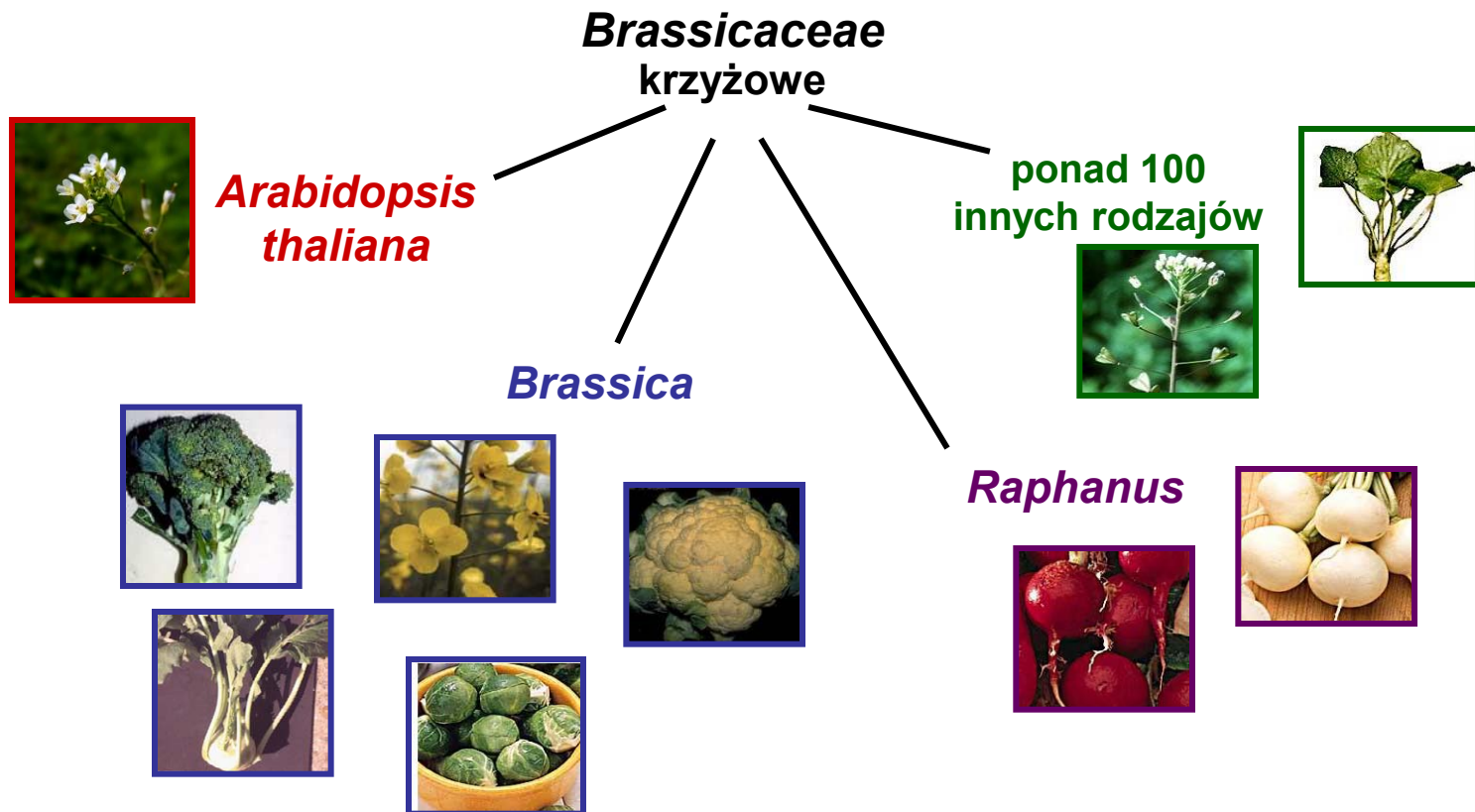


A close-up photograph of green Arabidopsis thaliana leaves. The leaves are small, rounded, and have a fine, fuzzy texture due to numerous small, light-colored hairs (trichomes) covering their surfaces. The background is dark and out of focus, making the green leaves stand out.

Arabidopsis thaliana
jako
organizm modelowy

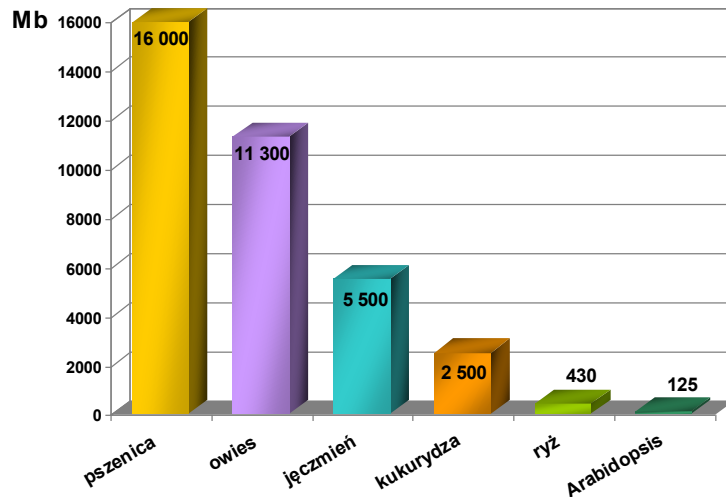
Arabidopsis thaliana

- mały jednoroczny chwast z rodziny *Brassicaceae* (krzyżowe)
- odkryty w XVI w przez Johanna Thala → „*thaliana*”
- w 1873 zidentyfikowano pierwszego mutanta
- liczba chromosomów odkryta w 1907
- sekwencja całego genomu opublikowana w 2000

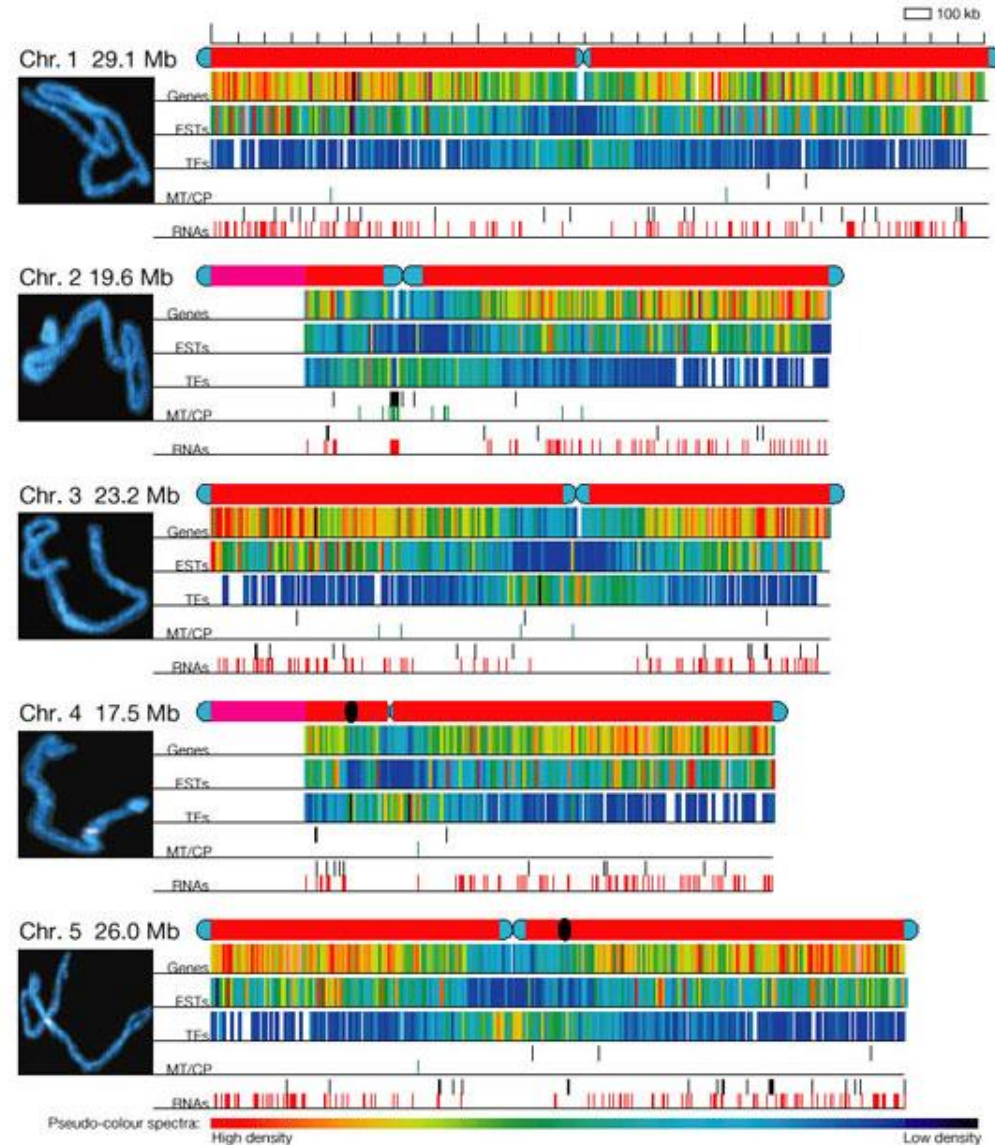


Dlaczego *Arabidopsis*?

- ✓ Mały genom (114.5 Mb/125 Mb)

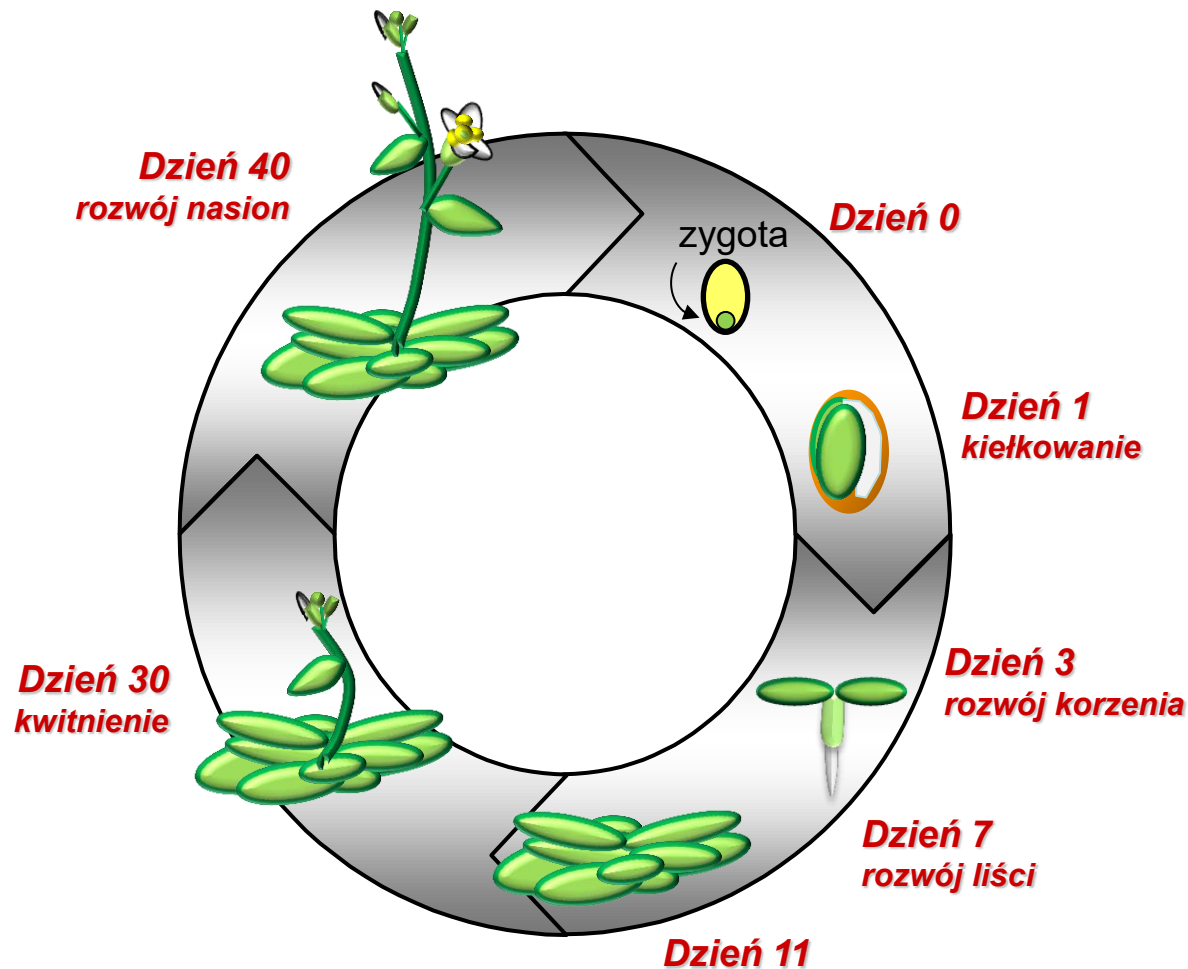


- ✓ Sekwencja całego genomu poznana w 2000 r. (*Arabidopsis Genome Initiative*)
- ✓ Dostępne mapy wszystkich chromosomów



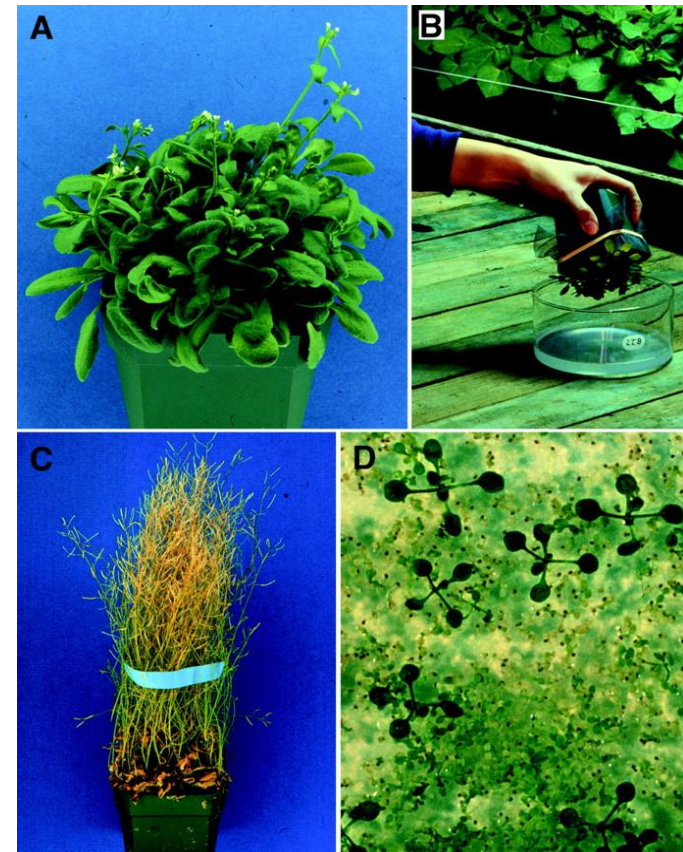
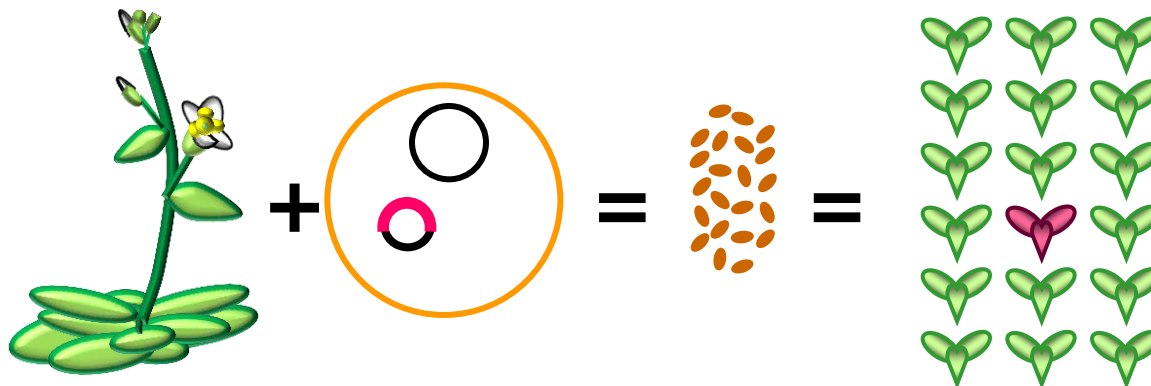
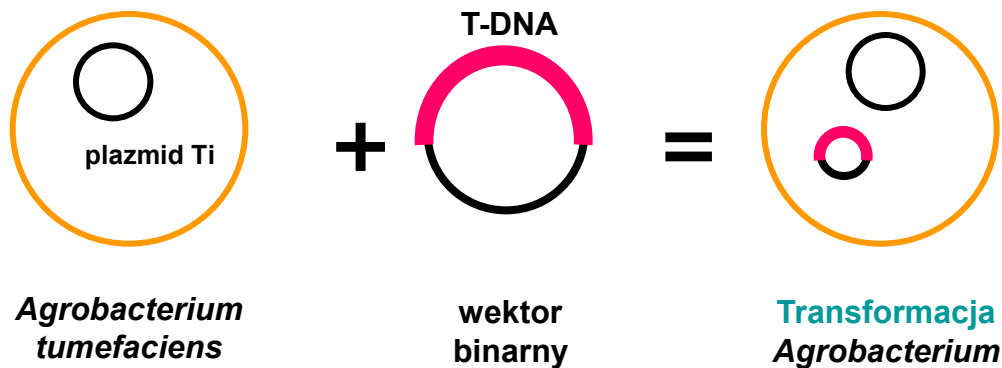
Dlaczego Arabidopsis?

- ✓ Małe rozmiary (15-20 cm) = możliwość hodowli na ograniczonej przestrzeni w laboratorium
- ✓ Krótki cykl życiowy (ok. 6 tygodni)



Dlaczego *Arabidopsis*?

- ✓ Duża liczba dostępnych kolekcji mutantów
- ✓ Efektywne metody transformacji z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*
- ✓ Dostępne metody genetyczne, biochemiczne, wysokoprzepustowe (mikromacierze, RNA-Seq, ChIP, DRS, CLIP, RIP etc)
- ✓ Możliwa praca z hodowlami zawiesinowymi i protoplastami (transfekcja)
- ✓ Zastosowanie techniki CRISPR-Cas do modyfikacji genomu



Ekspresja przejściowa w protoplastach i siewkach *Arabidopsis*

Łoboziak, praca magisterska.

A) TEAMP



WYKORZYSTANIE
TYLKO LIŚCI



PROBLEM Z
CIĘCIEM LIŚCI



KONIECZNOŚĆ WYKORZYSTANIA
SPECJALISTYCZNEGO SPRZĘTU



CZAS OCZEKIWANIA
DO 3 GODZIN

B) „TAPE ARABIDOPIS SANDWICH



DUŻA DOSTĘPNOŚĆ
MATERIAŁU



ŁATWA OBRÓBKĄ

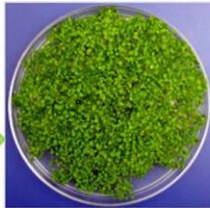


BRAK KONIECZNOŚCI UŻYCIA
SPECJALISTYCZNEGO SPRZĘTU

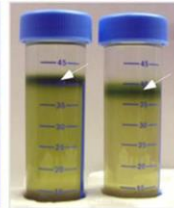


CZAS OCZEKIWANIA
DO 30 MINUT

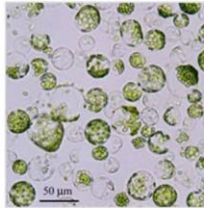
C) IZOLACJA Z SIEWEK



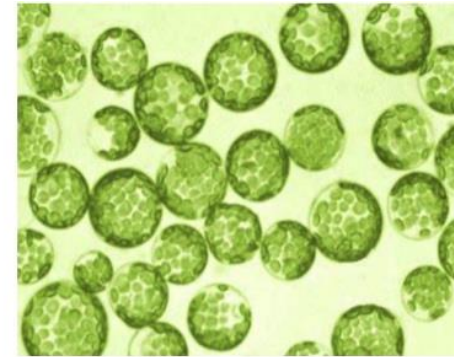
WYKORZYSTUJEMY STERYLNE
14-DNIOWE SIEWKI



OCZYSZCZAMY PROTOPLASTY
W GRADIENTCIE SACHAROZY



BARDOZO DUŻA CZYSTOŚĆ
PROTOPLASTÓW



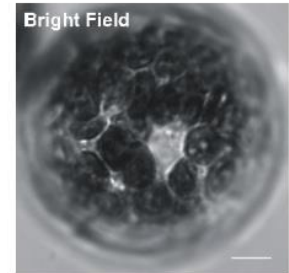
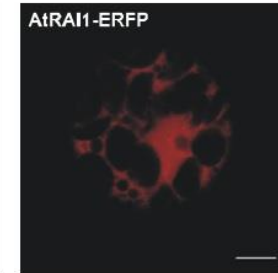
AtRAI1-ERFP



konstrukt
reporterowy



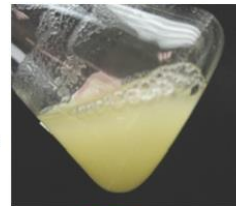
Scal bar - 5µm



Sikorski, dane nieopubl.



**Agrobacterium
tumefaciens**



konstrukt
reporterowy
LUC, GFP

aceto-
syringon



W ciemności

1. wzrost siewek 40h
2. inkubacja z substratem
lucyferazy (D-lucyferyna)
3. odczyt kamerą cyfrową



Wady Arabidopsis jako systemu badawczego

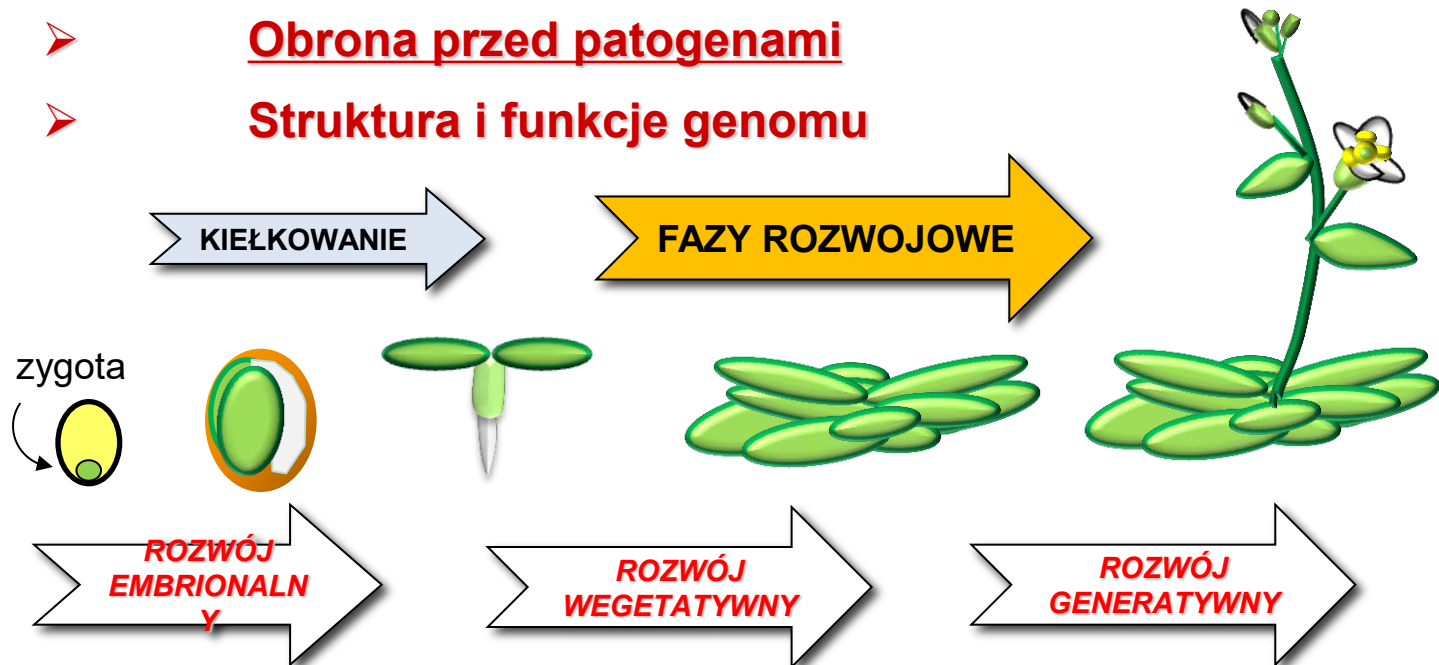
→brak funkcjonalnego działania przejściowego wyciszania ekspresji genów (VIGS)

→niedostępne manipulacje genetyczne związane z rekombinacją homologiczną

→trudności z wyprowadzaniem kultur zawieszinowych i w pracy z nimi, szczególnie w przypadku mutantów

Jakie procesy bada się u *Arabidopsis*?

