

PAULINA GLAZIŃSKA, MILENA KULASEK, MICHAŁ GRZECA, WALDEMAR  
WOJCIECHOWSKI, KATARZYNA MARCINIAK, EMILIA WILMOWICZ, JAN KOPCEWICZ

*Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
Lwowska 1, 87-100 Toruń,  
E-mail: Paulina.Glazinska@umk.pl  
         milena.kulasek@gmail.com  
         michal.grzece@gmail.com  
         wwojc@umk.pl  
         marciniak@umk.pl  
         emwil@umk.pl  
         kopcew@umk.pl*

## UDZIAŁ NISKOCZĄSTECZKOWYCH REGULATORYWYCH RNA (siRNA I miRNA) W REGULACJI SZLAKU TRANSDUKCJI SYGNAŁU AUKSYN\*

### WPROWADZENIE – MAŁE REGULATOROWE RNA

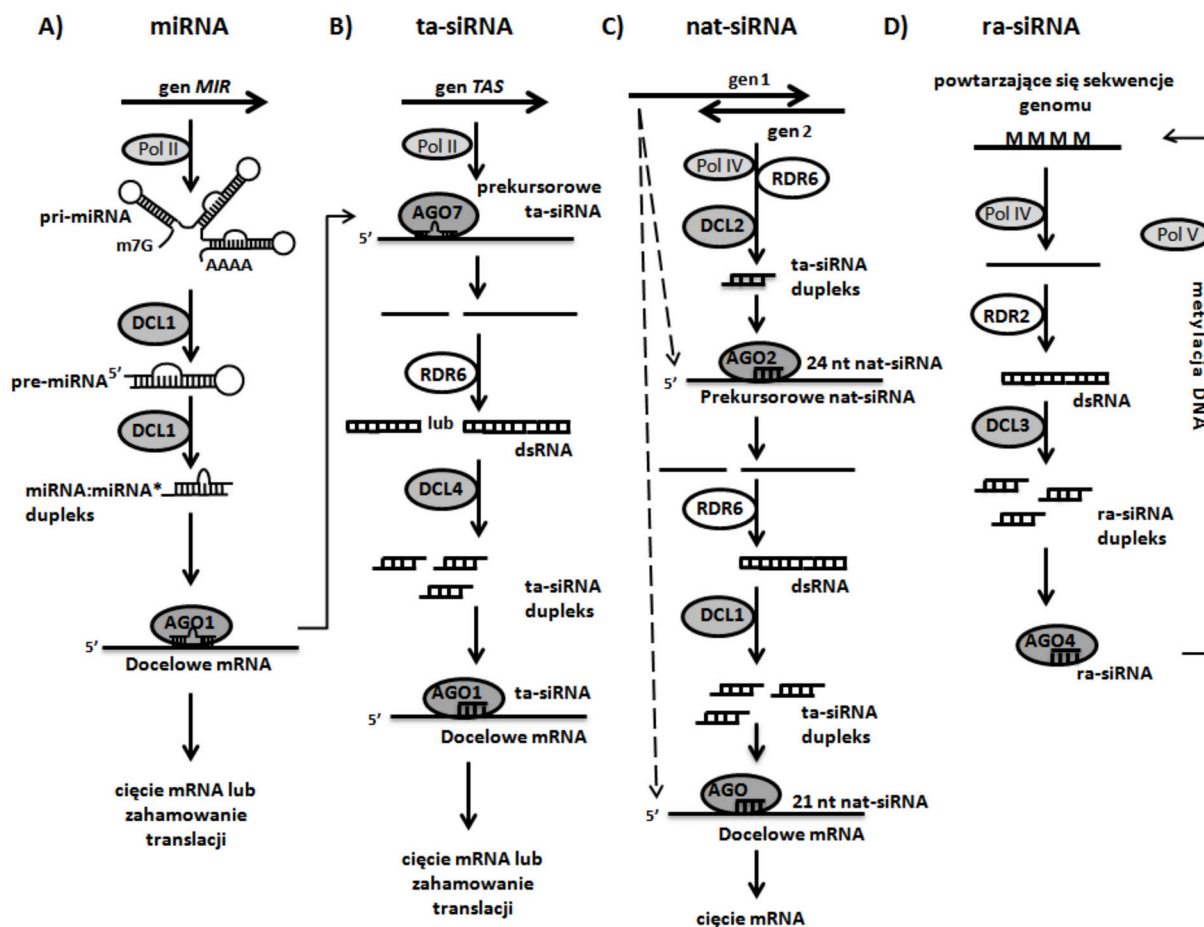
Małe, 20–24 nukleotydowe RNA (sRNA) są zaangażowane w kontrolę aktywności genów u większości eukariontów poprzez ewolucyjnie konserwatywny mechanizm transkrypcyjnego i potranskrypcyjnego wyciszania genów (VOINNET 2009, EBERT i SHARP 2012, KRUSZKA i współaut. 2012). Wyciszanie RNA (ang. RNA interference, RNAi) jest także wykorzystywane przez organizmy do obrony przed wirusami (CSORBA i współaut. 2009, LLAVE 2010, HOHN i VAZQUEZ 2011), wiroidami (GÓMEZ i współaut. 2008, NAVARRO i współaut. 2012), transpozonomi (MOSHER i MELNYK 2010), obcymi kwasami nukleinowymi (np. transgenami) (MLOTSHWA i współaut. 2008) i w niektórych przypadkach nawet do walki z mikroorganizmami (KATIYAR-AGARWAL i JIN 2010, DUAN i współaut. 2012, VAZQUEZ i HOHN 2013).

