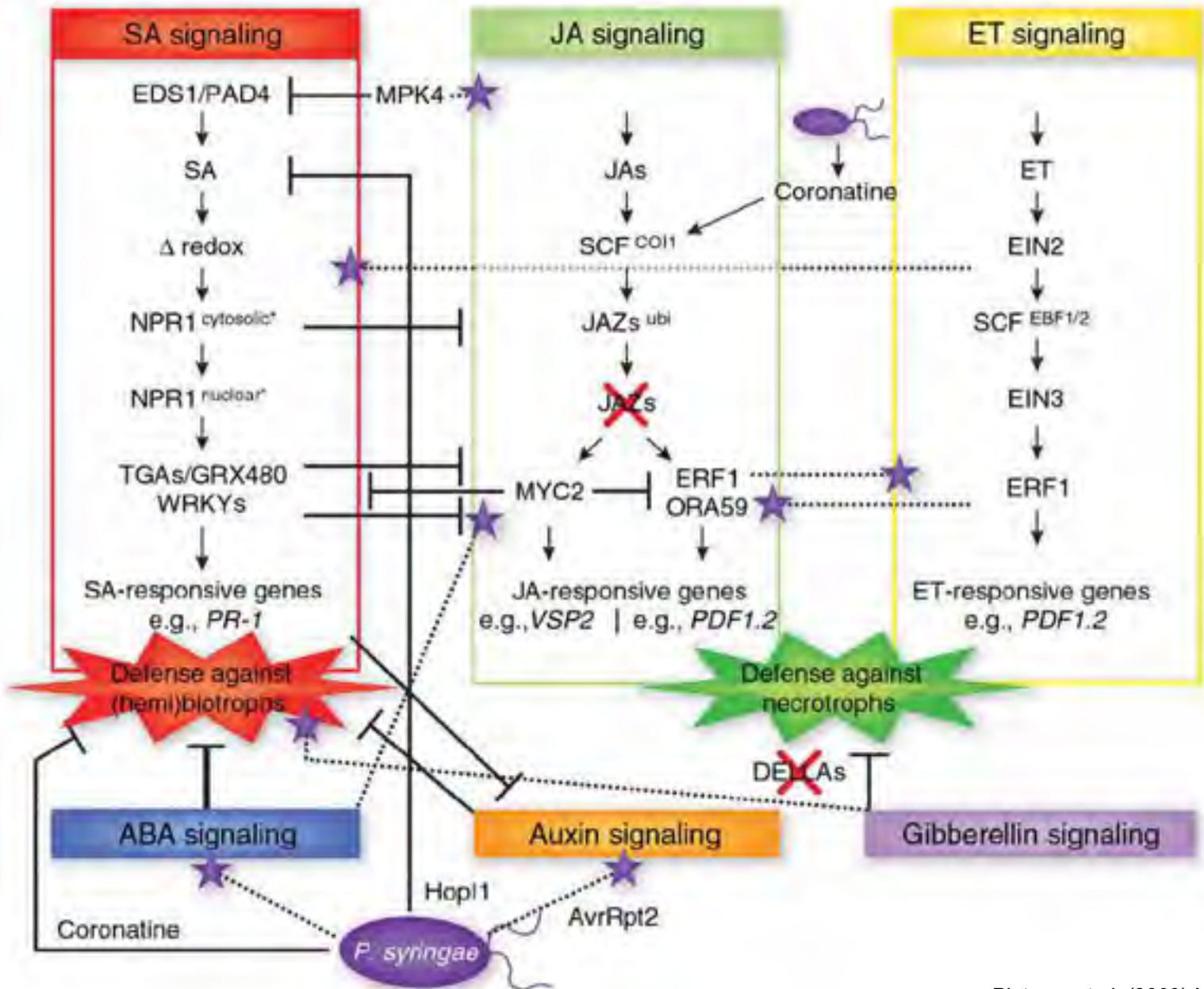


Pseudomonas syringae: modelowy patogen roślinny



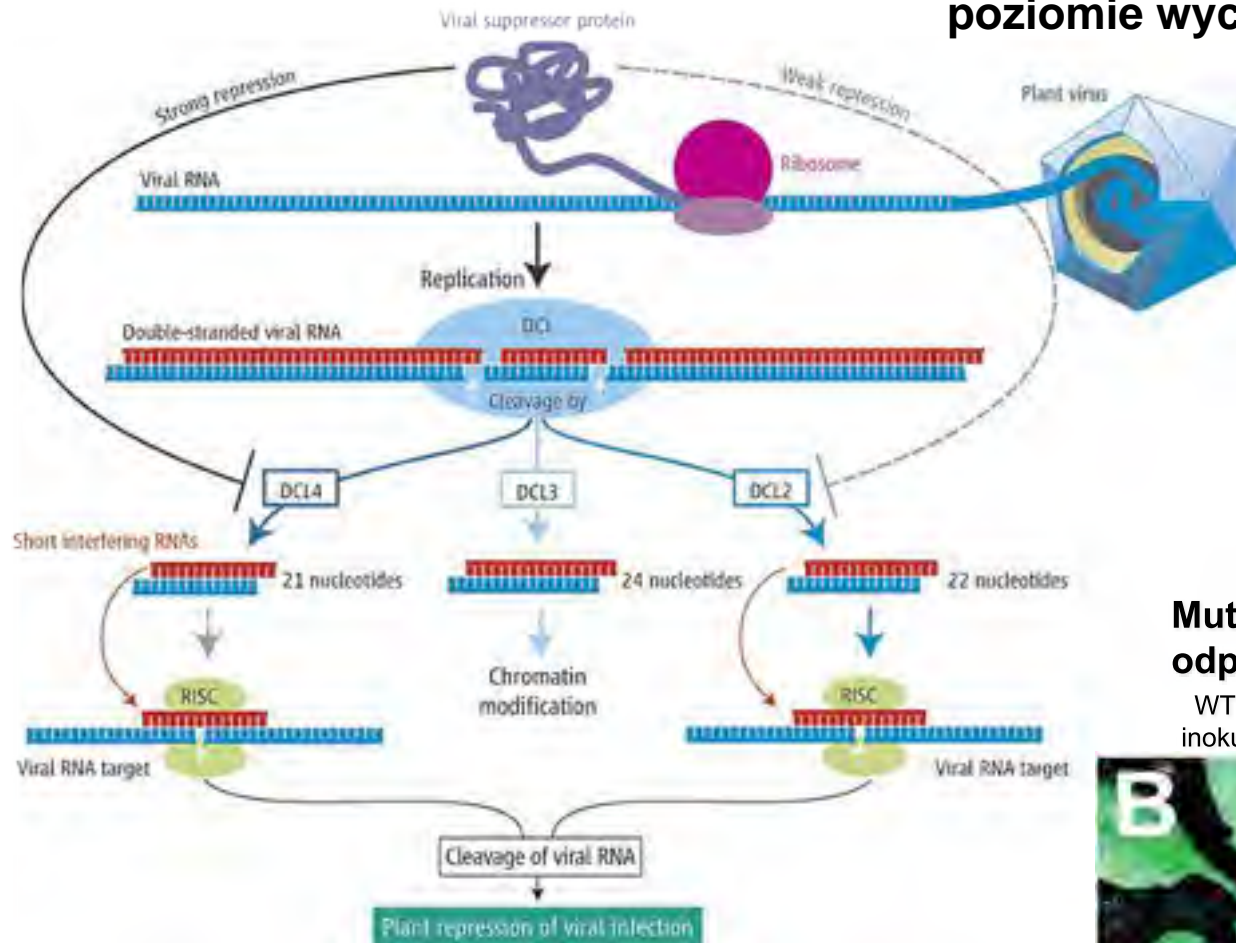
Czynniki wirulentne (VIR) patogena wywołują objawy infekcji
Czynniki awirulentne (Avr) aktywują specyficzną odpowiedź obronną rośliny

Stres biotyczny (infekcja *P. syringae*) i hormony



Obrona przed patogenami: wirusy

Obrona przeciwwirusowa u roślin na poziomie wyciszania RNA (VIGS)



Waterhouse, P.M. and Fusaro, A.F. (2006) *Science*.