- Wzrost i rozwój roślin
- Fotosynteza
- Zegar biologiczny
- Funkcje hormonów
- Mechanizmy regulacji ekspresji genów
- Rozmnażanie roślin
- Szlaki odpowiedzi na stres abiotyczny
- Obrona przed patogenami
- Struktura i funkcje genomu

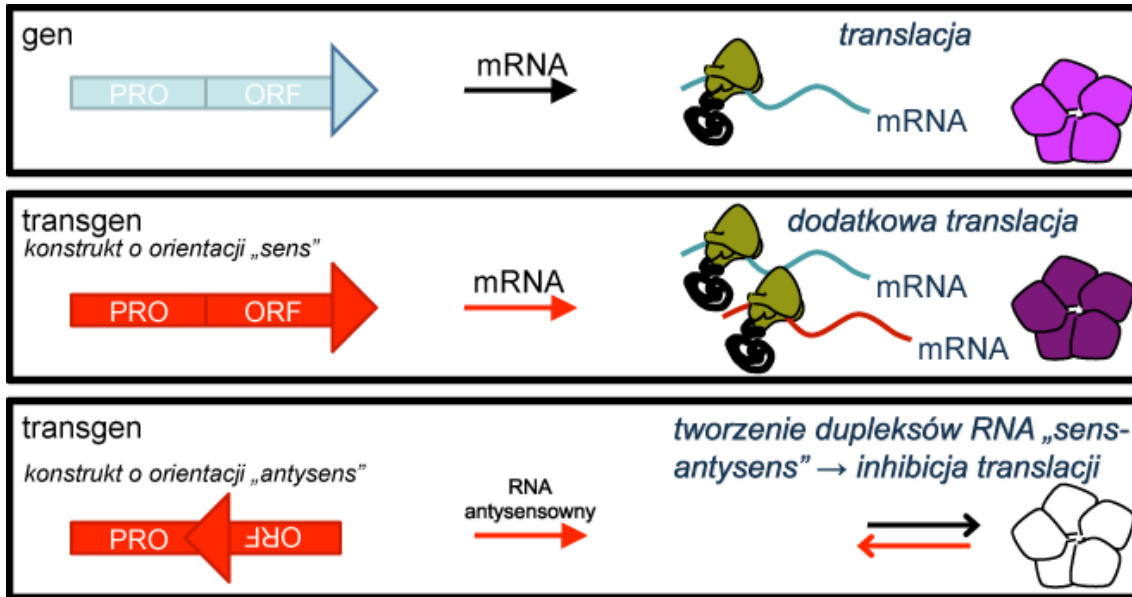


1. Interferencja RNA w roślinach

Zjawisko wyciszania ekspresji genów (RNAi) zaobserwowano po raz pierwszy w kwiatach petunii z nadekspresją genu syntazy chalkonowej (pigmentacja kwiatów).
Purpurowa barwa kwiatów petunii zależy od antocyjanin syntetyzowanych przez syntazę chalkonową (CSH)

Oczekiwane wyniki eksperymentu: wprowadzenie transgenu syntazy chalkonowej o mRNA w orientacji sensownej zwiększy ekspresję CSH (ciemniejsze kwiaty), a w orientacji antysensownej zablokuje syntezę barwnika (jaśniejsze kwiaty).

Petunia hybrida

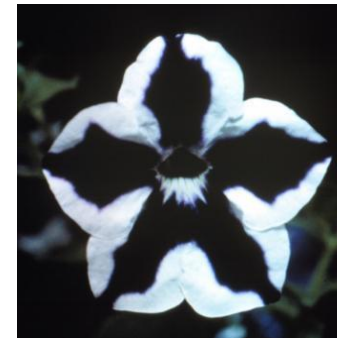


Napoli et al., Plant Cell, 1990



fenotyp dziki

Wynik:



nadekspresja transgenu CSH

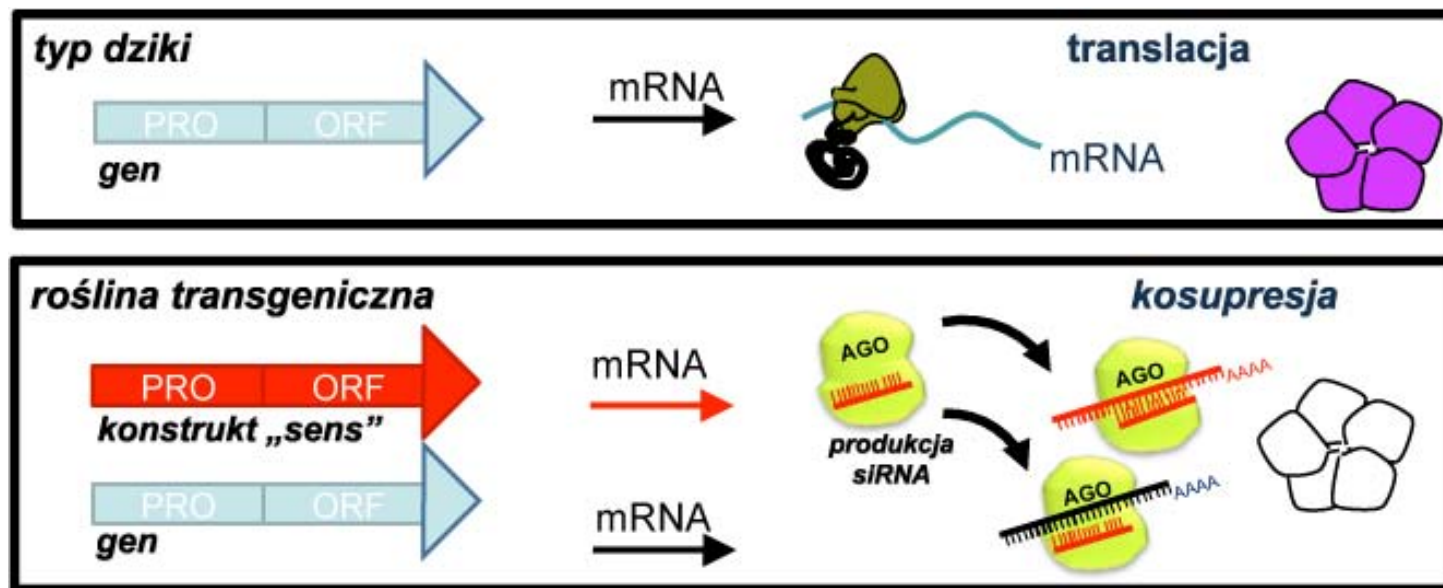
sens



antysens

W modyfikowanych roślinach nie dochodzi do syntezy ani endogennej ani transgenicznej CSH - zjawisko kosupresji.

Kosupresja jest wynikiem produkcji siRNA

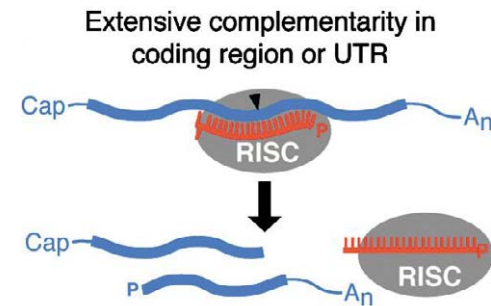
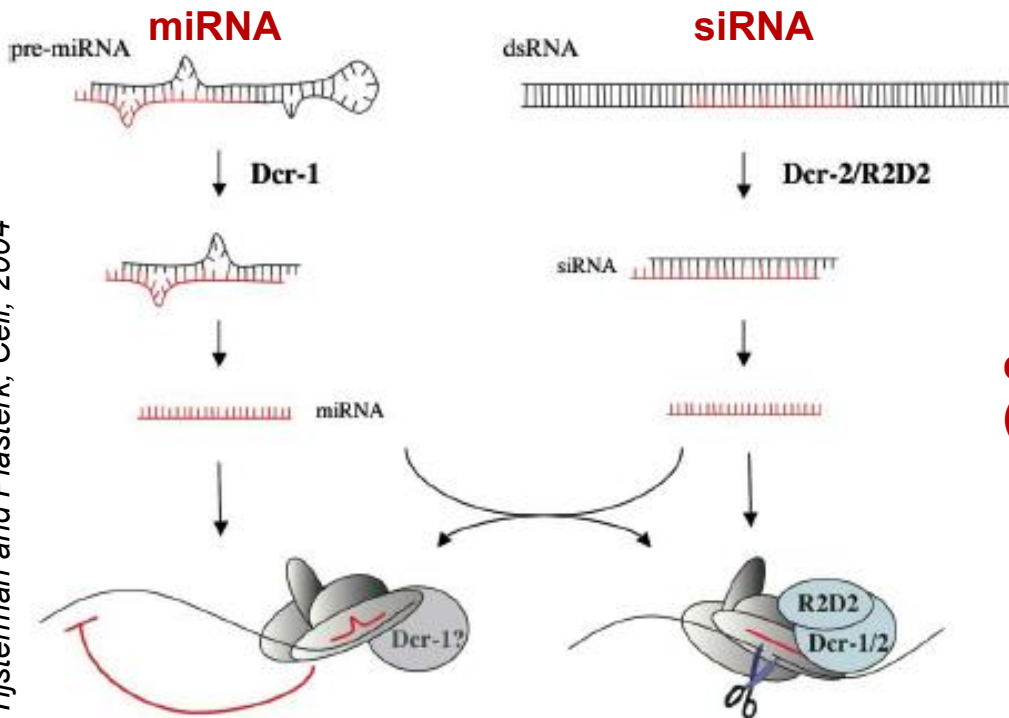


Badania nad zjawiskiem RNAi u Arabidopsis

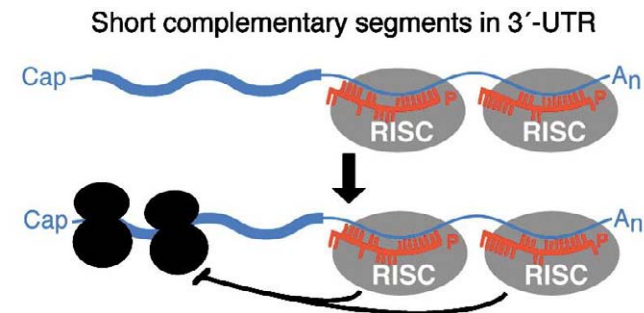
- **RNAi jako mechanizm obronny przed patogenami: wirusami i bakteriami**
- **Amplifikacja sygnału wyciszającego (siRNA)**
- **Rozprzestrzenianie wyciszania w roślinie**
- **Udział specyficznych dla roślin Polimeraz IV i V w RNAi**
- **Rola miRNA w procesach rozwojowych, ścieżkach sygnałowych i odpowiedzi na stres**

Interferencja RNA: model działania

Tijsterman and Plasterk, Cell, 2004

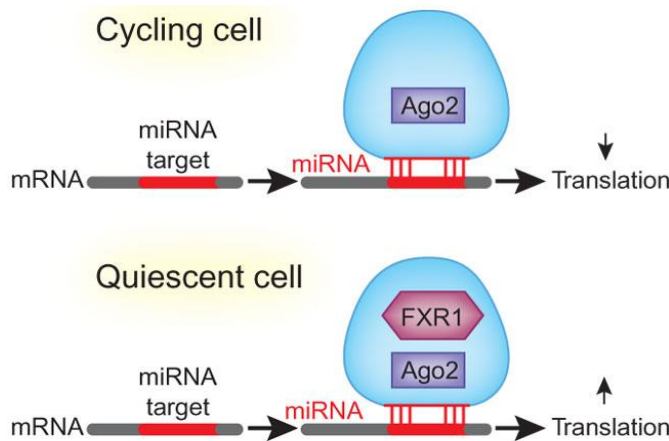


cięcie mRNA zależne od siRNA/miRNA (PTGS)

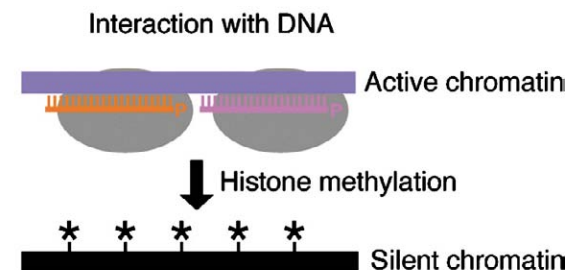


Inhibicja translacji (PTGS)

Rusk, Nature Meth, 2008



Aktywacja translacji (PTGS)



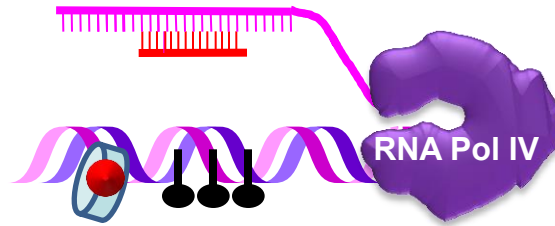
Wyciszenie transkrypcyjne (TGS)

Bartel, Cell, 2004

TGS: Transcriptional Gene Silencing (RITS)

formowanie heterochromatyny, metylacja DNA, modyfikacja histonów, wyciszanie transpozonów

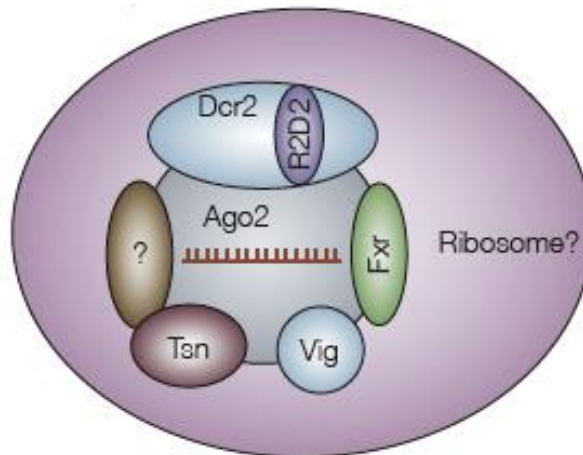
- siRNA
- piRNAs



PTGS: Post-Transcriptional Gene Silencing (RISC)

cięcie mRNA, inhibicja translacji, degradacja mRNA

- siRNA (exo-siRNAs and endo-siRNAs; ta-siRNA; nat-siRNA; lsiRNAs)
- miRNA (mirtron)
- piRNA



Holo-RISC

Białka DICER, AGO i RdRP

	Species	AGO	PIWI	Dicer-like	RdRP
Plants	<i>A. thaliana</i>	10	-	4 (DCL 1-4)	6
	<i>O. sativa</i>	18	-	5	5
Fungi	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-
	<i>S. pombe</i>	1	-	1	1
	<i>N. crassa</i>	1	-	1	3
	<i>A. nidulans</i>	1	-	1	2
Metazoa	<i>C. elegans</i>	5	3	2 (Dicer + Drosha)	4
	<i>D. melanogaster</i>	2	3	3 (2 Dicers + Drosha)	-
	<i>D. rerio</i>	4	4	2 (Dicer + Drosha)	-
	<i>H. sapiens</i>	4	4	2 (Dicer + Drosha)	-

sortowanie sRNA *Arabidopsis thaliana*

AtDCL1 **miRNA**



AtDCL2 - 4 **siRNA**



DCL1 → 21nt miRNA → AGO1/7/10

DCL2 → 22nt siRNA

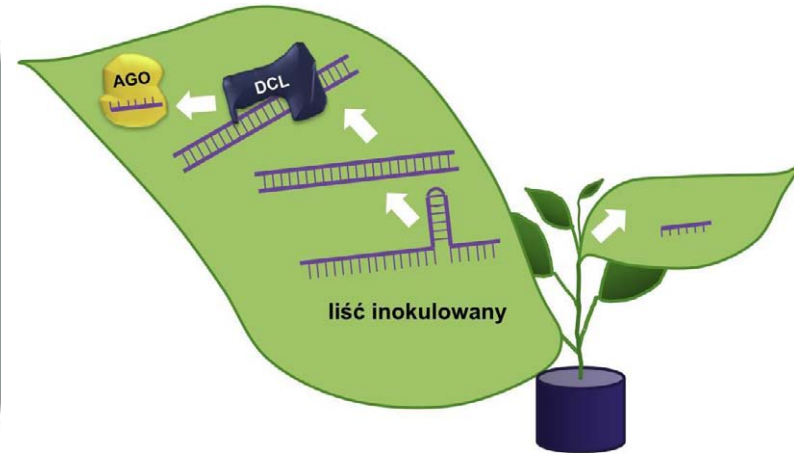
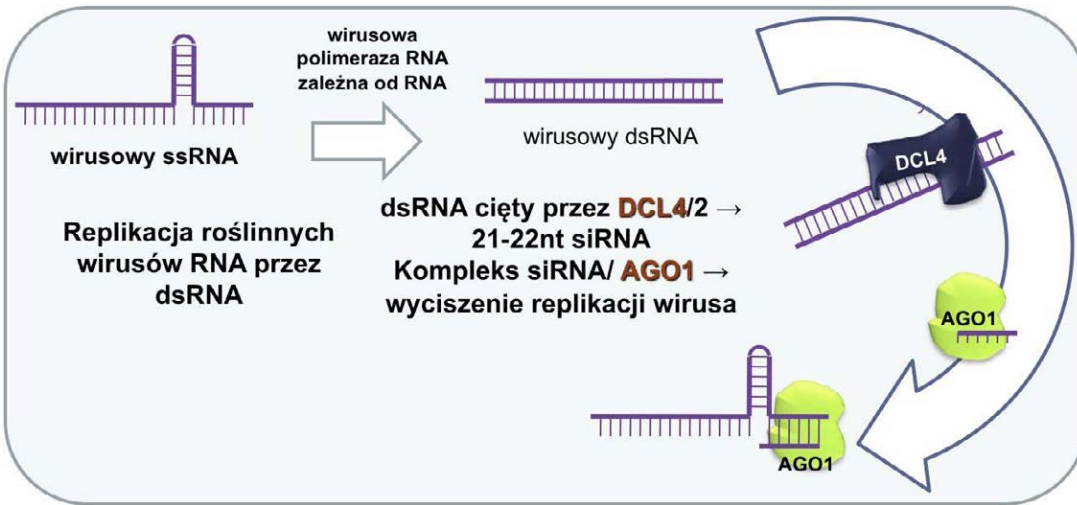
DCL3 → 24nt siRNA → AGO4/6

DCL4 → 21nt siRNA → AGO1

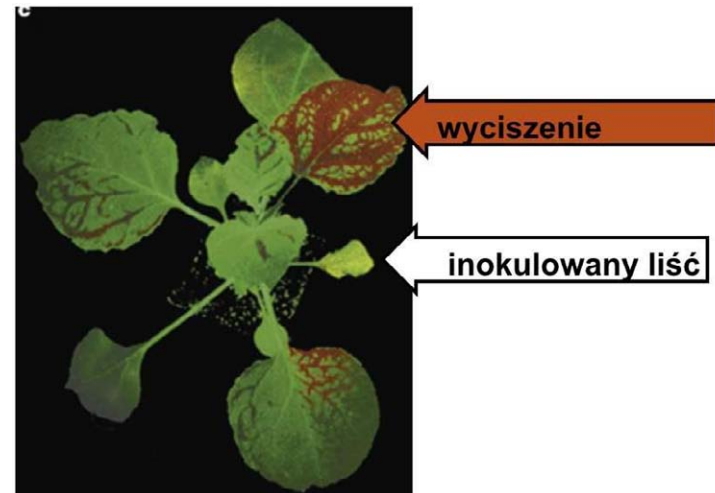
tasiRNA

RNAi jako mechanizm obronny przed patogenami: wirusami i bakteriami

Infekcja wirusowa powoduje akumulację siRNA



Sygnal wyciszający może rozprzestrzeniać się w roślinie poprzez floem (wiązki przewodzące)



RNAi jako mechanizm obronny przed patogenami: wirusami i bakteriami

Mutanty biogenezy siRNA są mniej odporne na choroby wirusowe i infekcje bakteryjne