Wyciszanie RNA u roślin wymaga przetworzenia dłuższych cząsteczek dwuniciowego RNA (dsRNA) przez enzym z rodziny DICER-like (DCL) do krótkich małych dwuniciowych dupleksów sRNA. Następnie jedna z nici wraz z białkiem z rodziny ARGONAUTE (AGO) tworzy kompleks RISC (ang. RNA-in-

duced silencing complex), który rozpoznaje homologiczne docelowe DNA lub RNA (VOINNET 2009, MALLORY i VAUCHERET 2010, VAZQUEZ i HOHN 2013) (Ryc. 1).

Na podstawie badań *Arabidopsis thaliana* obecnie wyróżnia się cztery (angażujące różne białka z rodziny DCL) endogenne szlaki biosyntezy sRNA, z których trzy dotyczące różnych małych interferencyjnych siRNA (ang. small interfering RNA) oraz jeden szlak syntezy miRNA (ang. microRNA) (VAUCHERET 2006, VAZQUEZ i HOHN 2013). Tabela 1 i Ryc. 1 przedstawiają charakterystykę i skrócony schemat biogenezy wszystkich czterech typów niskocząsteczkowych, regulatorowych RNA. Obecnie, udział w regulacji szlaku transdukcji sygnału auksyn przypisywany jest miRNA oraz ta-siRNA trans-acting siRNA (ta-siRNA).

Mikro RNA są klasą sRNA generowaną z endogennych transkryptów tworzących charakterystyczne struktury dwuniciowe w postaci spinek do włosów. U roślin miRNA są związane z prawie wszystkimi biologicznymi procesami, lecz opisywane są głównie jako regulatory wzrostu i rozwoju działające poprzez kontrolę ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne oraz białka regulatorowe (CHEN 2009, RUBIO-SOMOZA i WEIGEL



Ryc. 1. Schemat biogenezy głównych klas niskocząsteczkowych regulatorowych RNA. A) miRNA, B) ta-siRNA, C) nat-siRNA, D) ra-siRNA. Strzałka pomiędzy szlakiem biosyntezy miRNA i ta-siRNA wskazuje, że cząsteczka miRNA jest niezbędna do produkcji ta-siRNA. Strzałki z przerywanej linii wskazują, że RNA transkrybowane z danego genu jest wykorzystywane na różnych etapach szlaku syntezy nat-siRNA. A) i B) Szczegóły biogenezy miRNA oraz ta-siRNA w tekście. C) nat-siRNA powstają na skutek transkrypcji genów posiadających dłuższy odcinek komplementarny do siebie. Powstałe w wyniku tego procesu mRNA o częściowo zachodzącej na siebie sekwencji, tworzą dwuniciową strukturę. Powstałe 24 nt. nat-siRNA biorą udział w cięciu prekursorowego transkryptu za pomocą białka z rodziny AGO. W kolejnym etapie powstałe dsRNA jest cięte na fragmenty przez białka z rodziny DCL1. Po włączeniu do kompleksu z białkiem AGO, nat-siRNA kontroluje ekspresję docelowych genów. D) Ra-siRNA pośredniczą w transkrypcyjnym wyciszeniu genów, w szlaku zależnej od RNA metylacji DNA (ang. RNA-dependent DNA methylation – RdDM). Transkrypt w tym szlaku powstaje z heterochromatyny, transpozonów albo innych sekwencji powtarzających się. Wstępny etap RdDM jest następnie wspierany przez sRNA następnej generacji (ra-siRNA) tworzone przy udziale białek, m.in.: polimerazy RNA IV i V, AGO4, RNA-dependent RNA polymerase (RDR2), białek remodelujących chromatynę oraz metylazy histonów (wg VAUCHERET 2006, VAZQUEZ i HOHN 2013).

2011). Prekursorowy transkrypt genów miRNA (*MIR*) ulega wieloetapowemu dojrzewaniu i cięciu, w którym bierze udział szereg białek, przede wszystkim DCL1 oraz m. in. HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1), SERRATE (SE), DAWDLE (DDL), C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE1 (CPL1), HUA ENHANCER 1 (HEN1), w wyniku którego powstaje duplet: przewodni (miRNA) i towarzyszący (miRNA\*). Przewodni miRNA jest włączany do kompleksu RISC, gdzie umożliwia

rozpoznanie i związanie komplementarnego mRNA (ROGERS i CHEN 2013).