Mutanty biogenezy siRNA są mniej odporne na choroby wirusowe

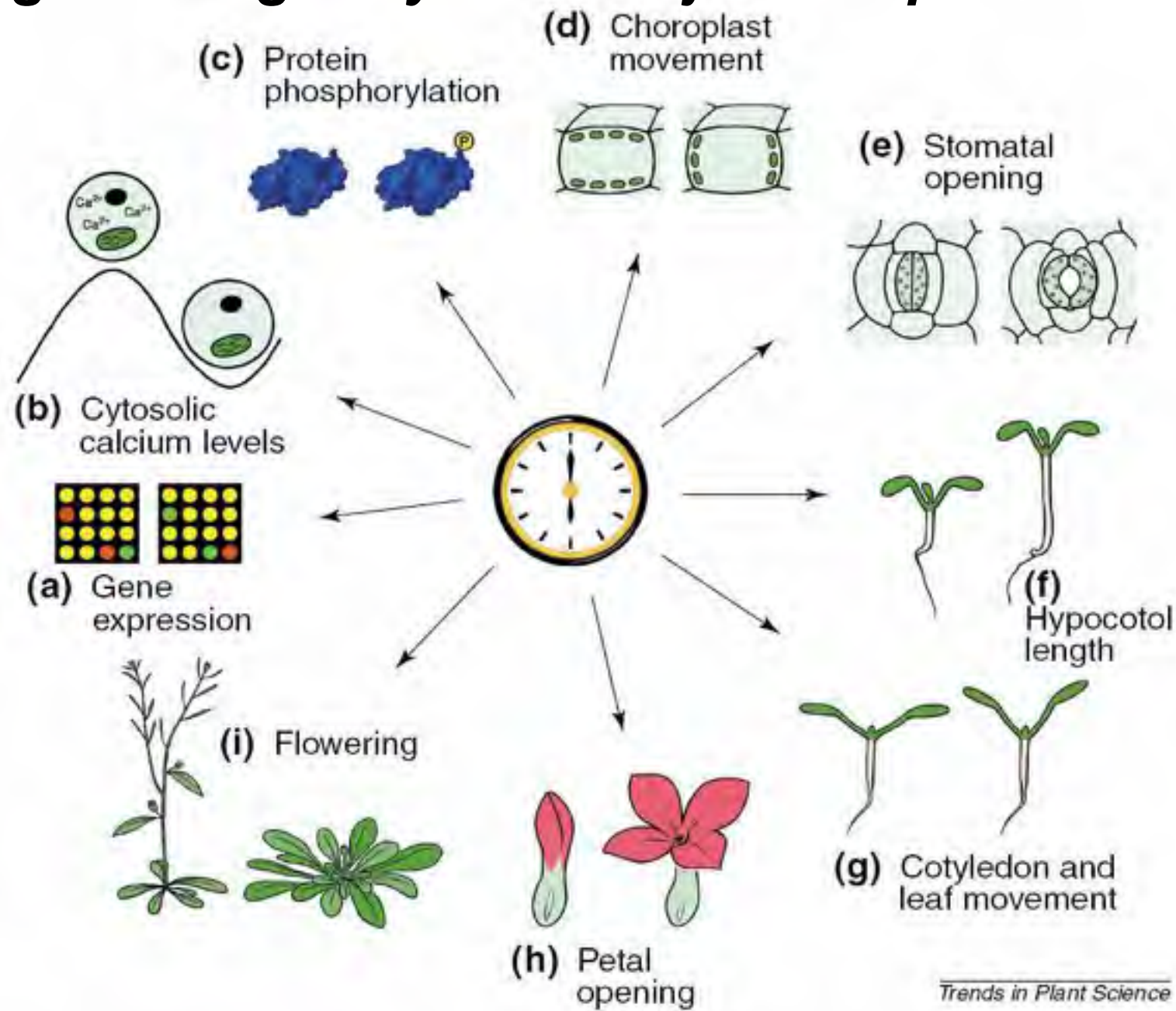
WT *Arabidopsis*
inokulowany TRV

mutant *dcl2-dcl4*
inokulowany TRV



Deleris Oet al. (2006) *Science*

Zegar biologiczny kontroluje wiele procesów



PODSUMOWANIE



Priming



Induced defense