WT *Arabidopsis*
inokulowany TRV



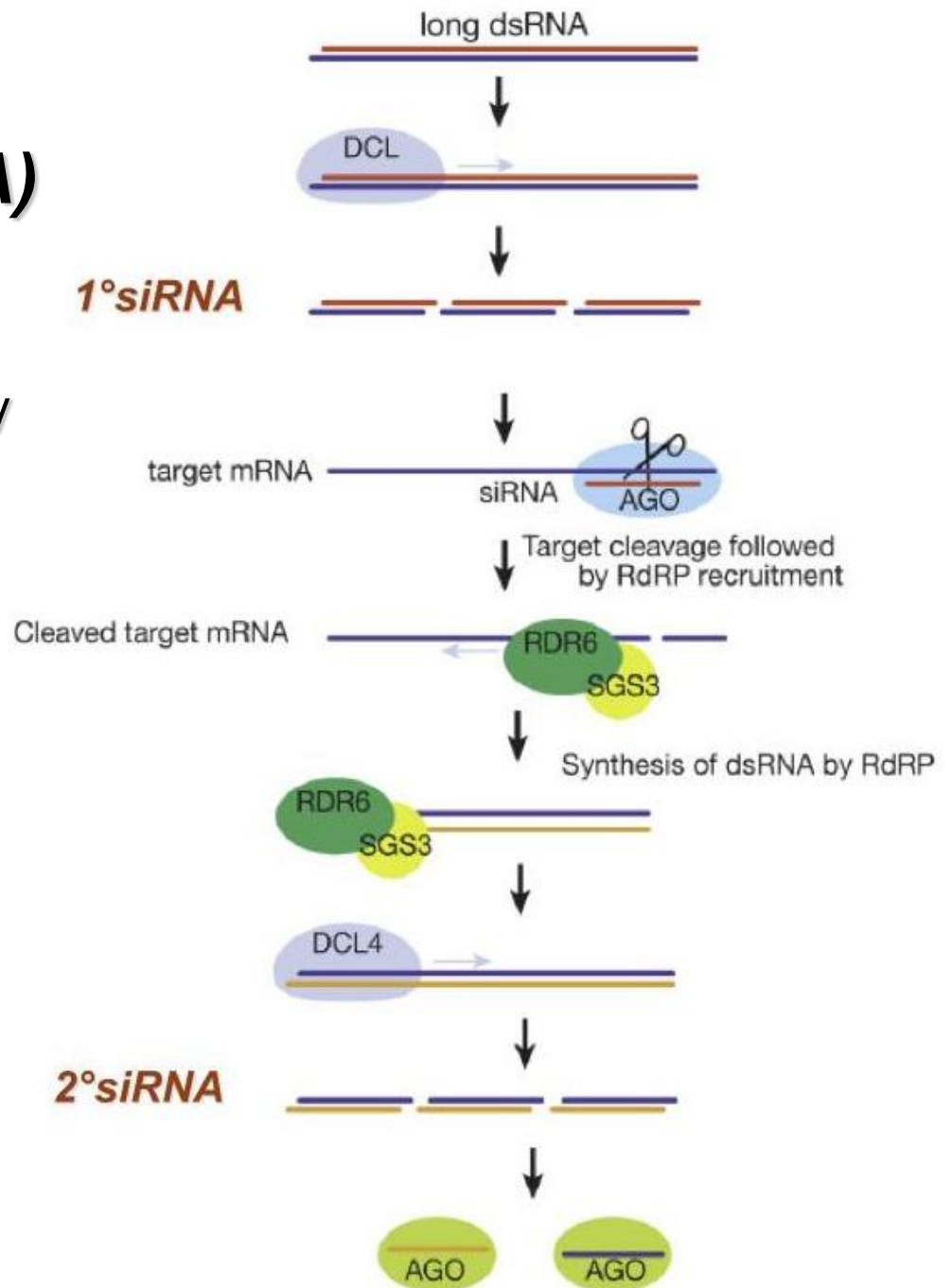
mutant *dcl2-dcl4*
inokulowany TRV



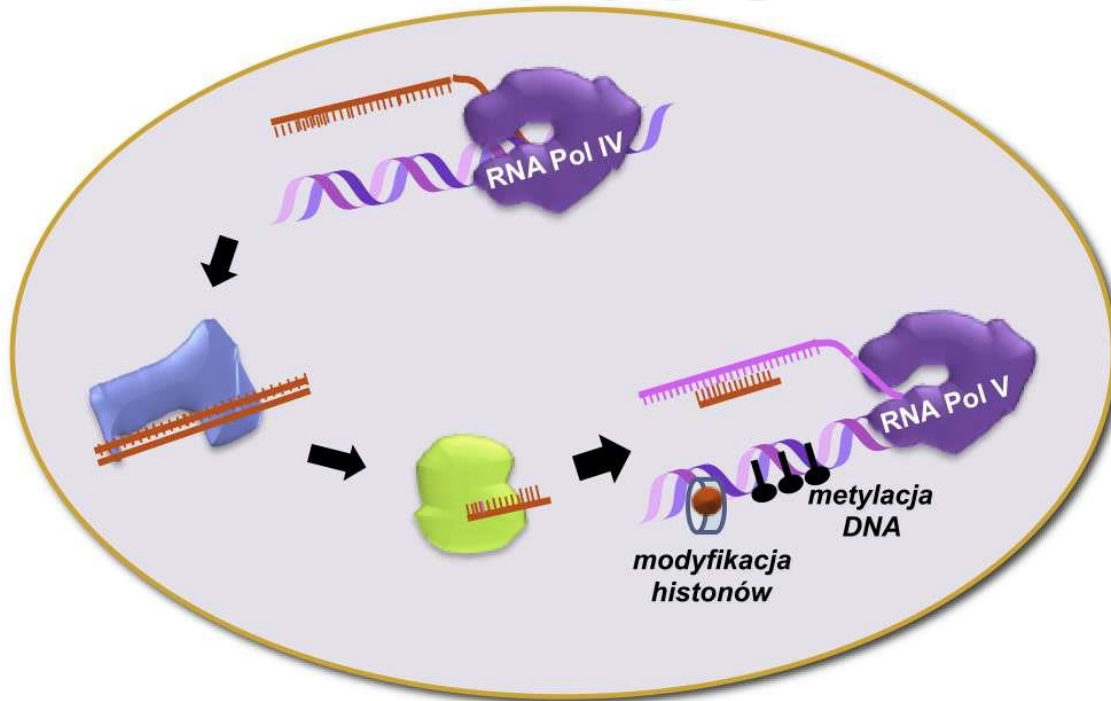
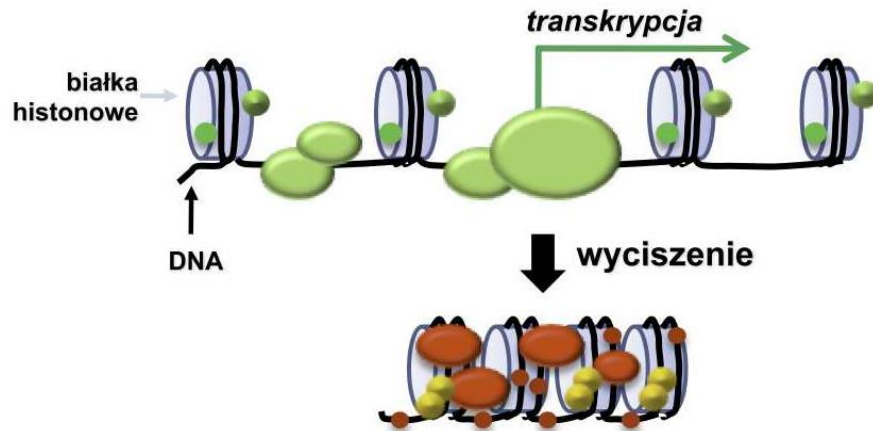
A. thaliana typu dzikiego (La-er) i mutanty *dcl1-9* i *hen1-1* inokulowane bakteriami *Pseudomonas*.

Amplifikacja sygnału wyciszającego (siRNA)

Efekt wyciszenia jest wzmacniany przez amplifikację siRNA do drugorzędowych siRNA przy udziale polimerazy RNA zależnej od RNA (**RdRP**)



Polimerazy RNA IV i V uczestniczą w transkrypcyjnym wyciszaniu genów (TGS)



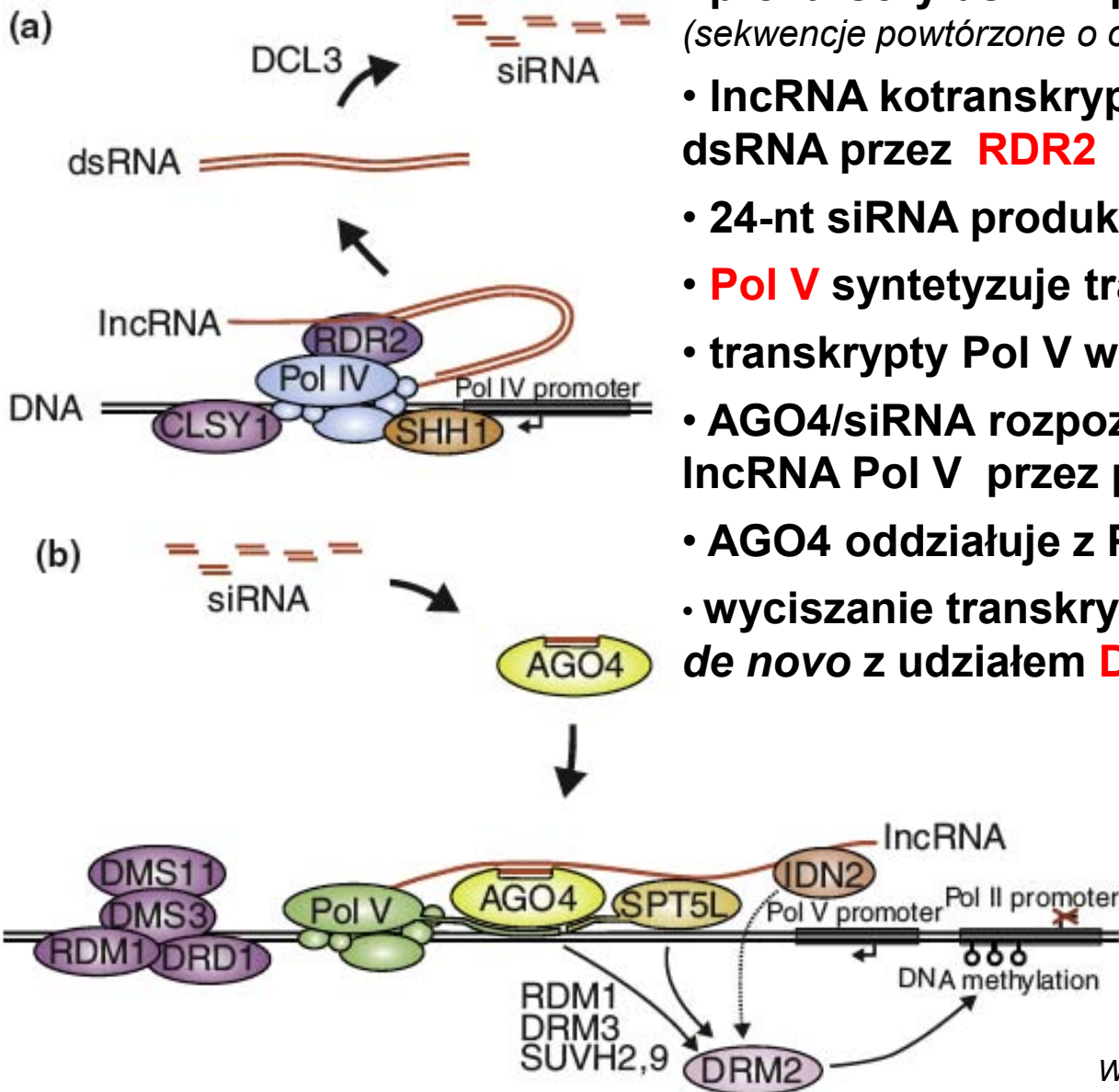
Polimeraza RNA IV uczestniczy w biogenezie siRNA.

Niekodujące transkrypty polimerazy RNA V nakierowują maszynę wyciszającą do odpowiednich sekwencji DNA.

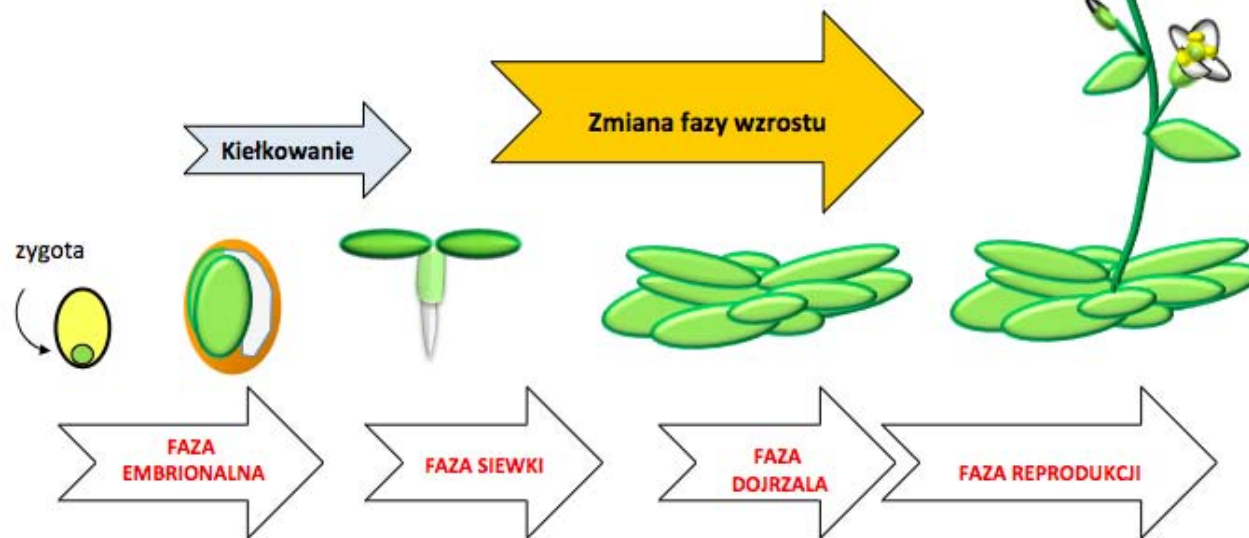
Pol IV i Pol V

(specyficzne dla roślin)

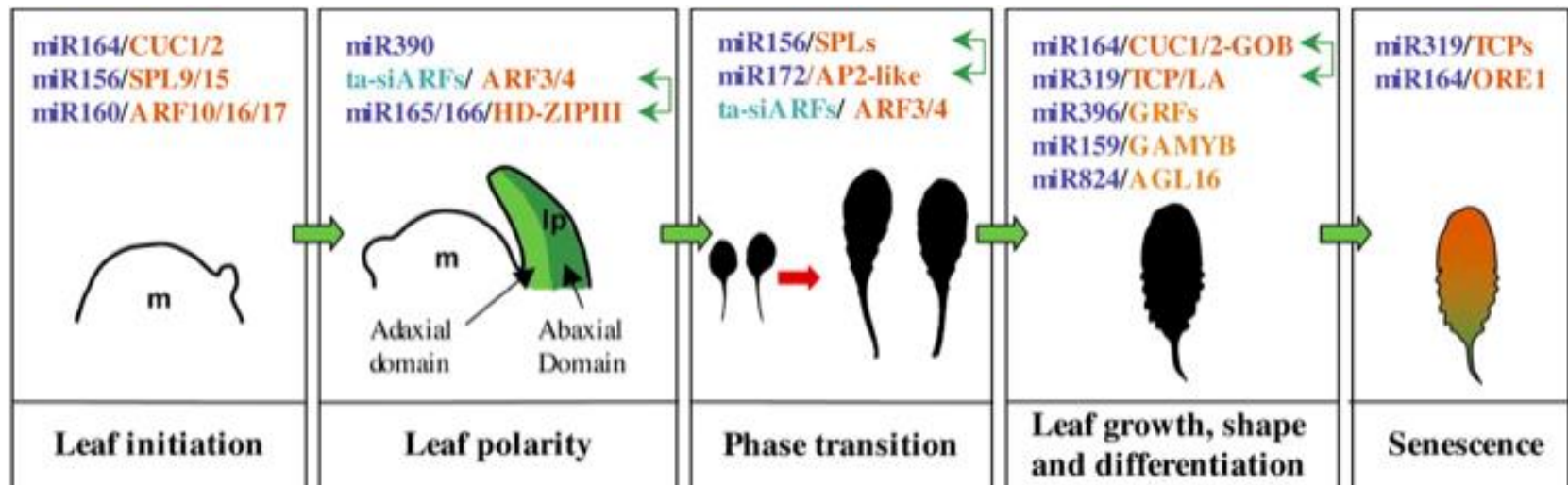
- lncRNA, prekursorzy do siRNA, generowane przez **Pol IV**
- prekursorzy dsRNA produkowane przez **Pol III** (sekwencje powtórzone o odwróconej orientacji)
- lncRNA kotranskrypcyjnie przetworzone do dsRNA przez **RDR2**
- 24-nt siRNA produkowane przez **DCL3** (Dicer)
- **Pol V** syntetyzuje transkrypt-platformę
- transkrypty Pol V wiążą **AGO4/siRNA**
- AGO4/siRNA rozpoznaje cele genomowe z lncRNA Pol V przez parowanie
- AGO4 oddziałuje z Pol IV and SPT5L
- wyciszanie transkrypcyjne przez metylację DNA *de novo* z udziałem **DRM2**



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*)

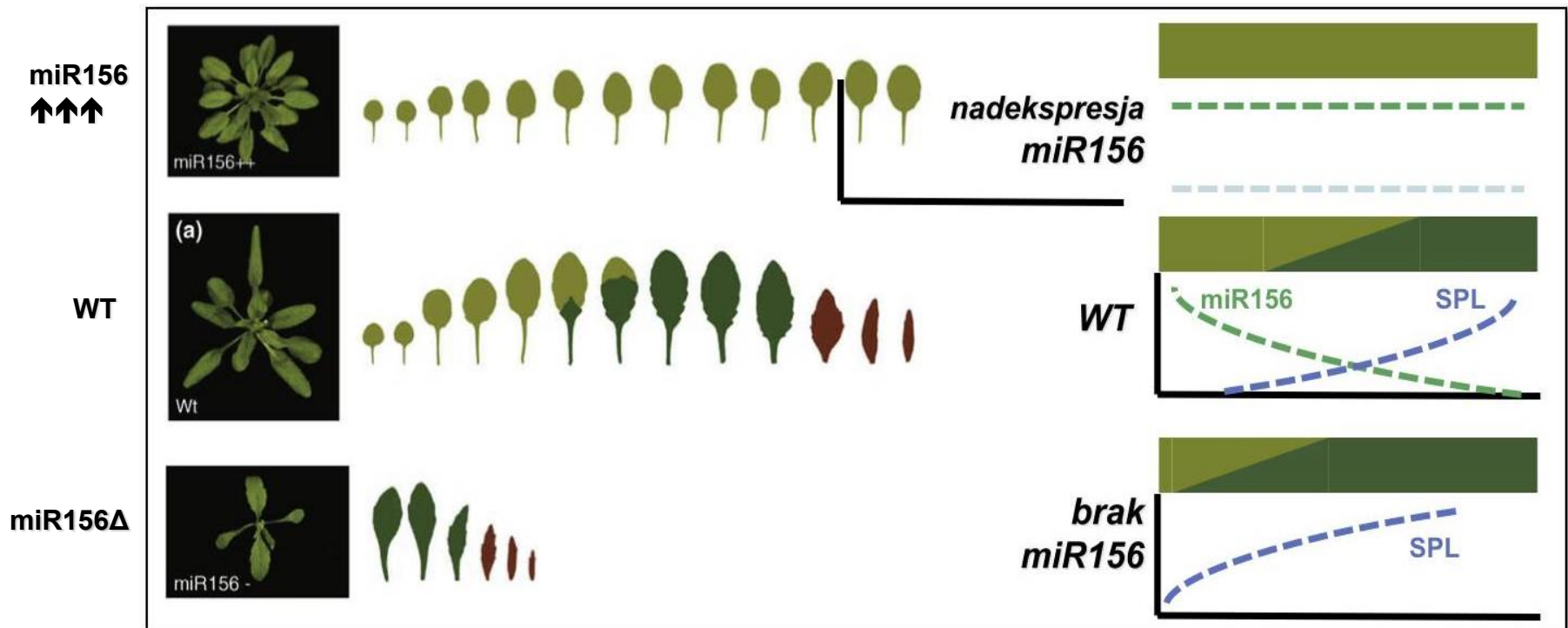
SPL – rodzina czynników transkrypcyjnych, związanych z przejściem rośliny w fazę rozwoju generatywnego (regulacja kwitnienia)

SPL3



miejsce
wiązania
miR156

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



Defekty morfologiczne wywołane nadekspresją miRNA w *Arabidopsis*

miRNA156



miRNA164



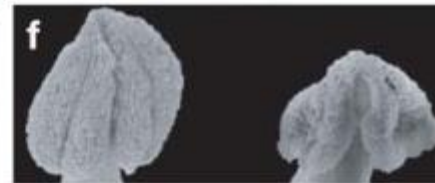
miRNA172



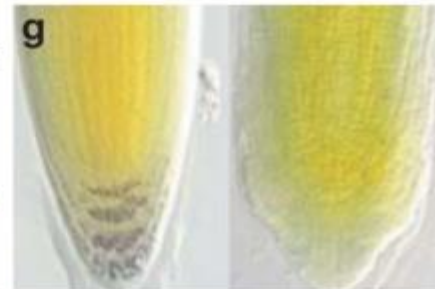
miRNA319



miRNA166



miRNA159a



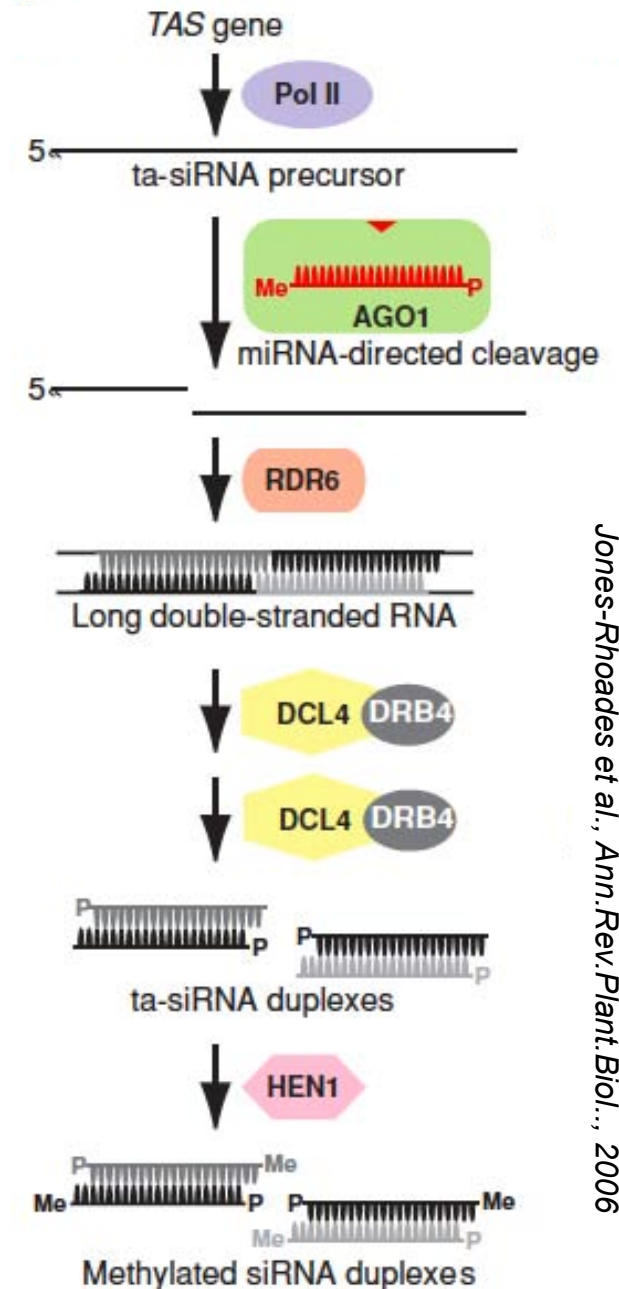
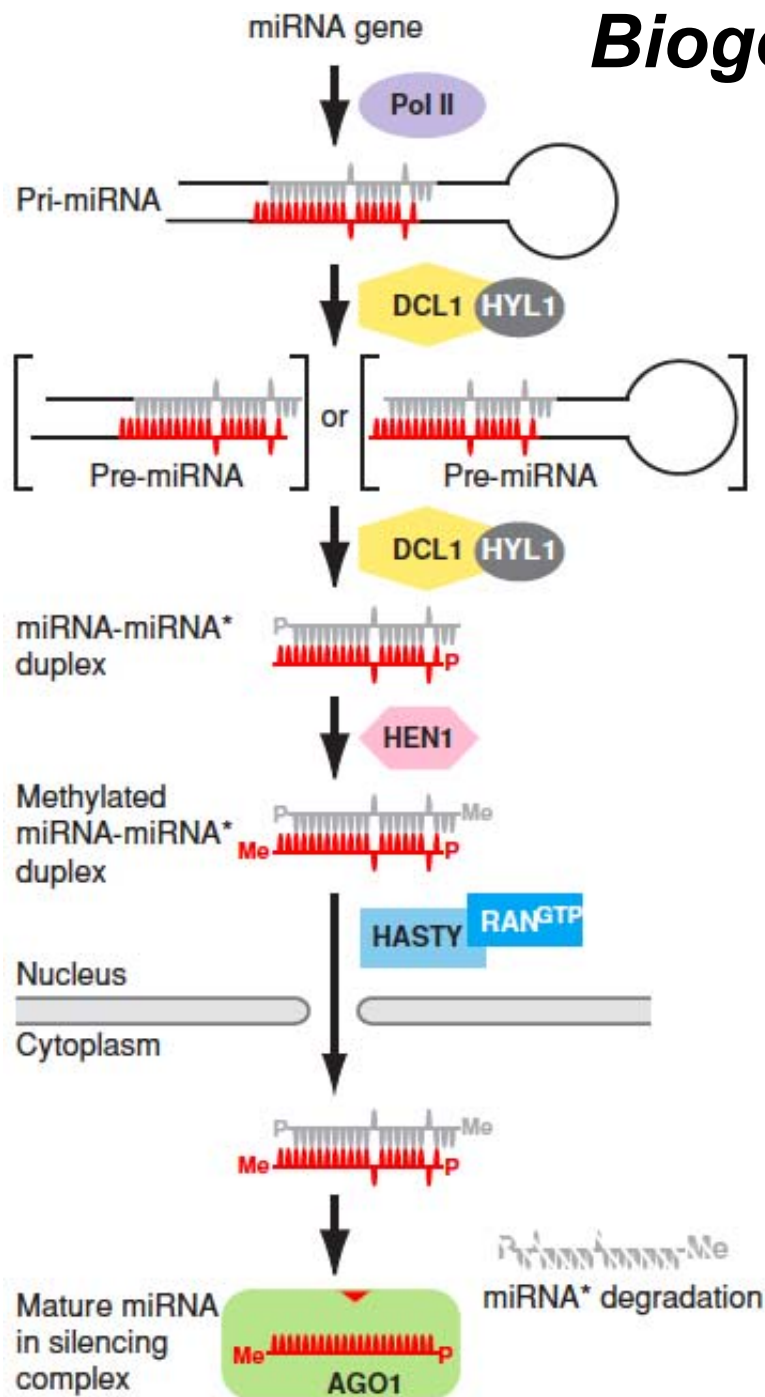
miRNA160

Funkcije miRNA u Arabidopsis

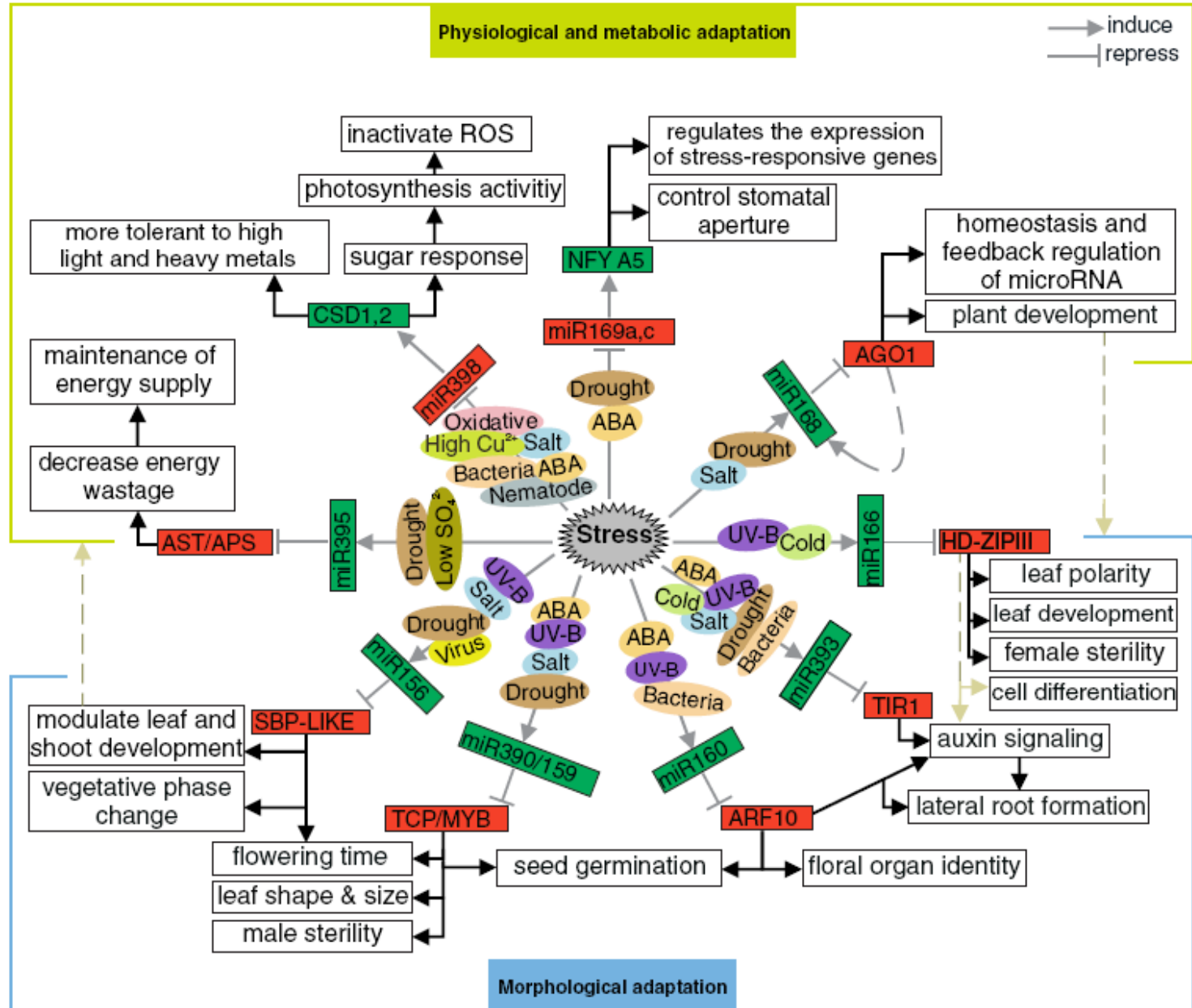
Role	miRNA family	Target families/genes
Auxin signaling	miR160	ARF10
	miR164	NAC1
	miR167	ARF8
	miR390	ARF
	miR393	TIR1/F-box AFB
Leaf development	miR159	MYB
	miR164	NAC1
	miR166	HD-ZIPIII
	miR172	AP2
	miR319	TCP
Leaf polarity	miR166	HD-ZIPIII
	miR168	AGO1
	miR390	ARF
Floral organ identity	miR160	ARF10
	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
Regulation of miRNA	miR399	UBC24/PHO2
	miR408	Plastocyanin
	miR162	DCL1
	miR168	AGO1
	miR403	AGO2
Others	miR158	At1g64100
	miR161	PPR
	miR163	At1g66700, At1g66690
	miR173	At3g28460
	miR174	At1g17050
	miR175	At5g18040, At3g43200, At1g51670
	miR394	F-box

Biogeneza miRNA u roślin



Regulatorowa sieć stresowych miRNA u *Arabidopsis*



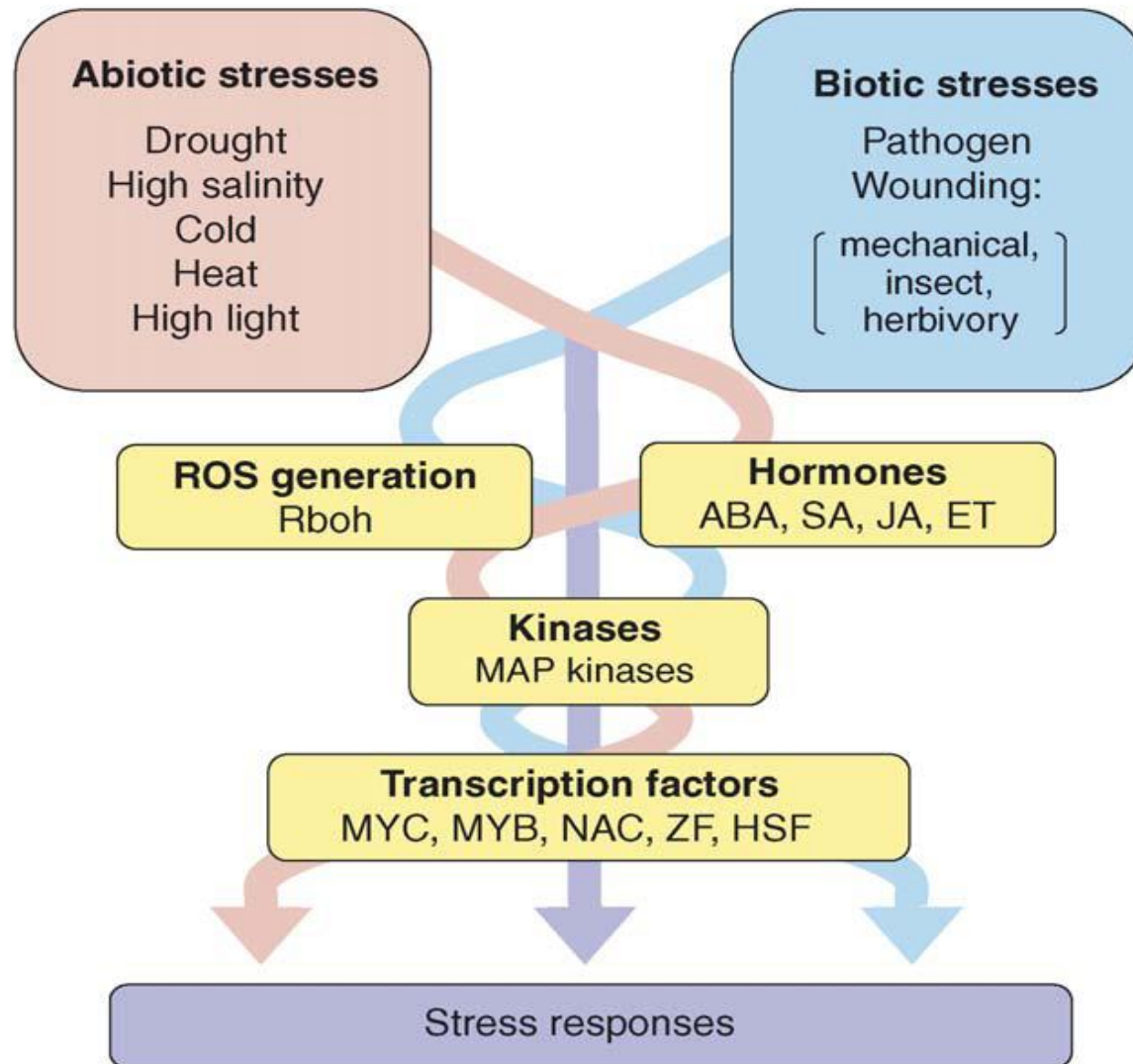
miRNA regulowane przez stres

Biotic stress			Abiotic stress																	
Viral infection			Bacterial infection			Hypoxia stress			ABA stress			Cold stress			Salt stress			Drought stress		
At-miR156	SBP-LIKE		At-miR160	HD-ZIPIII		Zm-miR159	MYB		At-miR319/159	TCP/MYB		At-miR166	HD-ZIPIII		At-miR156	SBP-LIKE		At-miR157	SBP-LIKE	
Ni-miR160	ARF		At-miR167	ARF		Zm-miR166	HD-ZIPIII		At-miR160	ARF		At-miR169	NFY/MiHAP2-1		Zm-miR156	SBP-LIKE		At-miR167	ARF	
At-miR164	NAC		At-miR393	TIR1/AFB		Zm-miR167	ARF		Os-miR167	ARF		At-miR172	AP2-LIKE		At-miR158	PPR		At-miR168	AGO	
Br-miR1885	TIR-NBS-LRR		At-miR398	CSD		Zm-miR171	Spry-2		At- Os -miR169	NFY		At-miR393	TIR1/AFB		Zm-miR162	DCL		At-miR169	NFY	
Br-miR158	PPR		At-miR825	Zinc finger		At-miR395	APS		At-Pv-miR393	TIR1/AFB		At-miR396	GRF		At-miR167	ARF		Os-Mt-miR169	MiHAP2-1	
Nematode infection			At-natsiRNA	TGB2	PPRL	Os-miR396	WRKY		At-miR397	Laccase		At-miR397	Laccase		Zm-miR167	ARF		At-miR171	SCL	
At-miR160	ARF		At-tsiRNAs	AtRAP		Pt-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		At-Zm-miR169	NFY/MiHAP2-1		At- Os -Mt-Pv-miR393	TIR1/AFB	
At-miR167	ARF		Pta-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		Pta-miR160	ARF		Nutrient homeostasis			At-miR417	RDRP		Pt-miR156 _{g-i}	SBP-LIKE		At-miR394	F-box		At-miR397	Laccase	
At-miR396	GRF		Ta-miR156	SBP-LIKE		High N			Pv-miR2118	U170K-related		Pt-miR475 _{a,b}	PPR		At-miR399	TIR1/AFB		Mt-miR398	CSD	
At-miR398	CSD		Ta-miR159	MYB		Low PO ₄ ³⁻			Pv-miR159.2	Chlatri heavy chain		At-miR402	HhH-GPD		Zm-miR395	AST/APS		At-miR408	Plastocyanin	
At-siRNA9	At5g18900		Ta-miR164	NAC		Low SO ₄ ²⁻			Pv-miR1514	PsEMF1-related		Ta-SiRNA 005047_0654_1904.1			At-miR396	GRF		Os-miR156	SBP-LIKE	
At-siRNA32	RC/Helitron		Ta-miR171	SCL		Br-miR160	ARF		Pv-miR2119	ADH1					Zm-miR396	GRF		Os-miR168	AGO	
At-siRNA41	At1g50890		Ta-miR393	TIR1		Br-miR164	NAC		Pp-miR1026	bHLH		Ta-miR156	SBP-LIKE		At-miR397	Laccase		Os-miR172	AP2-LIKE	
At-siRNA46	At1g72860		Ta-miR396	GRF		Br-miR394 _{a-c}	F-box		UV-B radiation			Ta-miR159	MYB		At-miR398	CSD		Os-miR319	TCP	
Symbiotic nitrogen fixation			Oxidative stress			At-miR395	AST/APS		At-Pv-miR156	SBP-LIKE		Ta-miR166	HD-ZIPIII		Pt-miR482.2	DRP		Os-miR396	GRF	
Gm-miR159	MYB		At-miR398	CSD		At-miR396	Laccase		At-miR159	MYB		Ta-miR168	AGO		Pt-miR1450	L-RTMK		Os-miR397	Laccase	
Gm-miR160	ARF		Mechanical stress			At-miR397	Laccase		At-Pv-miR160	ARF		Ta-miR169	MiHAP2-1		Pt-miR171 _{f-m}	SCL		Os-miR408	Plastocyanin	
Gm-miR164	NAC		Pt-miR156	SBP-LIKE		At-miR408	PCL		At-Pv-miR166	HD-ZIPIII		Ta-miR172	AP2-LIKE		Pt-miR530a _{a-e}	Zinc knuckle (CCHC-type)		Pt-miR1446 _{a-g}	GRML	
Gm-miR166	HD-ZIPIII		Pt-miR162	DCL		At-miR857	Laccase		At-Pv-miR167	ARF		Ta-miR393	TIR1		Pt-miR530a	Zinc knuckle (CCHC-type)		Pt-miR1444 _a	Polyphenol oxidase	
Gm-miR168	AGO		Pt-miR164	NAC		Heavy metal (Cd ²⁺)			At-Pv-miR168	AGO		Ta-miR827	Unknown		Pt-miR1445	DHPM		Pt-miR1447	Ankyrin repeat	
Gm-miR169	MiHAP2-1		Pt-miR408	Plastocyanin		Br-miR160	ARF		Pv-miR168	NFY/MiHAP2-1		Ta-SiRNA 002061_0636_3054.1			Pt-miR1446 _{a-g}	GRML		Pt-miR1450	L-RTMK	
Gm-miR172	AP2-LIKE		Pt-miR475	PPR		Br-miR164	NAC		At-miR171	SCL		Ta-SiRNA 005047_0654_1904.1			Pt-miR1447	Ankyrin repeat		Pv-miR2118	U170K-related	
Gm-miR393	TIR1		Pt-miR480	PDOT		Br-miR394 _{a-c}	F-box		At-miR172	AP2-LIKE		Ta-SiRNA 080621_1340_0098.1			Pv-miR159.2	Chlatri heavy chain		Pv-miR159.2	Chlatri heavy chain	
Gm-miR396	GRF		Pt-miR481	Unknown		Os-miR602	XET		At-miR393	TIR1/AFB					SRO5-P5CDH-natsiRNA	P5CDH		Ta-SiRNA 002061_0636_3054.1		
Gm-miR482	Gm12g28730					Os-miR604	WAK-LIKE		At-miR396	CSD								Ta-SiRNA 005047_0654_1904.1		
Gm-miR1521	Gm08g12340								At-miR401	Unknown								Ta-SiRNA 007927_0100_2975.1		
Mt-miR169	MiHAP2-1																			

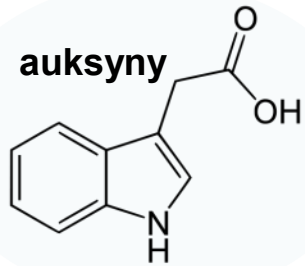
zielone – miRNA o podwyższonej ekspresji
czerwone – miRNA o obniżonej ekspresji

2. Odpowiedź na stres

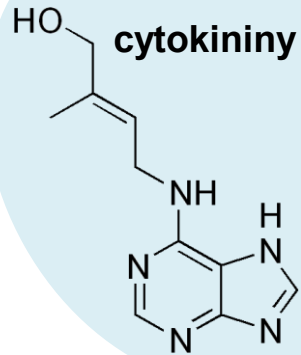
Połączenie sieci sygnałowych odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny



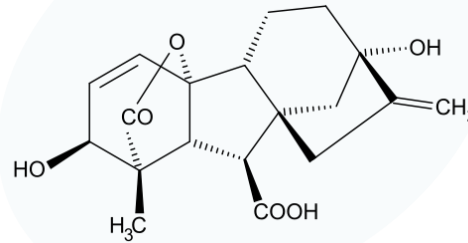
Fitohormony



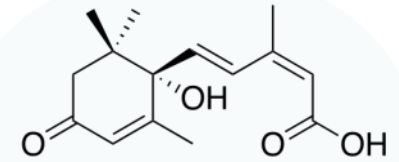
auksyny



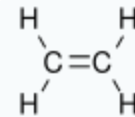
cytokininy



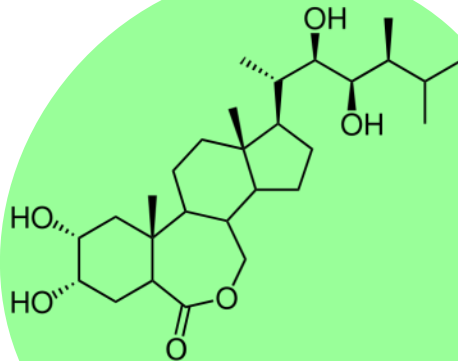
gibereliny



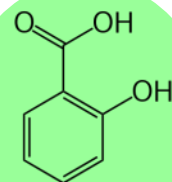
kwasy abscysynowe



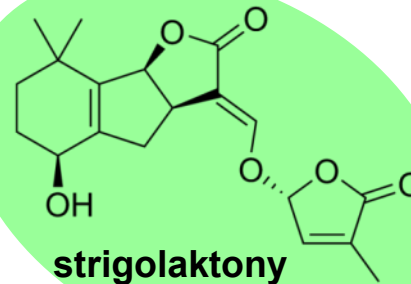
etylen



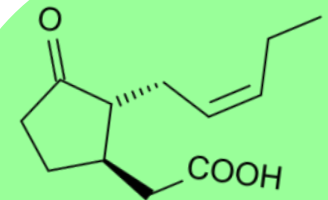
brasinosteroidy



salicylany

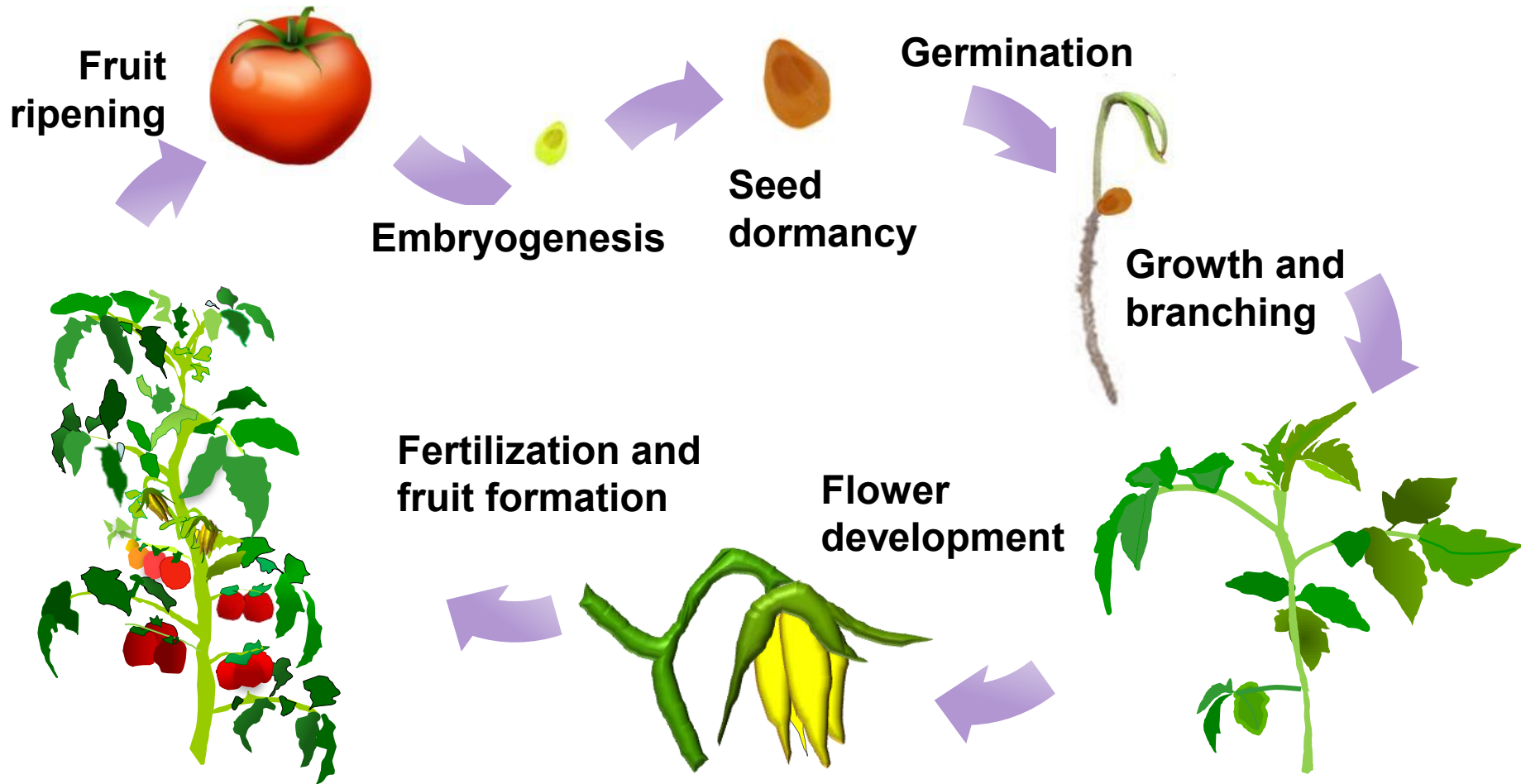


strigolaktony

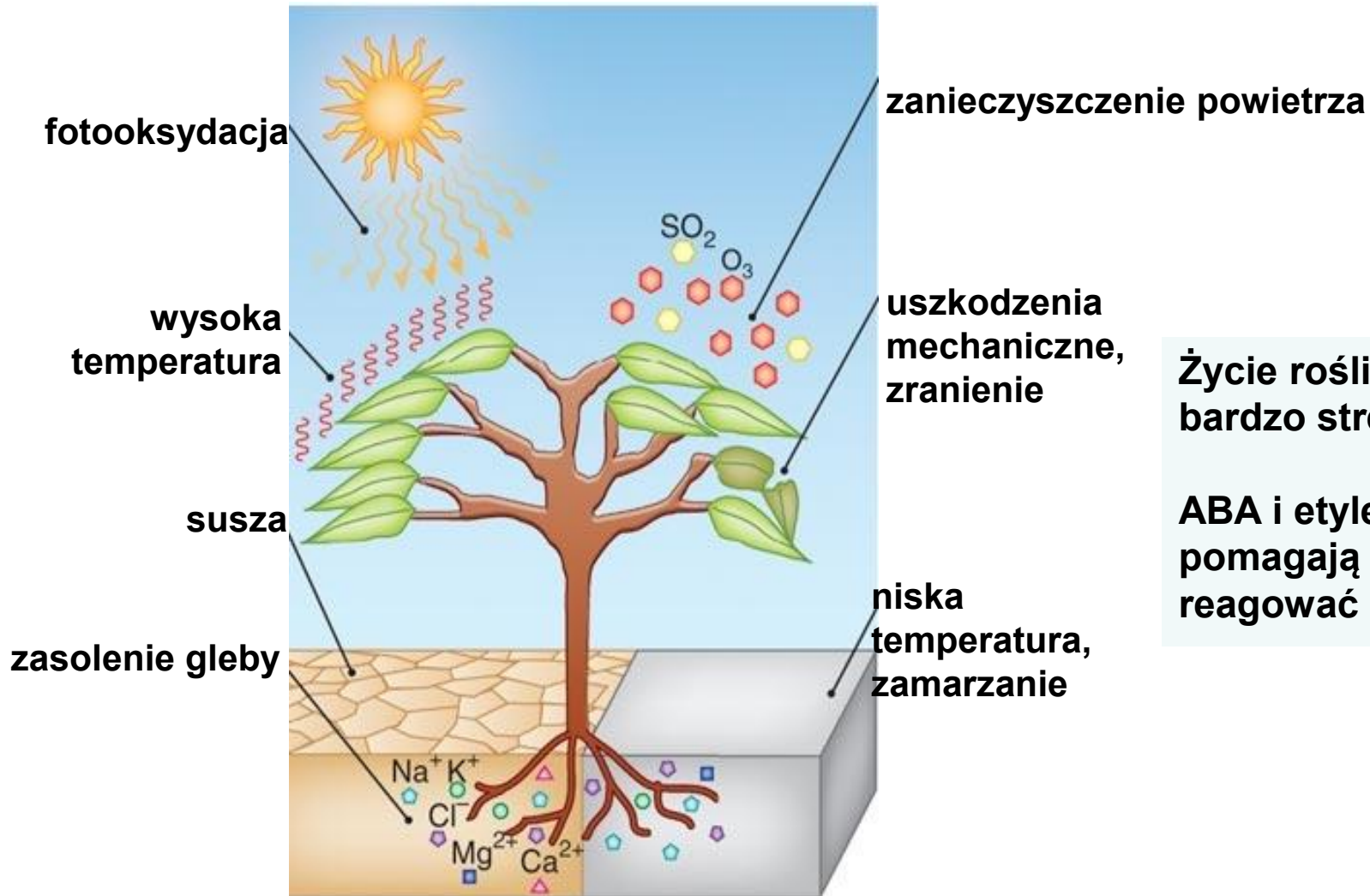


jasmoniany

Fitohormony regulują wszystkie etapy cyklu życiowego roślin



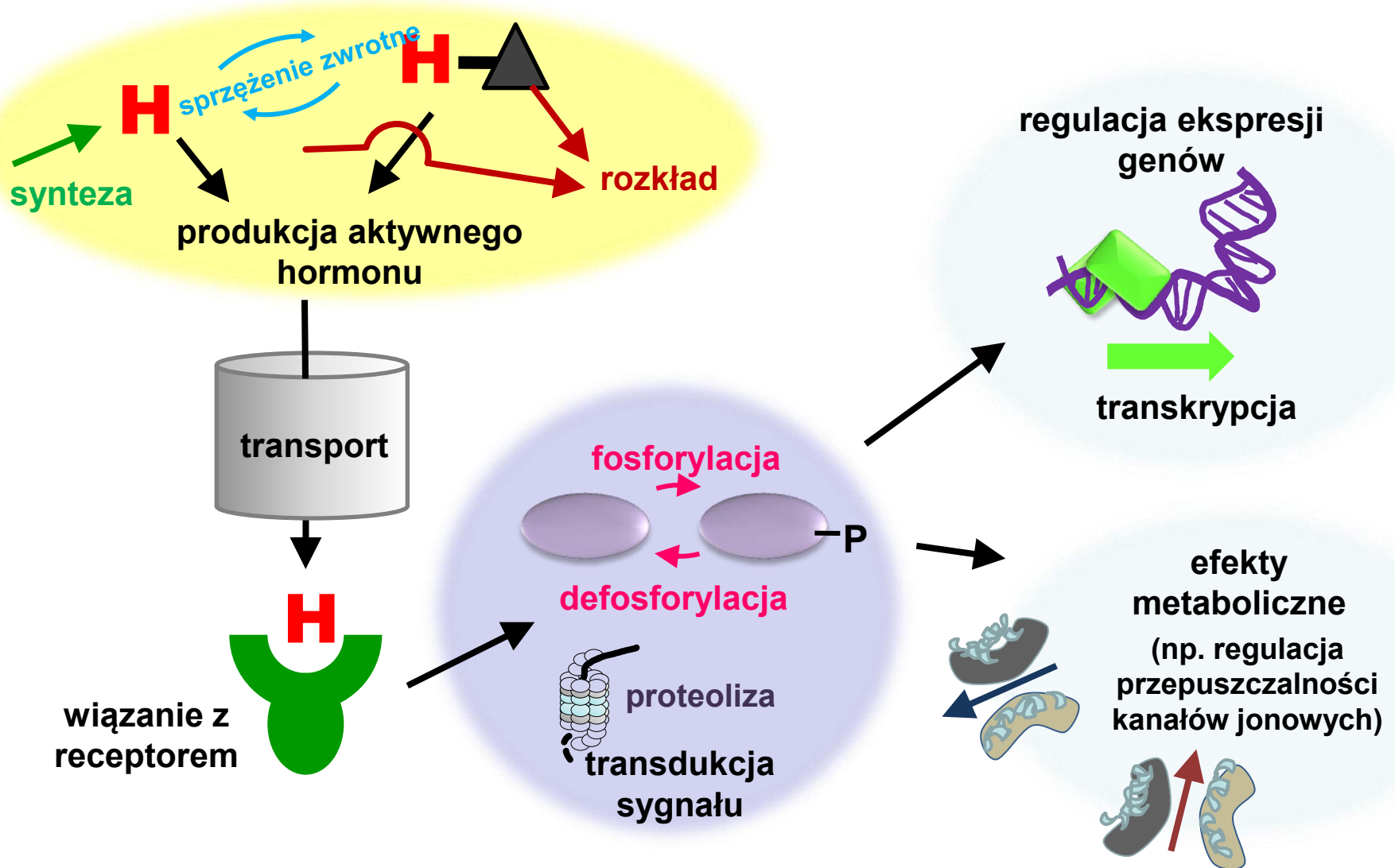
Stres abiotyczny



Życie roślin jest bardzo stresujące.....

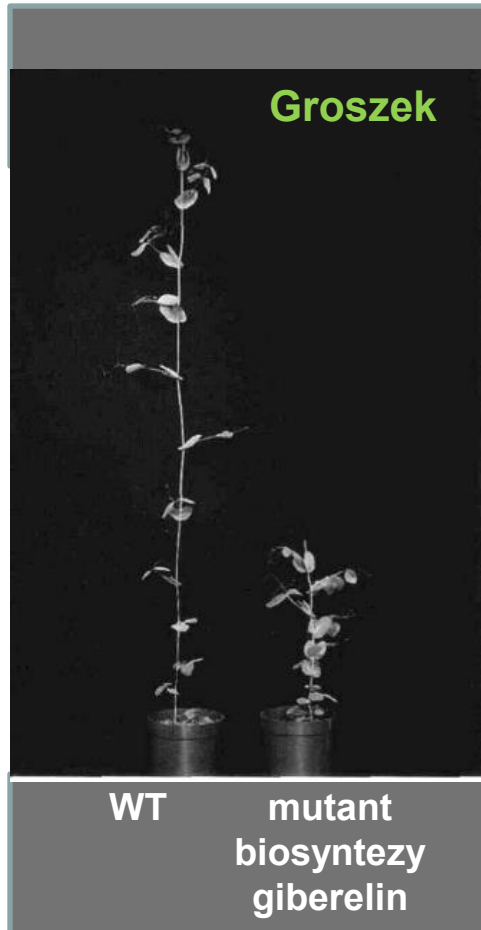
ABA i etylen pomagają roślinom reagować na stres.

Fitohormony: synteza, szlak sygnałowy i odpowiedź

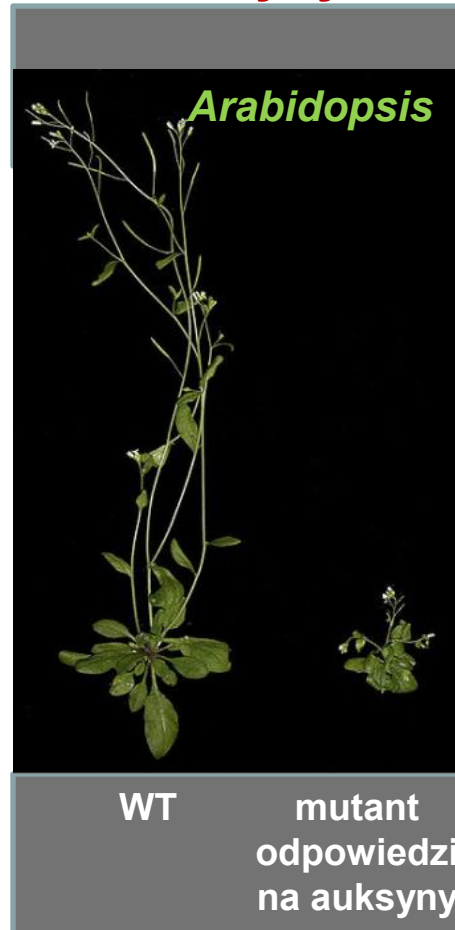


Mutanty syntezy lub odpowiedzi hormonalnej: zaburzenia wzrostu i rozwoju

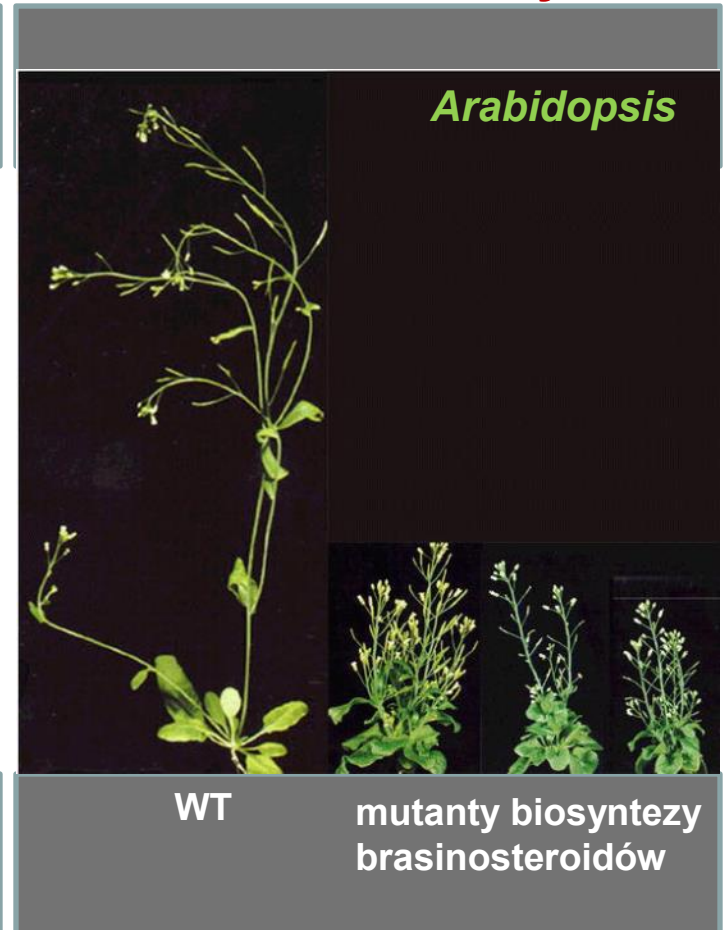
GA



Auksyny



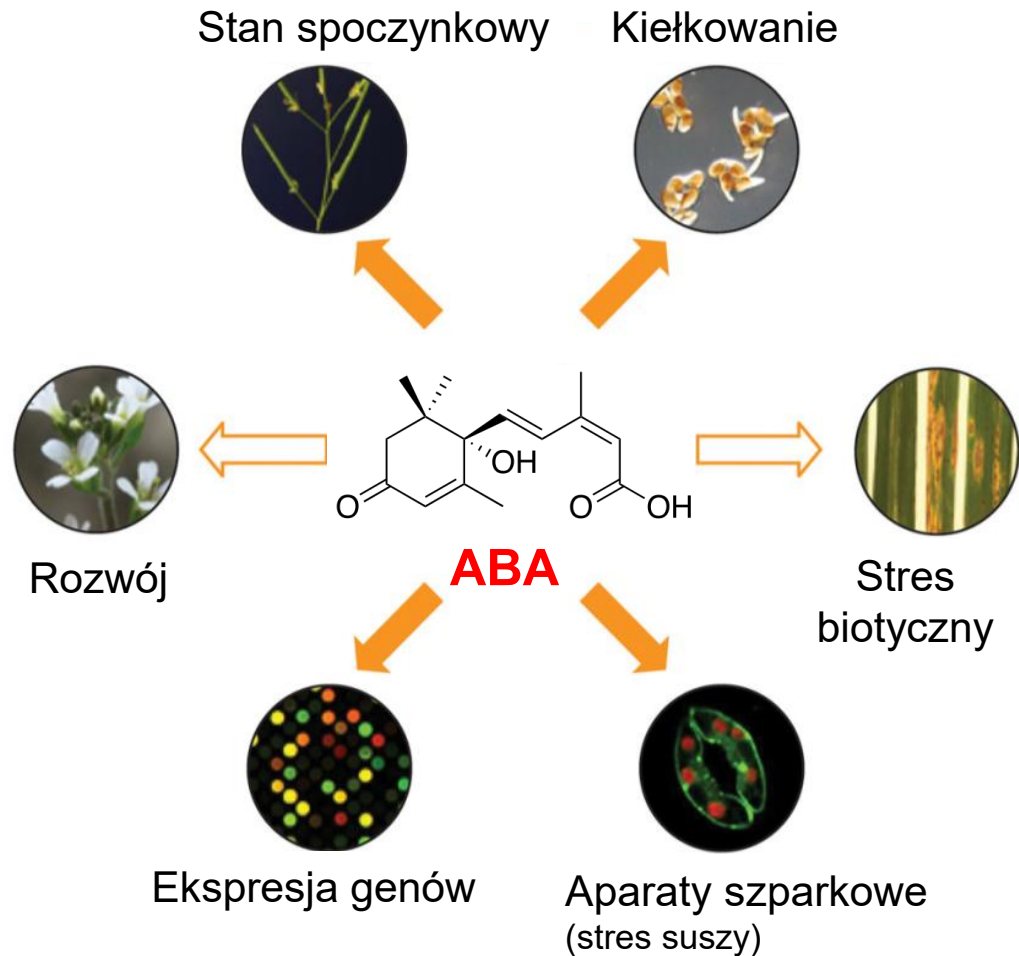
Brasinosteroidy



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

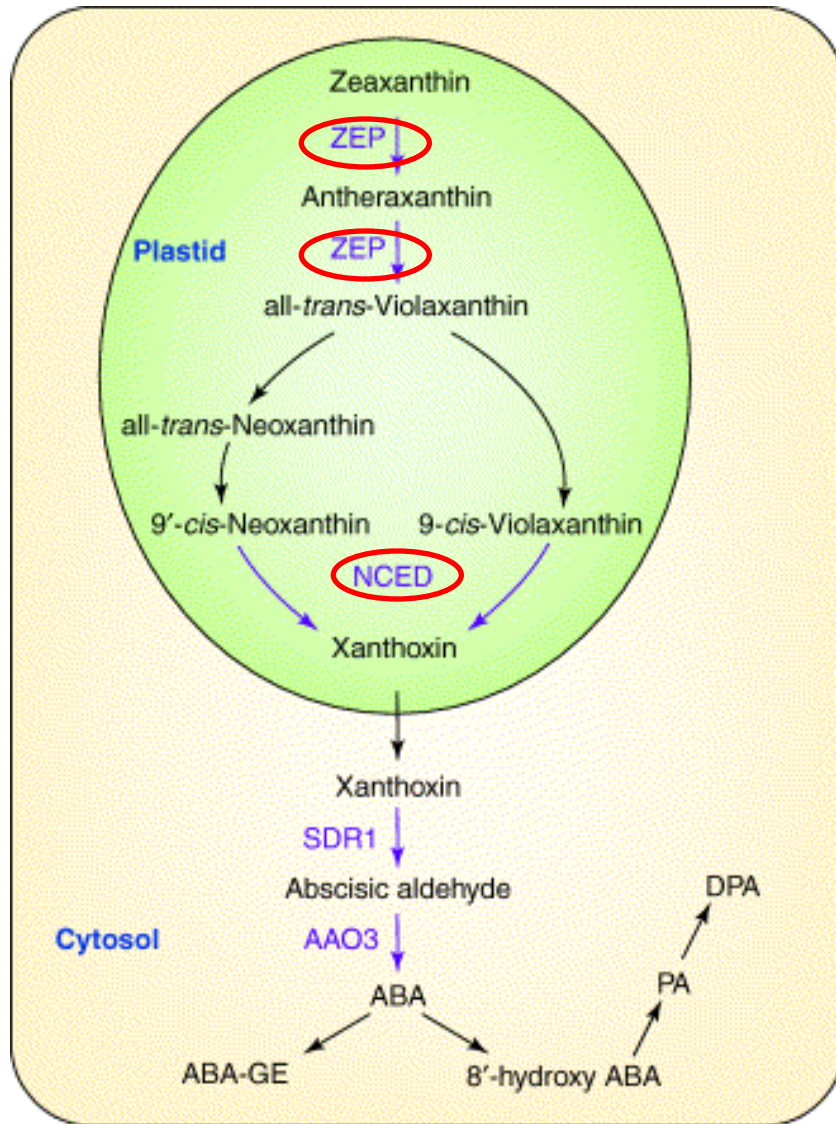
Kwas abscysynowy (ABA)

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.**

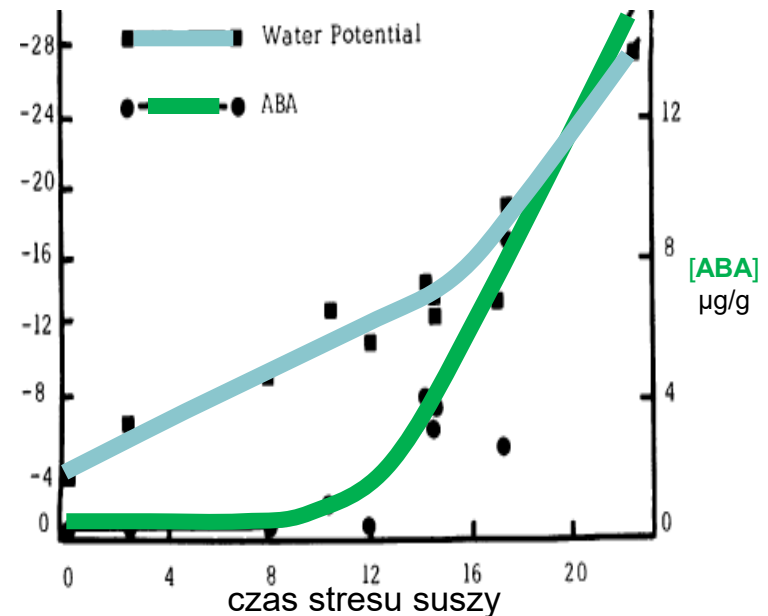
Szlak biosyntezy ABA jest precyzyjnie regulowany



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

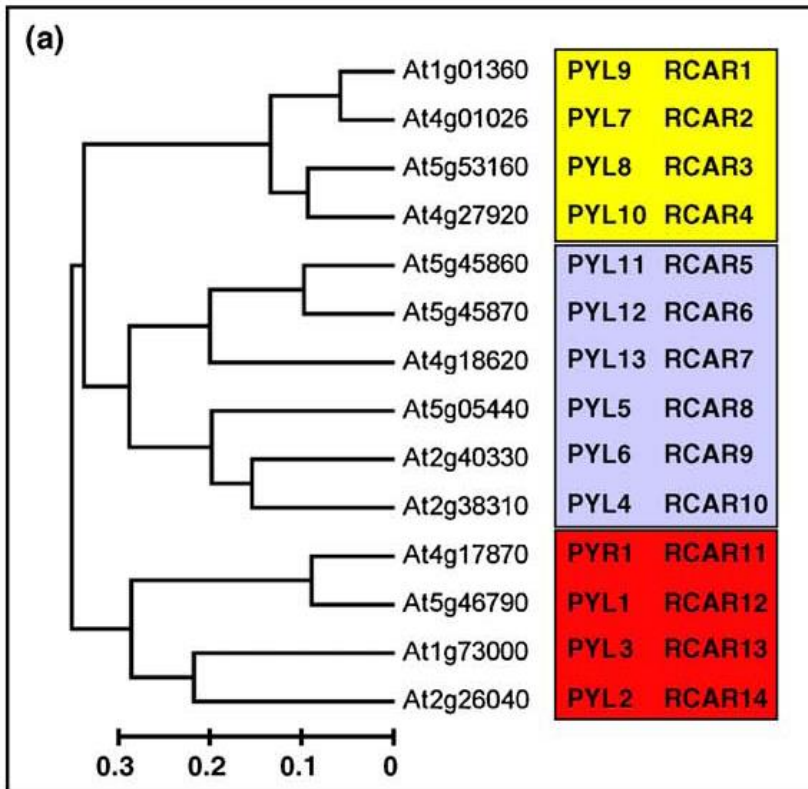
Kluczowe etapy biosyntezy ABA zależą od ekspresji regulowanych genów, co umożliwia kontrolę poziomu ABA w komórce i szybką odpowiedź na zmiany środowiska.

Synteza ABA jest indukowana podczas odpowiedzi na stres



Receptory ABA: PYR/PYL/RCARs

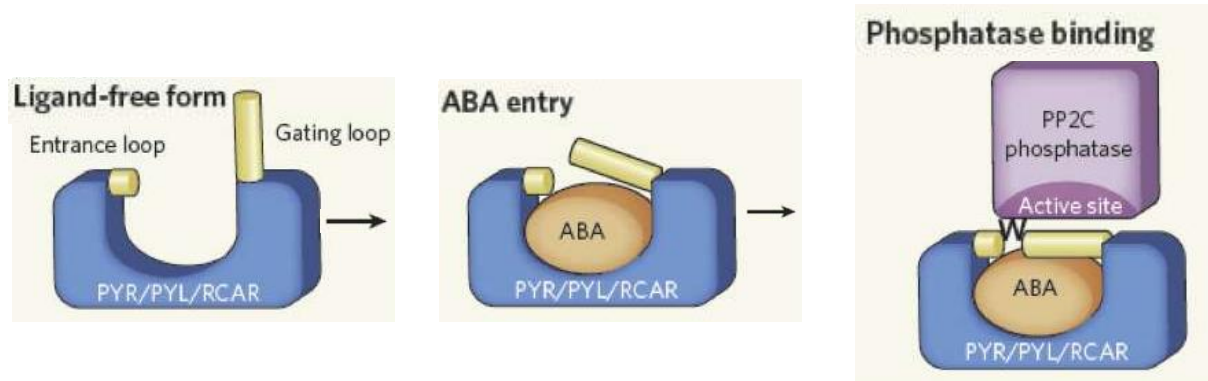
14 PYR/RCARs w *Arabidopsis*



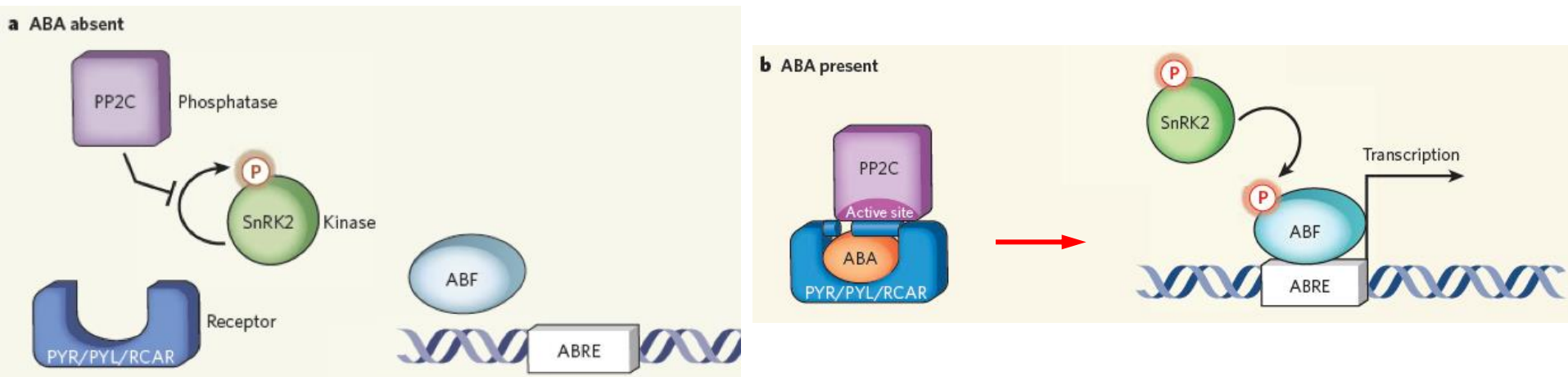
Common Name	Species	Number of genes
Soja	<i>Glycine max</i>	23
Kukurydza	<i>Zea mays</i>	20
Topola	<i>Populus trichocarpa</i>	14
Ryż	<i>Oryza sativa</i>	11
Winogrono	<i>Vitis vinifera</i>	8
Sorgum	<i>Sorghum bicolor</i>	8
Strączkowe	<i>Medicago truncatula</i>	6
Rzodkiewnik	<i>Arabidopsis thaliana</i>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

ABA aktywuje ekspresję genów odpowiedzi na stres

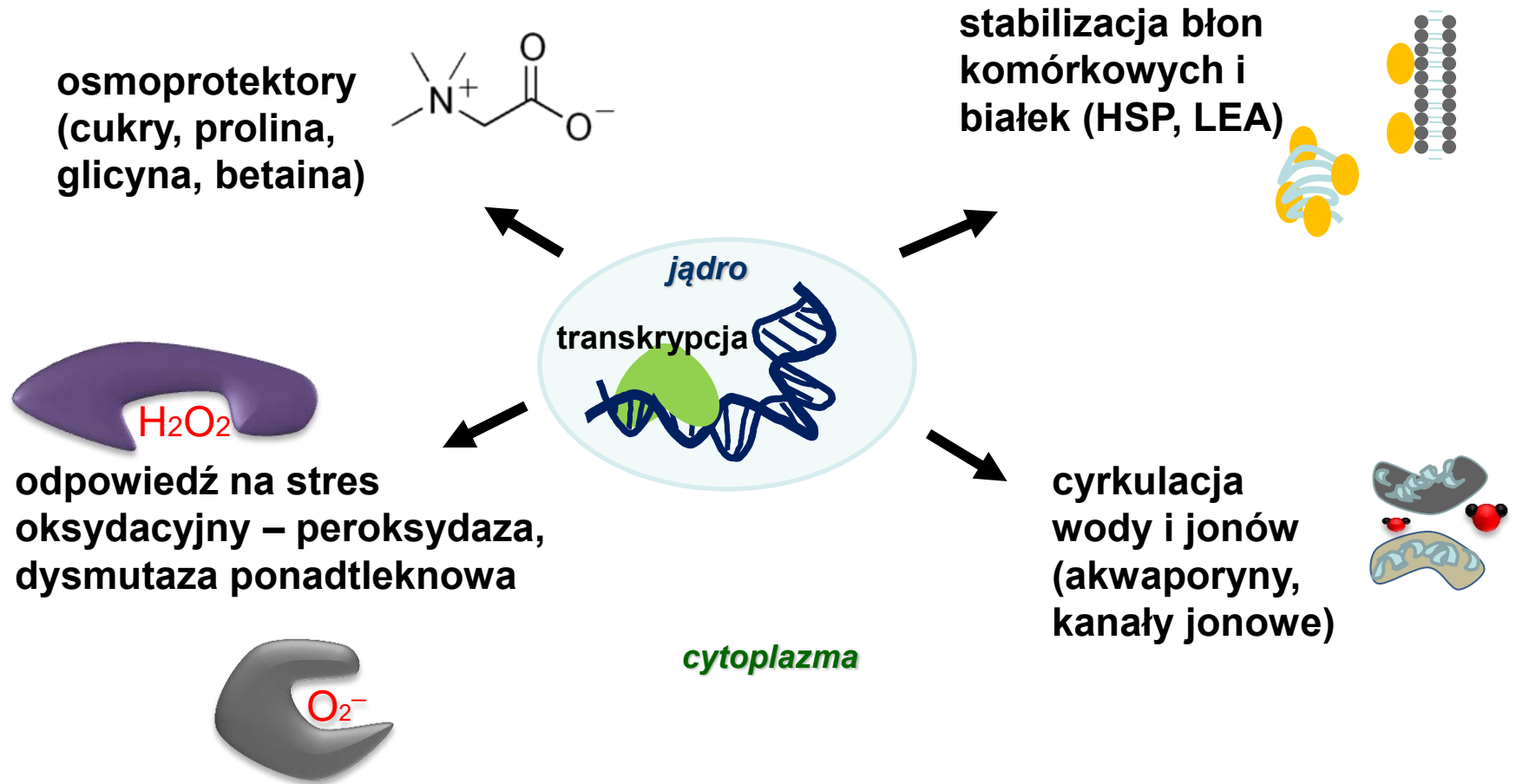
Wiązanie **ABA** do receptorów (**PYL1**) umożliwia wiązanie i inhibicję fosfatazy **PP2C**.



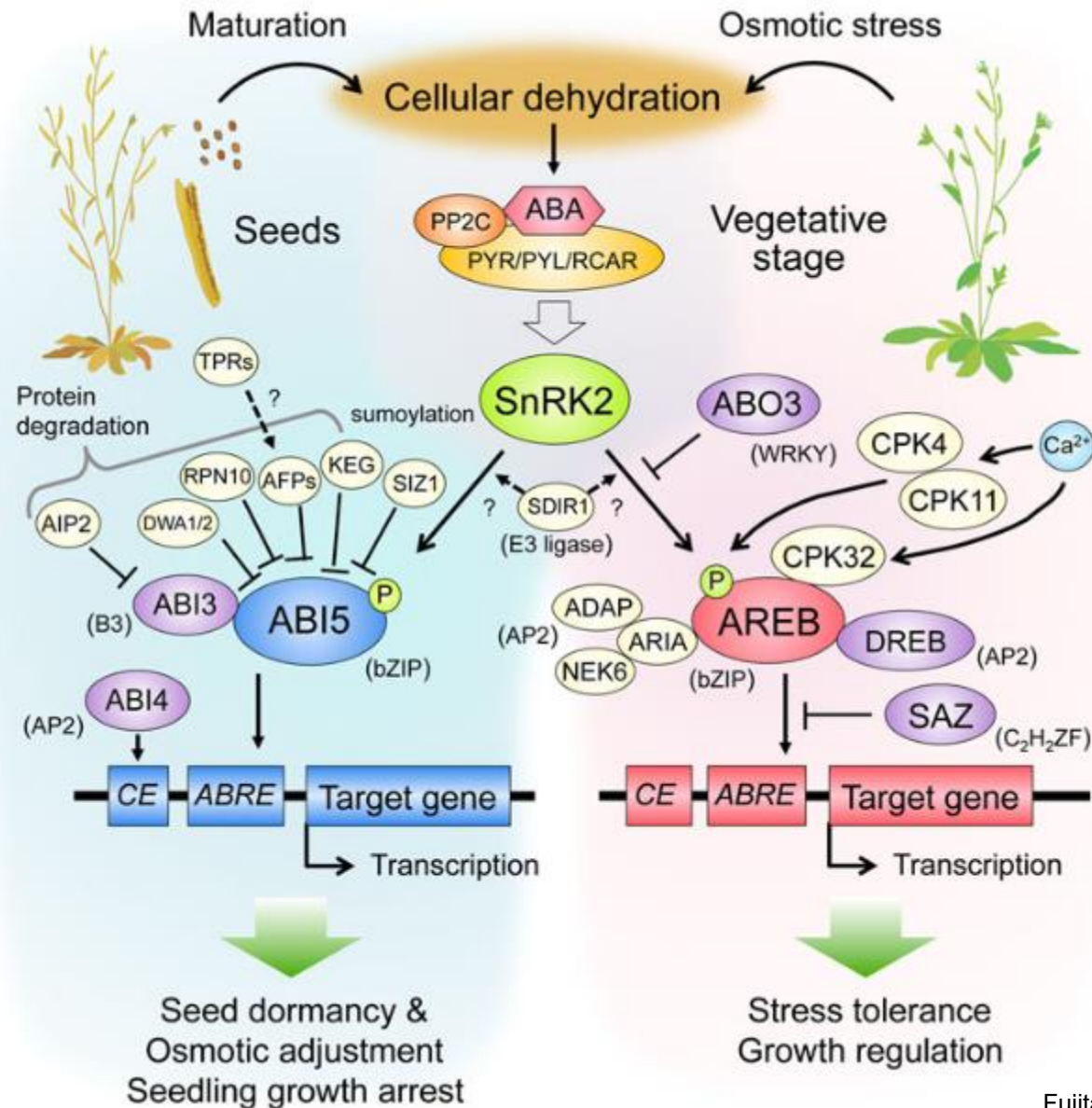
Inaktywacja **PP2C** w obecności **ABA** → fosforylacja białek przez kinazy **SnRK** → aktywacja czynników transkrypcyjnych → ekspresja genów zależnych od **ABA**



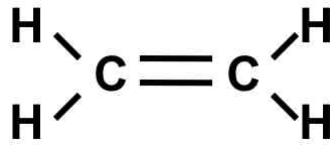
ABA aktywuje ekspresję genów odpowiedzi na stres



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



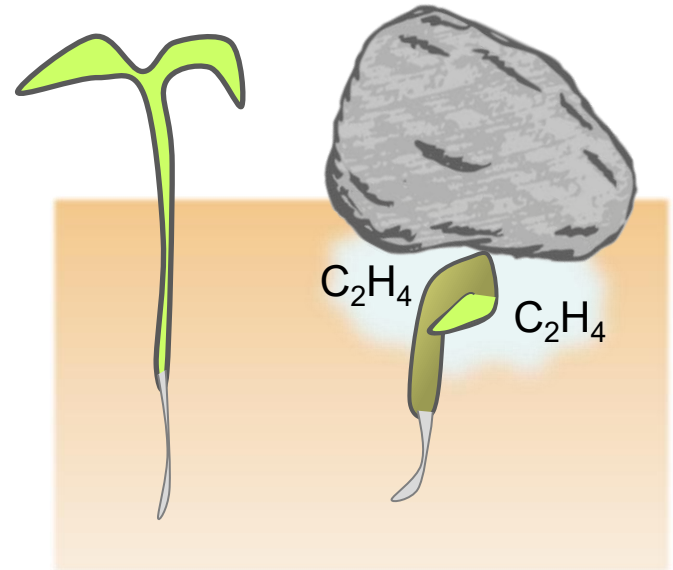
Etylen (C_2H_4)



- 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 hipokotyłu
- tworzenie tzw. haka wierzchołkowego



Zahamowanie
rozwoju liści



Zahamowanie
rozwoju siewki



Zahamowanie
wzrostu korzenia

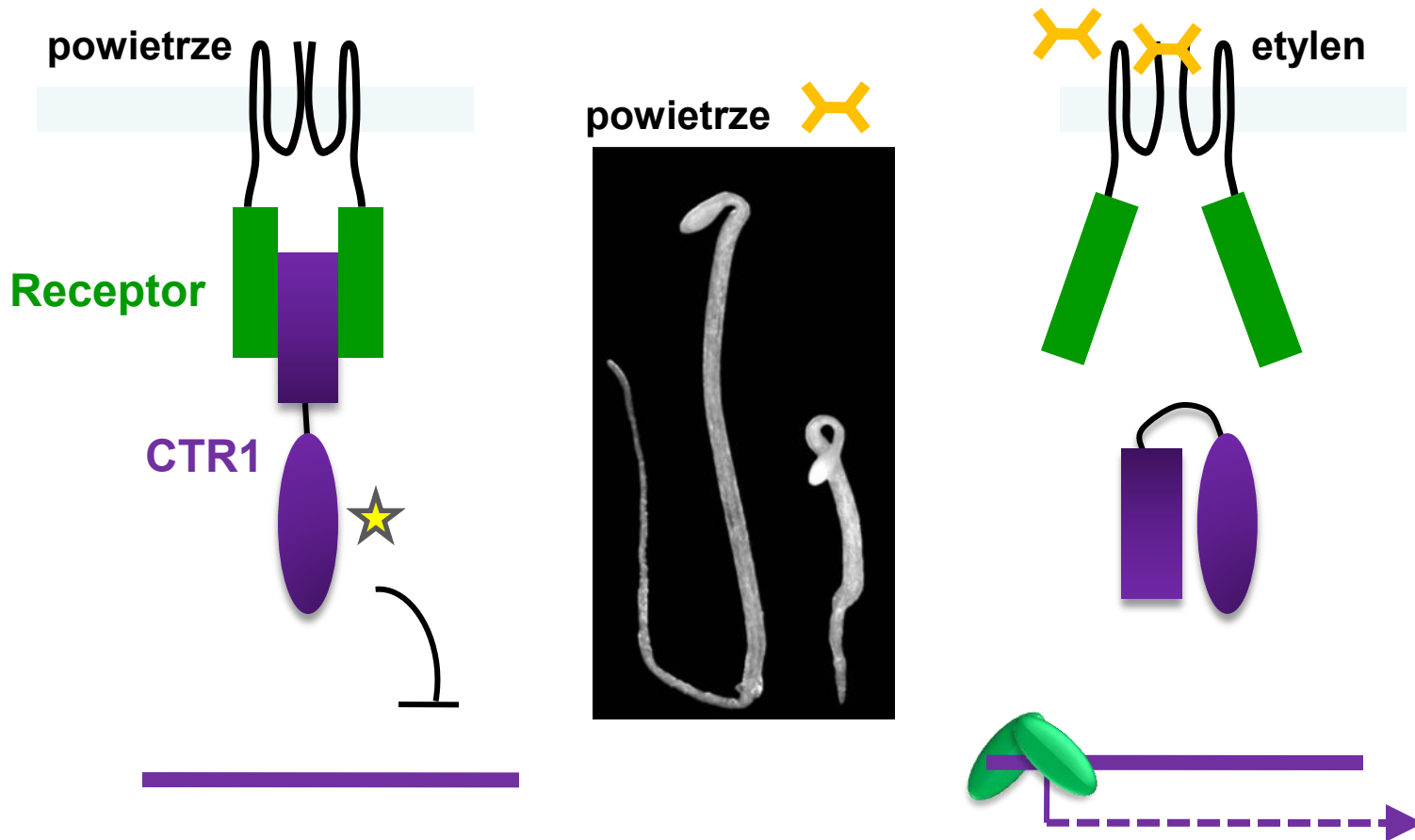


Przyspieszone starzenie

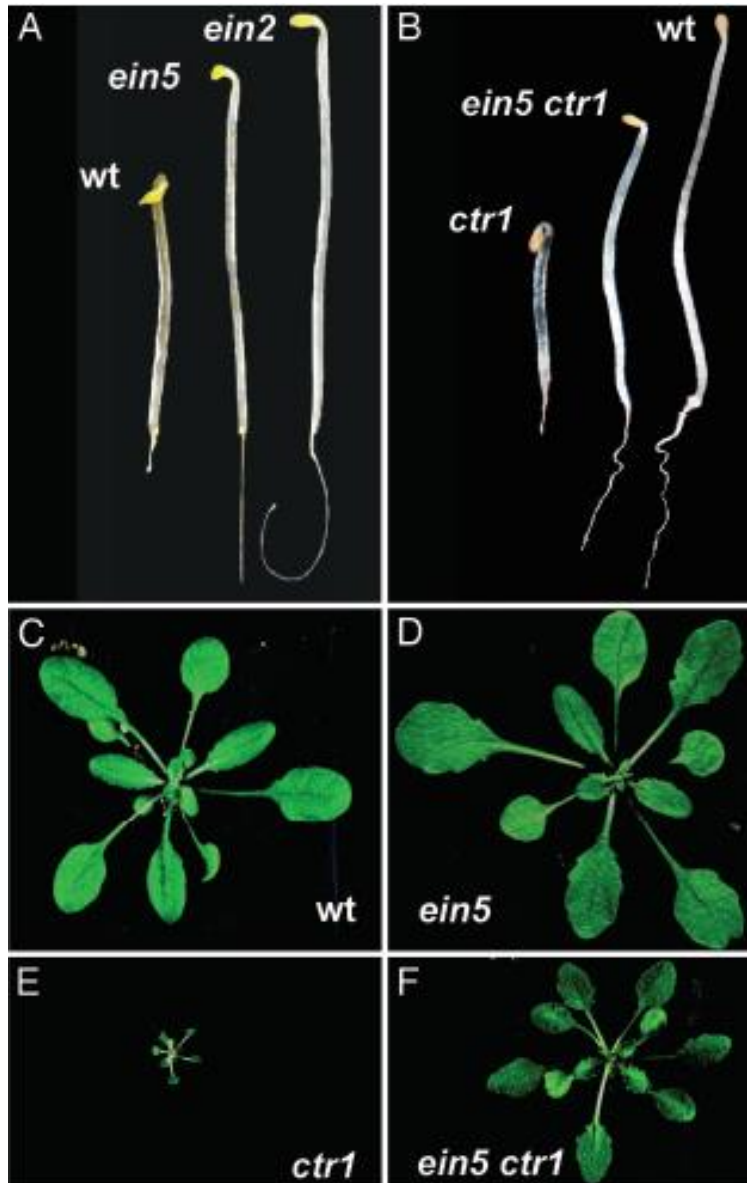
Regulacja ekspresji genów zależnych od etylenu

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

Związywanie etylenu z receptorem uwalnia CTR1, umożliwiając transkrypcję.



Mutanty szlaku odpowiedzi na etylen

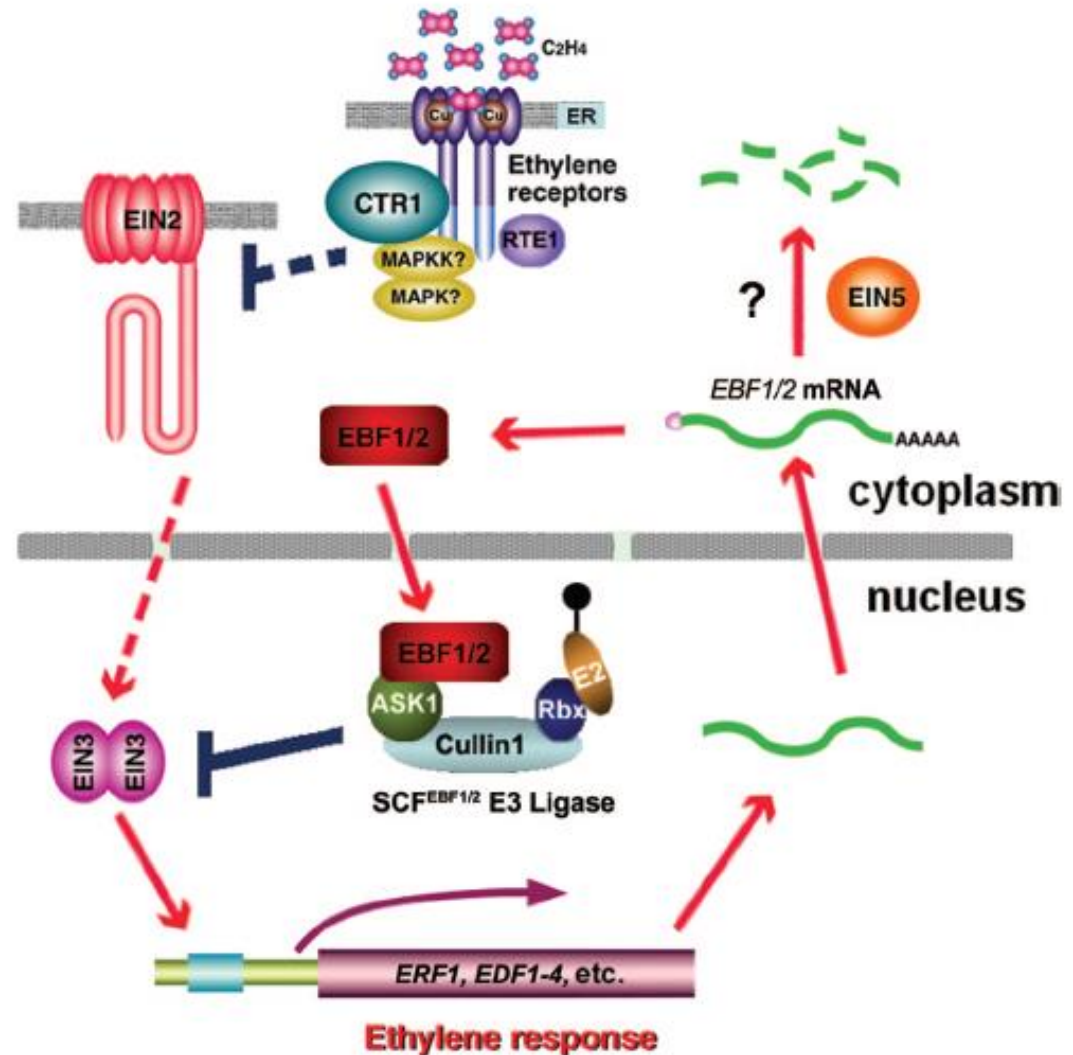


- mutacja **ein5** – brak wrażliwości na wysokie stężenie etylenu
- mutacja **ctr1** – fenotyp konstytutywnej potrójnej odpowiedzi
- podwójny mutant **ein5/ctr1** – częściowe odwrócenie fenotypu *ctr1*

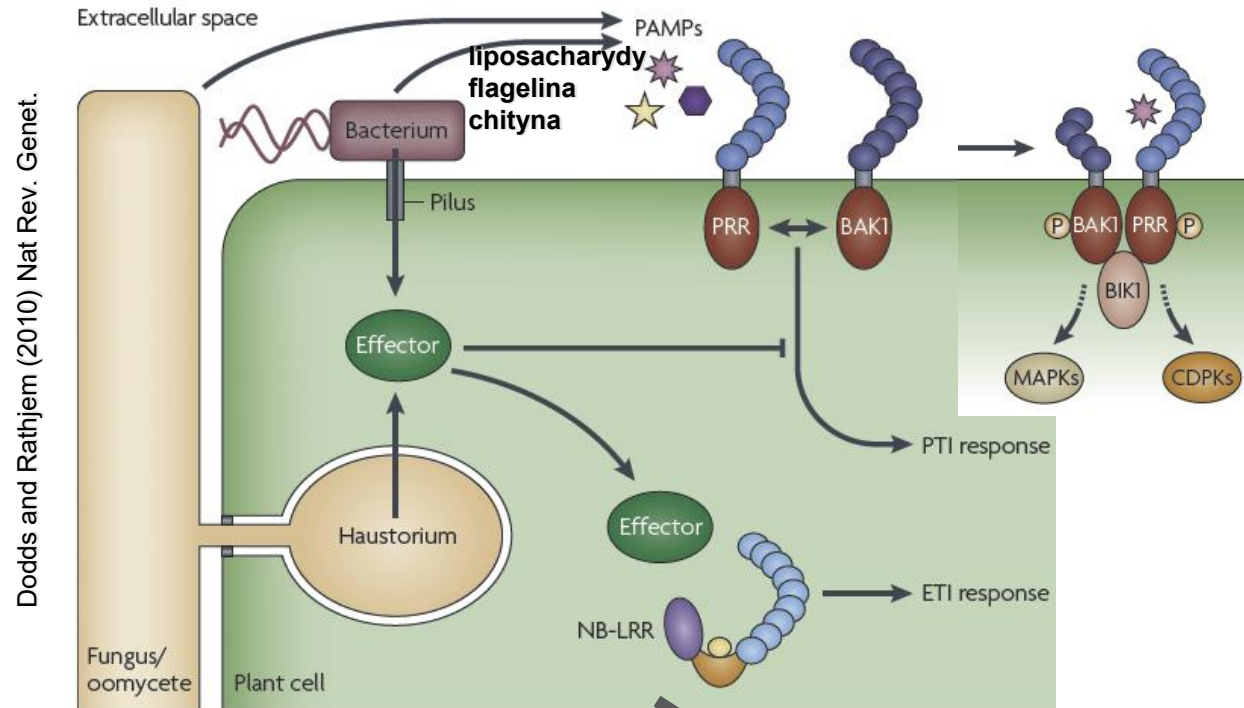
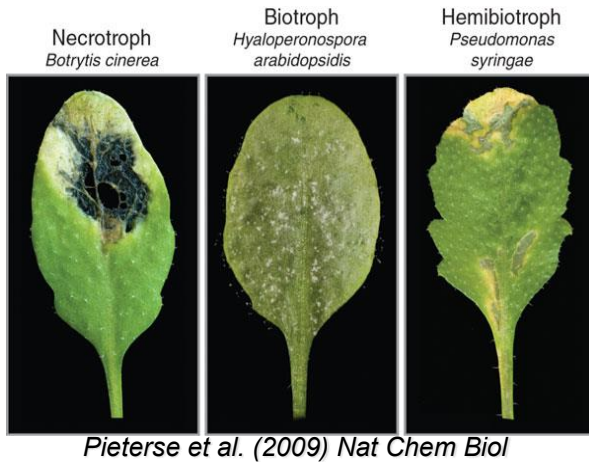
Rola EIN5 w szlaku transdukcji sygnału etylenowego

EIN5 został zidentyfikowany jako egzorybonukleaza *AtXRN4*

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



3. Obrona przed patogenami: grzyby, bakterie



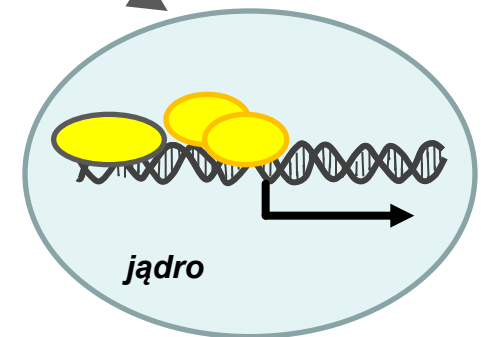
PAMP

pathogen-associated molecular patterns

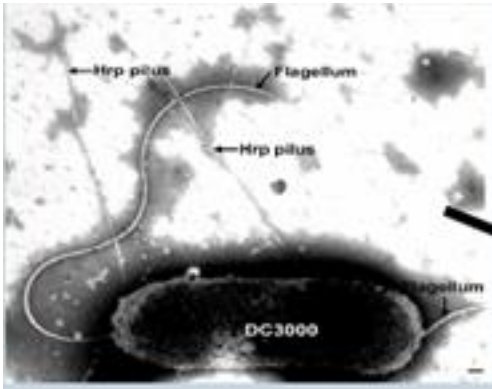
Cząsteczki uwalniane przez patogeny do przestrzeni międzykomórkowej rośliny są rozpoznawane przez receptory PRR i wywołują odpowiedź odpornościową. Niektóre receptory są transportowane do jądra, gdzie oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi aktywując ekspresję specyficznych genów.

Odpowiedź rośliny na infekcję patogenem: zmiany transkrypcji

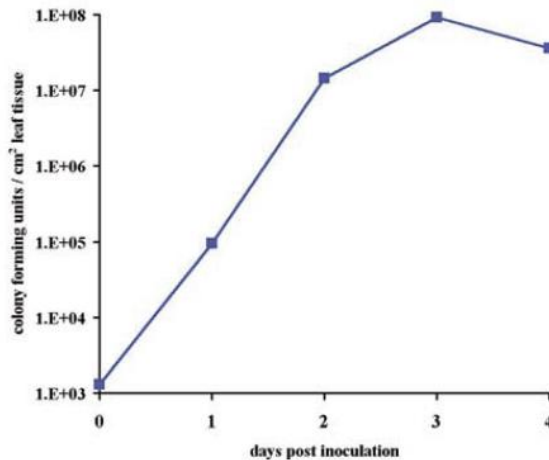
- **synteza hormonów stresu**
- **ekspresja genów PR (pathogenesis-related)**
- **synteza związków antybiotycznych (m.in. fitoaleksyn)**
- **produkcja reaktywnych form tlenu (ROS)**
- **synteza kalozy**



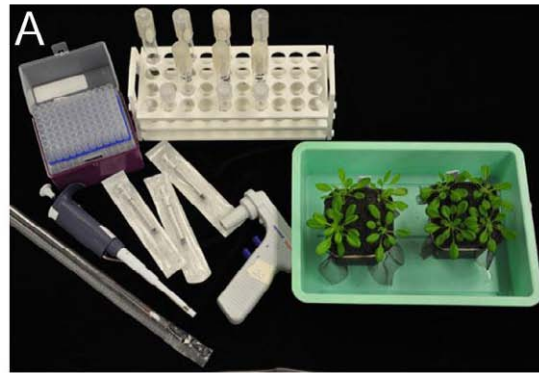
Pseudomonas syringae: modelowy patogen roślinny



Pseudomonas syringae



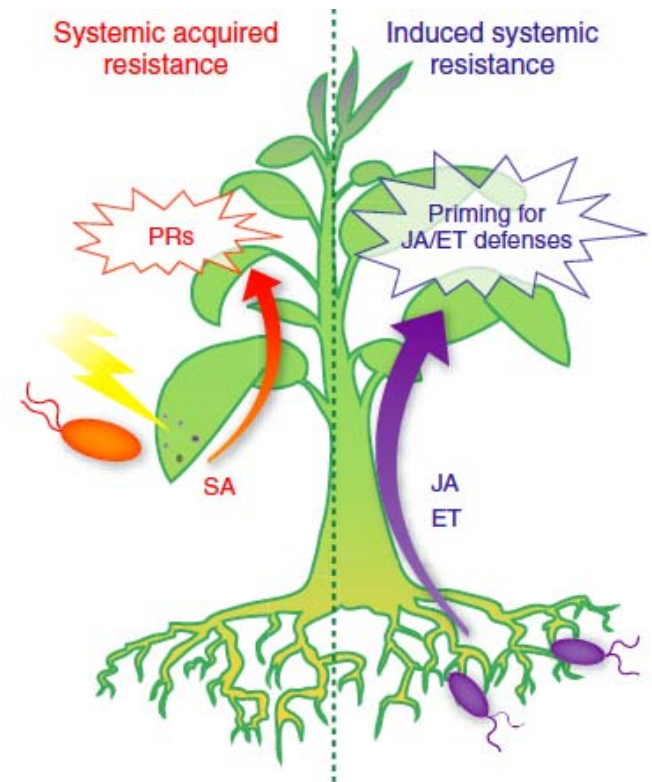
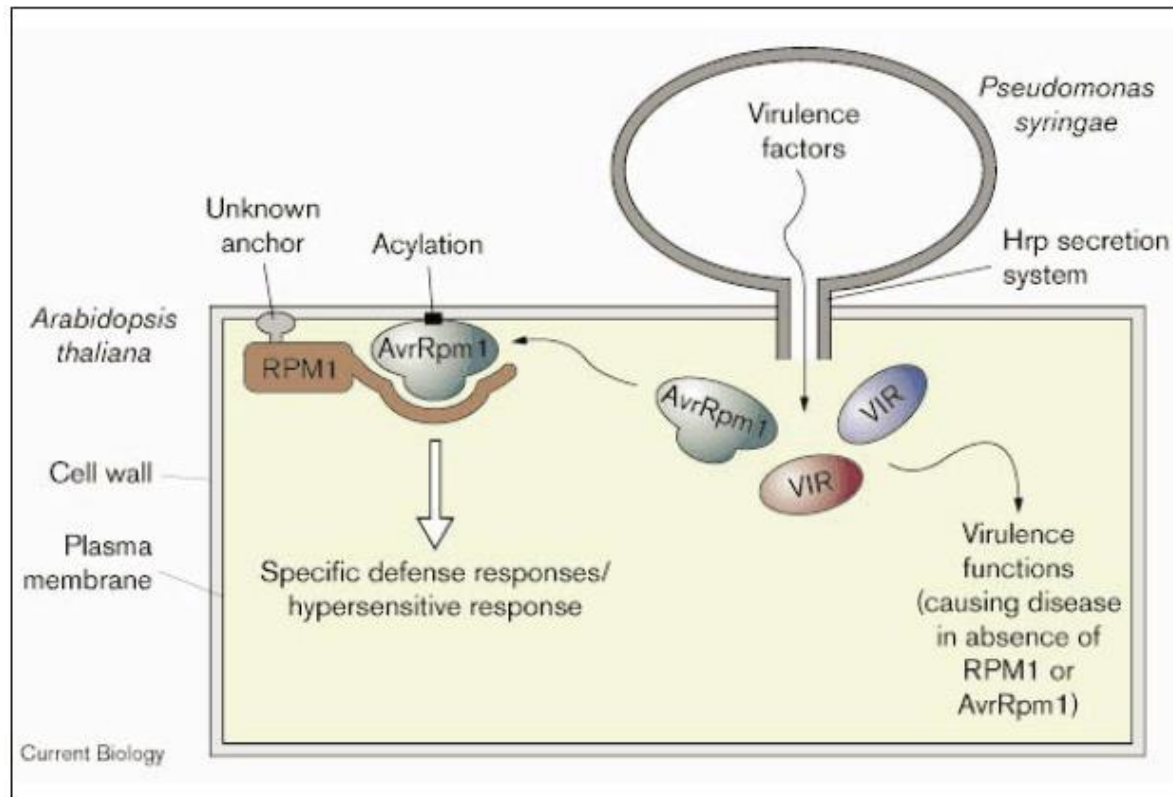
Krzywa wzrostu bakterii *P. syringae*
wyizolowanych z liści *A. thaliana* po infekcji



Arabidopsis thaliana infektowana
Pseudomonas syringae

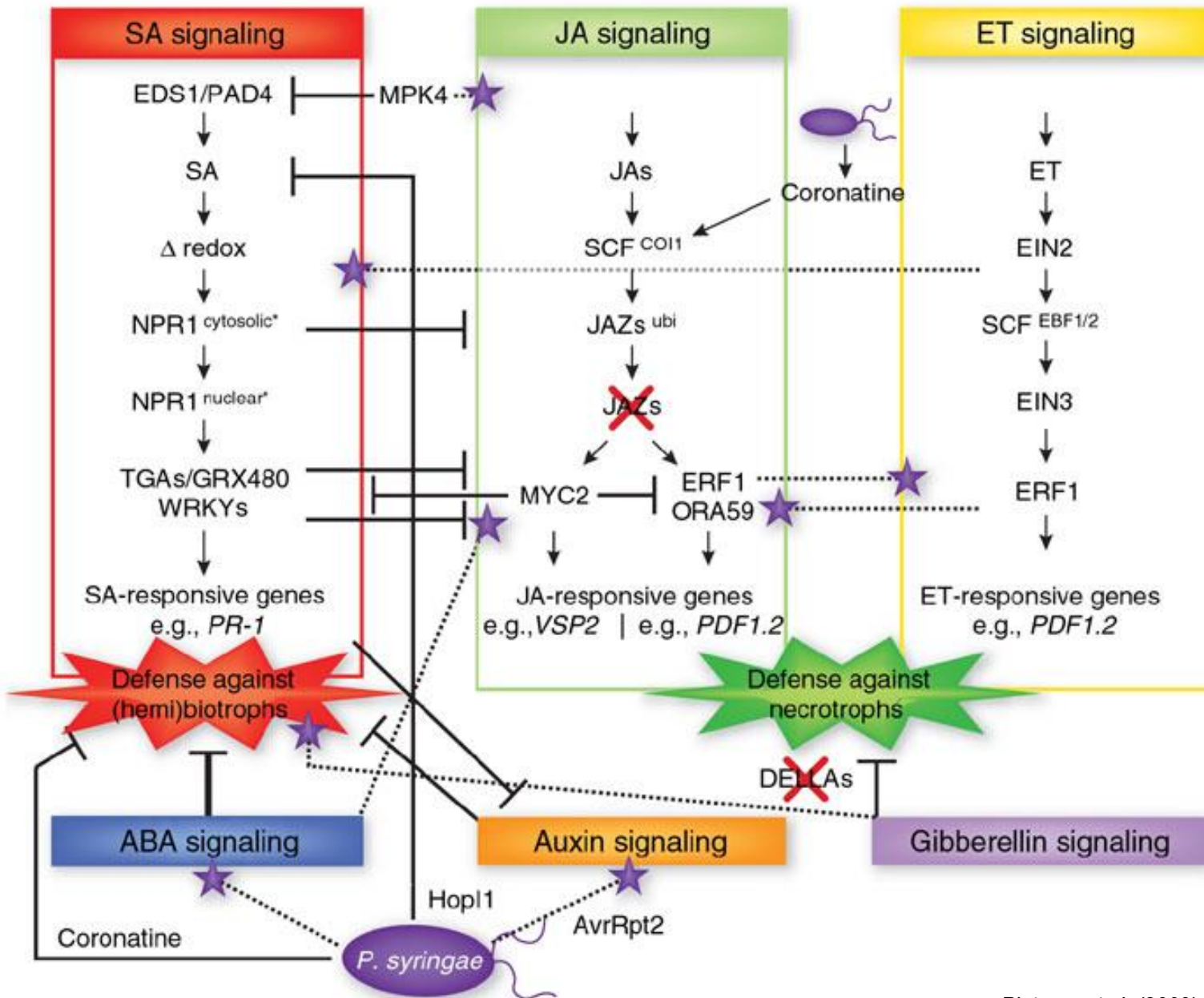


Pseudomonas syringae: modelowy patogen roślinny



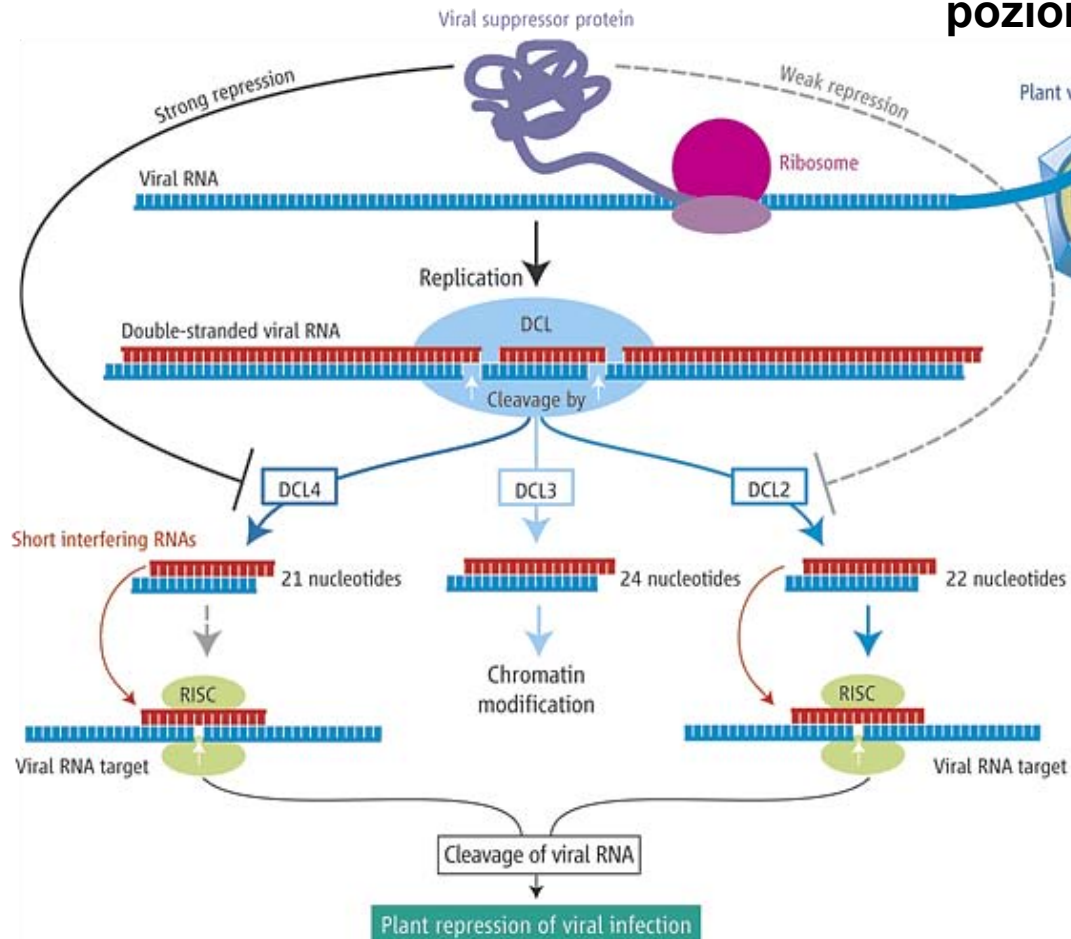
Czynniki wirulentne (VIR) patogena wywołują objawy infekcji
Czynniki awirulentne (Avr) aktywują specyficzną odpowiedź obronną rośliny

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



Obrona przed patogenami: wirusy

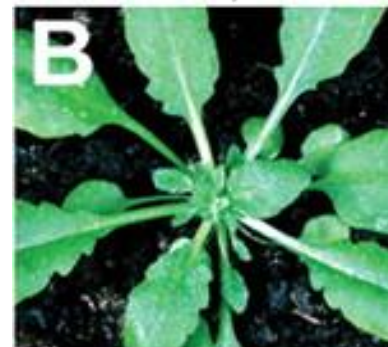
Obrona przeciwwirusowa u roślin na poziomie wyciszania RNA (VIGS)



Mutanty biogenezy siRNA są mniej odporne na choroby wirusowe

WT *Arabidopsis*
inokulowany TRV

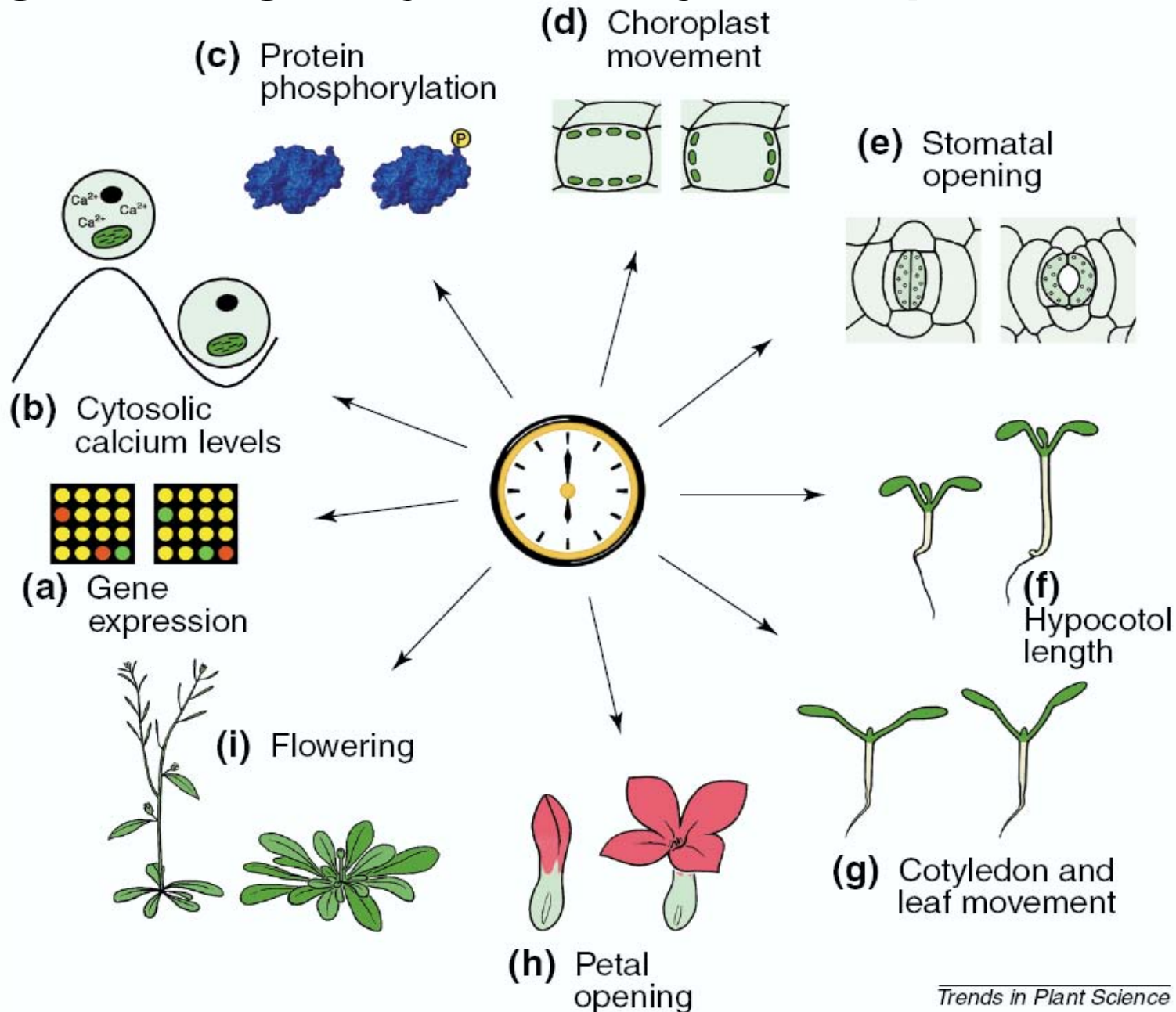
mutant *dcl2-dcl4*
inokulowany TRV



Deleris Oet al. (2006) Science

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

Zegar biologiczny kontroluje wiele procesów





PODSUMOWANIE



Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides

Dominique Lauressergues^{1,2}, Jean-Malo Couzigou^{1,2}, Hélène San Clemente^{1,2}, Yves Martinez³, Christophe Dunand^{1,2},
Guillaume Bécard^{1,2} & Jean-Philippe Combiér^{1,2}

Received 10 Jul 2014 | Accepted 21 Oct 2014 | Published 28 Nov 2014

DOI: 10.1038/ncomms6630

SCIENCE VOL 344 25 APRIL 2014

A Chloroplast Retrograde Signal Regulates Nuclear Alternative Splicing

Ezequiel Petrillo,^{1*} Micaela A. Godoy Herz,¹ Armin Fuchs,² Dominik Reifer,² John Fuller,³ Marcelo J. Yanovsky,⁴ Craig Simpson,³ John W. S. Brown,^{3,5} Andrea Barta,² Maria Kalyna,²† Alberto R. Kornblihtt¹‡

The Plant Cell, Vol. 26: 3867–3882, October 2014, www.plantcell.org © 2014 American Society of Plant Biologists

LARGE-SCALE BIOLOGY ARTICLE

A Proteomic Strategy for Global Analysis of Plant Protein Complexes^{WJOPEN}

Uma K. Aryal,^a Yi Xiong,^{b,1} Zachary McBride,^b Daisuke Kihara,^{b,c} Jun Xie,^d Mark C. Hall,^a
and Daniel B. Szymanski^{b,e,2}

miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*

Kate M. Creasey¹, Jixian Zhai², Filipe Borges¹, Frederic Van Ex¹, Michael Regulski¹, Blake C. Meyers² & Robert A. Martienssen^{1,3,4}

Functional Consequences of Splicing of the Antisense Transcript *COOLAIR* on *FLC* Transcription

Sebastian Marquardt,^{1,2} Oleg Raitskin,¹ Zhe Wu,¹ Fuquan Liu,^{1,3} Qianwen Sun,¹ and Caroline Dean^{1,*}

Unique features of the m⁶A methylome in *Arabidopsis thaliana*

Guan-Zheng Luo^{1,2,*}, Alice MacQueen^{3,*}, Guanqun Zheng^{1,2,*}, Hongchao Duan⁴, Louis C. Dore^{1,2}, Zhike Lu^{1,2}, Jun Liu⁴, Kai Chen^{1,2}, Guifang Jia⁴, Joy Bergelson³ & Chuan He^{1,2,4}

The Plant Cell, Vol. 26: 2729–2745, July 2014, www.plantcell.org © 2014 American Society of Plant Biologists. All rights reserved.

LARGE-SCALE BIOLOGY ARTICLE

Inference of Transcriptional Networks in *Arabidopsis* through Conserved Noncoding Sequence Analysis^{CITV}

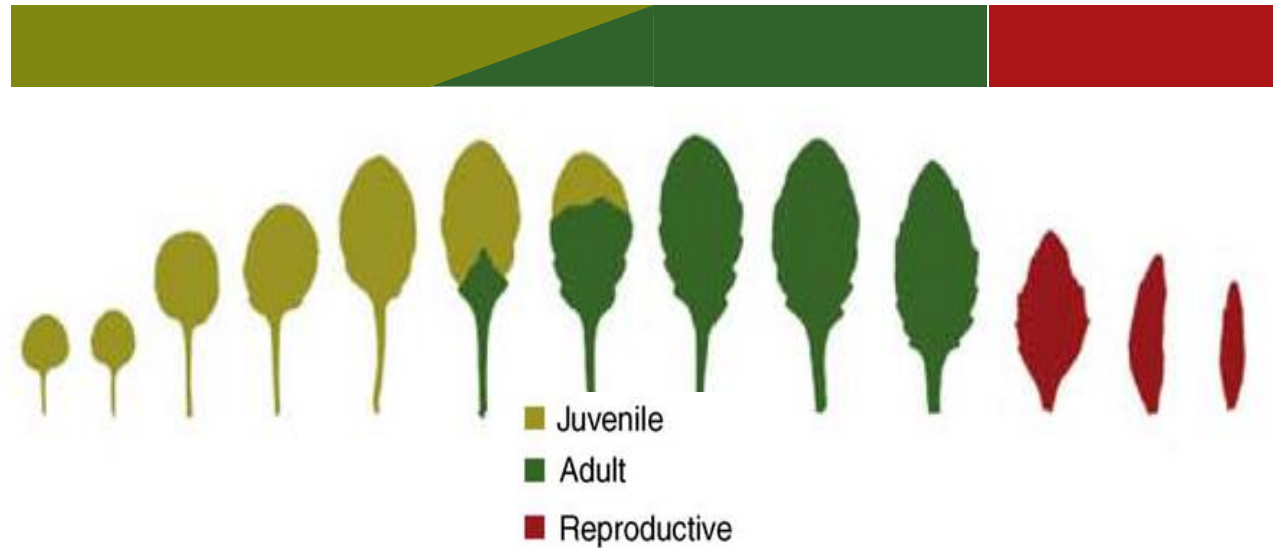
Jan Van de Velde,^{a,b,1} Ken S. Heyndrickx,^{a,b,1} and Klaas Vandepoele^{a,b,2}

A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in *Arabidopsis* ^{CWOPEN}

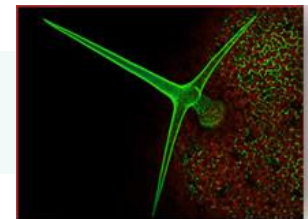
Nathalie Durut,^{a,b} Mohamed Abou-Ellail,^{a,b} Frédéric Pontvianne,^{a,b} Sadhan Das,^c Hisae Kojima,^d Seiko Ukai,^d Anne de Bures,^{a,b} Pascale Comella,^{a,b} Sabine Nidelet,^e Stéphanie Rialle,^e Remy Merret,^{a,b} Manuel Echeverria,^{a,b} Philippe Bouvet,^c Kenzo Nakamura,^{d,1} and Julio Sáez-Vásquez^{a,b,2}

Wzrost i rozwój roślin

A. thaliana: zmiany faz rozwojowych → zmiany kształtu liści



Liście młodociane (juwenilne): okrągłe, mniej ząbkowane, włoski (trichoma) tylko na górnej powierzchni blaszki liściowej



Regulacja faz rozwojowych przez miRNA u *Arabidopsis*

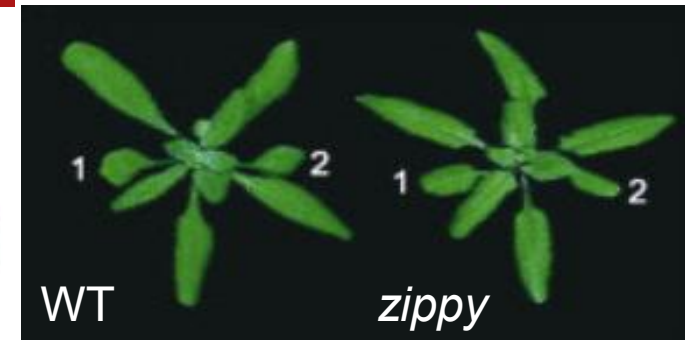
HASTY: mutacja w genie kodującym białko eksportu miRNA z jądra do cytoplazmy (homolog **eksportyny 5**); skrócenie fazy młodocianej (juwenilnej)



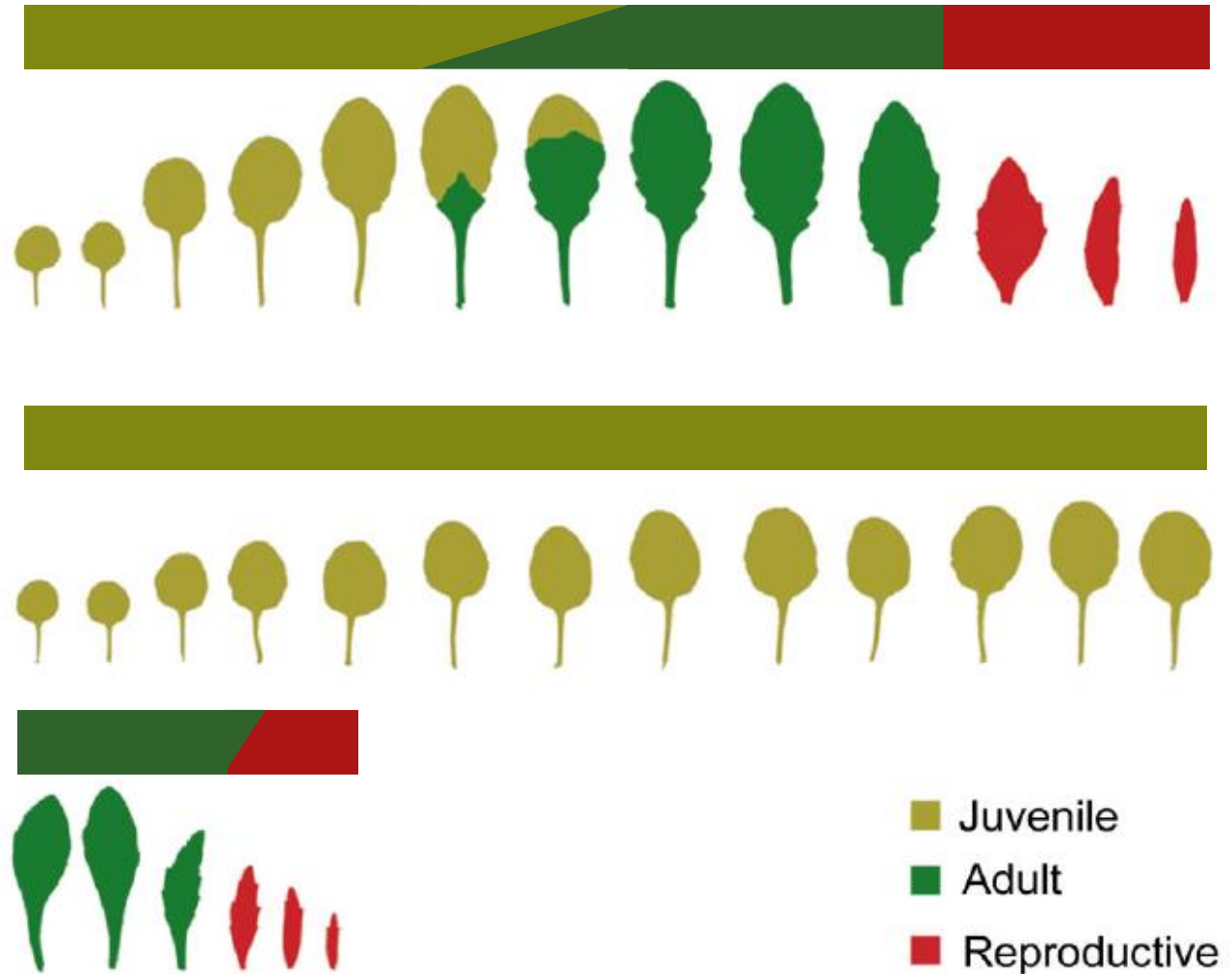
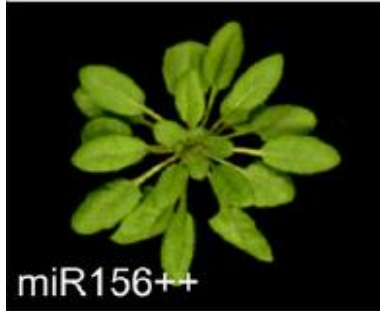
Regulacja faz rozwojowych przez miRNA u *Arabidopsis*



mutanty ***zippy*** przedwcześnie przechodzą z fazy młodocianej do dojrzałej: gen ***ZIPPY*** koduje jedno z białek rodziny Argonaute – ***AGO7***.



Nadekspresja miR156 wydłuża fazę młodocianą



miR156 reguluje ekspresję genów SPL

(SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE)

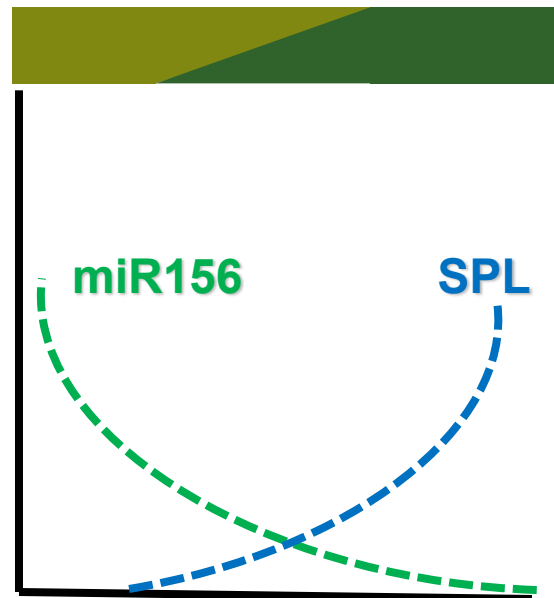
SPL – rodzina czynników transkrypcyjnych, związanych z przejściem rośliny w fazę rozwoju generatywnego (regulacja kwitnienia)

SPL3



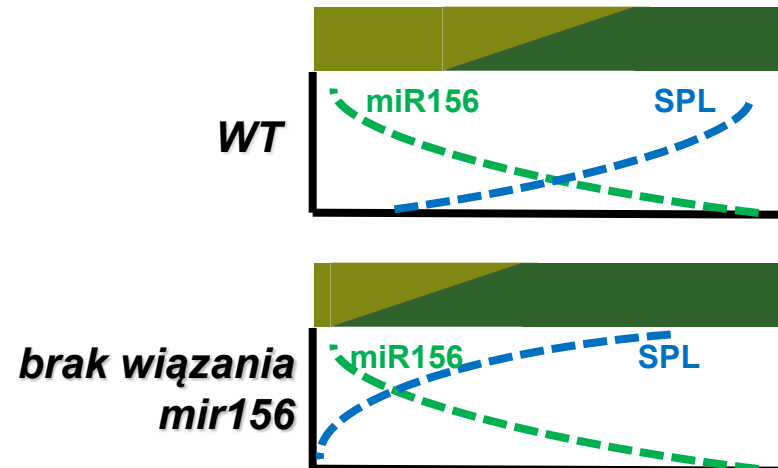
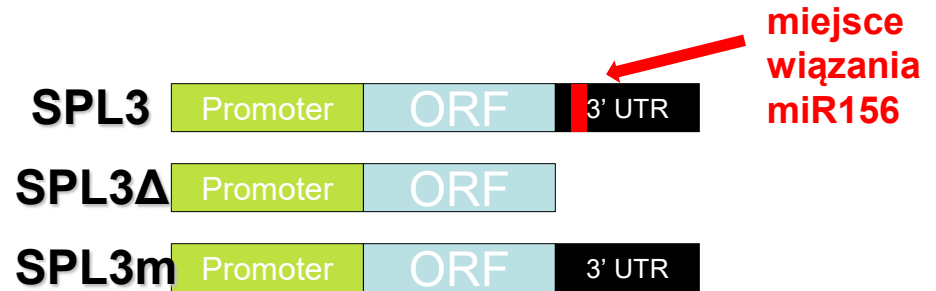
**miejsce
wiązania
miR156**

Wraz ze wzrostem i rozwojem rośliny obniża się poziom ekspresji **miR156**, co pozwala na akumulację mRNA genów **SPL** i prowadzi do przejścia rośliny z fazy wegetatywnej do generatywnej.

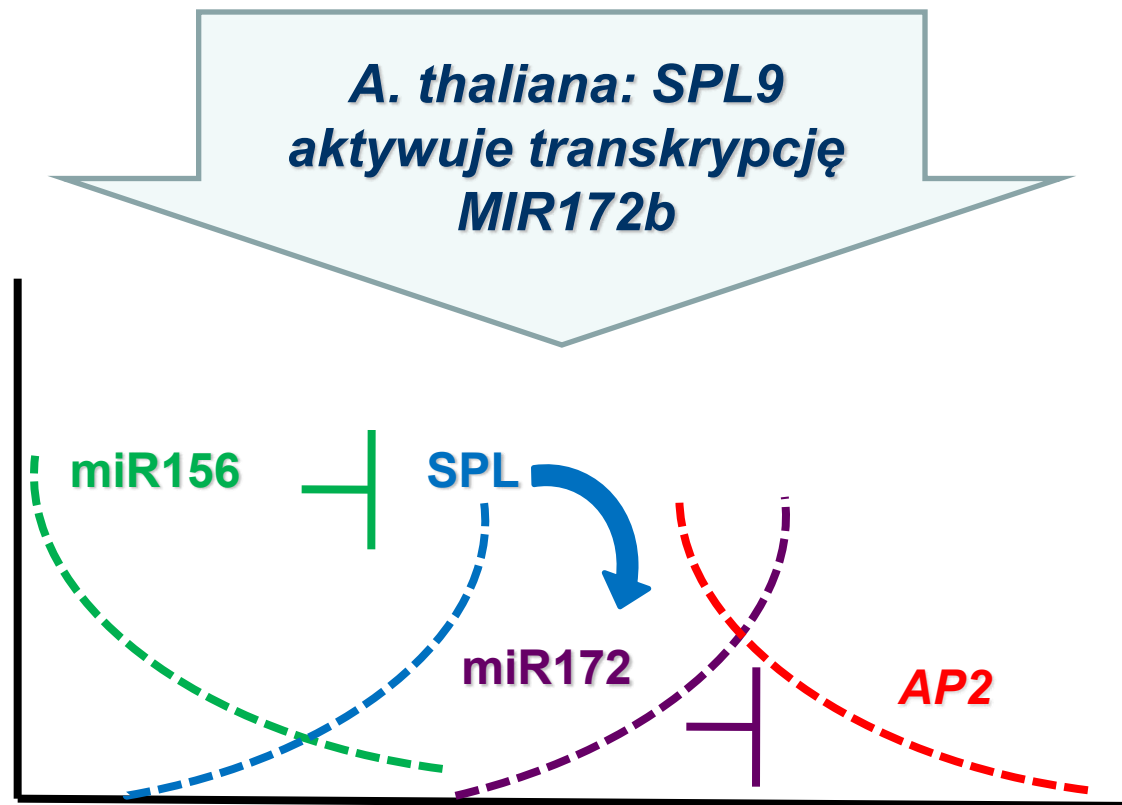


miR156 reguluje ekspresję genów *SPL* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*)

Wprowadzenie do genomu *A. thaliana* kopii genu *SPL3* **pozbawionego miejsca wiązania *mir156*** powoduje przedwczesną indukcję rozwoju generatywnego.

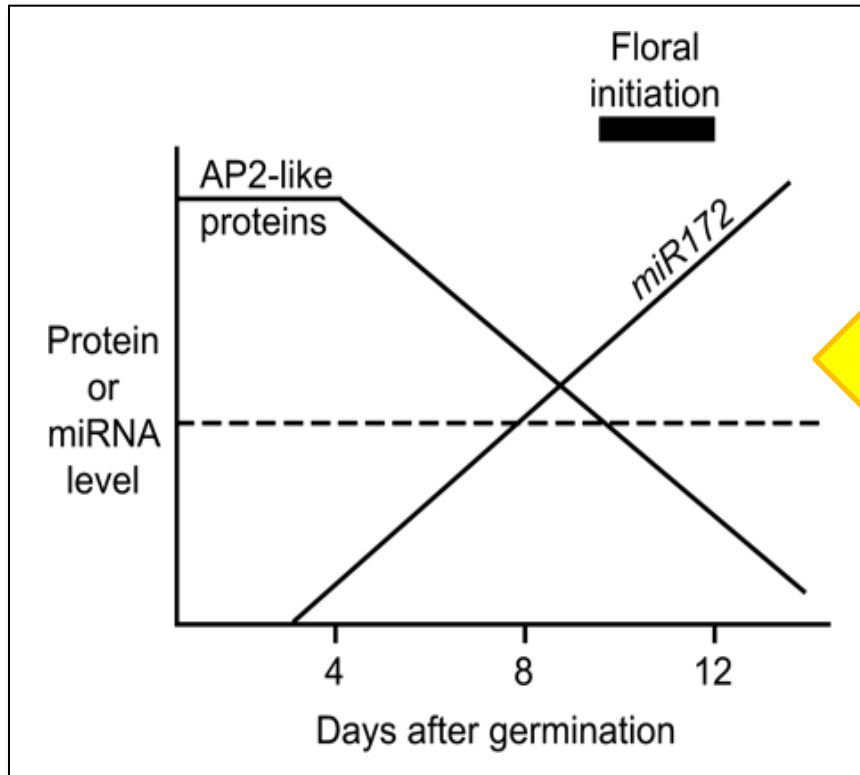


Zmiany faz rozwojowych u roślin: kaskada cząsteczek miRNA i czynników transkrypcyjnych



miR172 reguluje ekspresję *AP2*

(*APETALA2* - czynnik transkrypcyjny zaangażowany w inhibicję kwitnienia)



indukcja kwitnienia:
kiedy poziom
inhibitorów
kwitnienia *AP2-like*
spadnie poniżej
określonej granicy



WT

mutant
ap2-12
przedwczesne
kwitnienie

Aukerman, M.J., and Sakai, H. (2003) *Plant Cell*
Yant, L. et al. (2010) *Plant Cell*