Białko DCL4 razem z RDR6, SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) i dsRNA BINDING PROTEIN 4 (DRB4) biorą udział w biogenezie trans-acting siRNA (ta-siRNA) długości 21 nt z transkryptów genów niekodujących białka *TAS* oraz innych typów RNA (PERAGINE i współaut. 2004, VAZQUEZ i współaut. 2004, YOSHIKAWA i współaut. 2005, ADENOT i współaut. 2006, NA-

Tabela 1. Klasyfikacja głównych grup niskocząsteczkowych regulatorowych RNA.

miRNA – ang. microRNA, ta-siRNA – ang. trans-acting siRNA, nat-siRNA – ang. natural – antisense transcript – derived siRNA, ra-siRNA – ang. repeat-associated siRNA, RDR – ang. RNA-dependent RNA polymerase, DCL – ang. DICER-like, AGO – ang. ARGONAUTE, Pol – ang. polymerase RNA (wg VAUCHERET 2006, VAZQUEZ i HOHN 2013).

Rodzaj	Długość dojrzałego sRNA	Pochodzenie cząsteczki prekursorowej	Główne białka zaangażowane w:			Funkcja
			transkrypcję	dojrzewanie	działanie	
miRNA	20 - 21	Geny <i>MIR</i>	Pol II	DCL1	AGO1	Regulacja morfogenezy i rozwoju. Odpowiedzi stresowe.
ta-siRNA	21	Geny <i>TAS</i> , których transkrypty są cięte przy udziale miRNA.	Pol II	DCL4, DCL2, RDR6	AGO1, AGO7	Regulacja rozwoju. Odpowiedź na auksyny.
nat-siRNA	24, 21	Transkrypty genów zawierające sekwencje komplementarne.	Pol IV	DCL2, DCL1, RDR6	AGO AGO2	Odpowiedź na stres solny.
ra-siRNA	24	Transpozony, sekwencje powtarzające się DNA.	Pol IV, Pol V	DCL3, RDR2	AGO4	Utrzymywanie metylacji retrotranspozonów oraz sekwencji powtarzających się DNA.

KAZAWA i współaut. 2007). W powstawaniu ta-siRNA bierze udział miRNA (np. miR173 czy miR390), formujący kompleks z białkiem AGO1, który łączy się do docelowej sekwencji, tworząc starter do syntezy komplementarnej nici RNA (YOSHIKAWA i współaut. 2005). Następnie zachodzi proces metylacji dupleksów ta-siRNA. W kolejnym etapie biogenezy jedna nić jest degradowana, a druga jest włączana do kompleksu RISC, mającego wpływać na ekspresję mRNA (VAUCHERET 2006). W tym samym szlaku DCL2 generuje występujące w niewielkiej ilości siRNA długości 22 nt z różnych prekursorów, a także może przejmować funkcje białek DCL3 i DCL4, maskując mutacje w kodujących je genach (BLEVINS i współaut. 2006, HENDERSON i współaut. 2006, ZHANG i współaut. 2012). DCL2 pełni też kluczową funkcję w procesie przejściowego wyciszania RNA (ang. transitive RNA silencing), umożliwiającego rozprzestrzenianie sygnału wyciszania po całym organizmie (NOWAKOWSKA i KOPCEWICZ 2006, VAZQUEZ i HOHN 2013).

Proces wyciszania przez kompleks RISC, zawierający miRNA lub siRNA długości 21 i 22 nukleotydów może zachodzić na dwa sposoby. Rozpoznane RNA docelowe jest albo cięte, albo następuje zahamowanie jego

translacji (BRODERSEN i VOINNET 2006, VAZQUEZ 2006, BRODERSEN i współaut. 2008, LANET i współaut. 2009). Zasady determinujące los docelowego RNA nie są zdefiniowane w każdym przypadku. Wcześniejsze badania sugerują, że jest to związane ze stopniem komplementarności między sRNA, a sekwencją RNA docelowego. W przypadku całkowitej lub prawie całkowitej komplementarności następuje cięcie związanego transkryptu, natomiast gdy sparowanie jest niekompletne, zachodzi zahamowanie translacji. Jednakże czasami występują oba typy regulacji dla tego samego sRNA i jego celu, co wskazuje na istnienie innych specyficznych mechanizmów decydujących o sposobie regulacji aktywności docelowego genu, np. w zależności od typu komórek (BRODERSEN i współaut. 2008, VAZQUEZ i HOHN 2013).

#### SZLAK TRANSDUKCJI SYGNAŁU AUKSYNY

Hormony występujące w organizmach odpowiadają za koordynację wielu procesów fizjologicznych zachodzących w poszczególnych komórkach. Zarówno u roślin, jak i zwierząt produkowane są zazwyczaj w jednych, wyspecjalizowanych elementach orga-

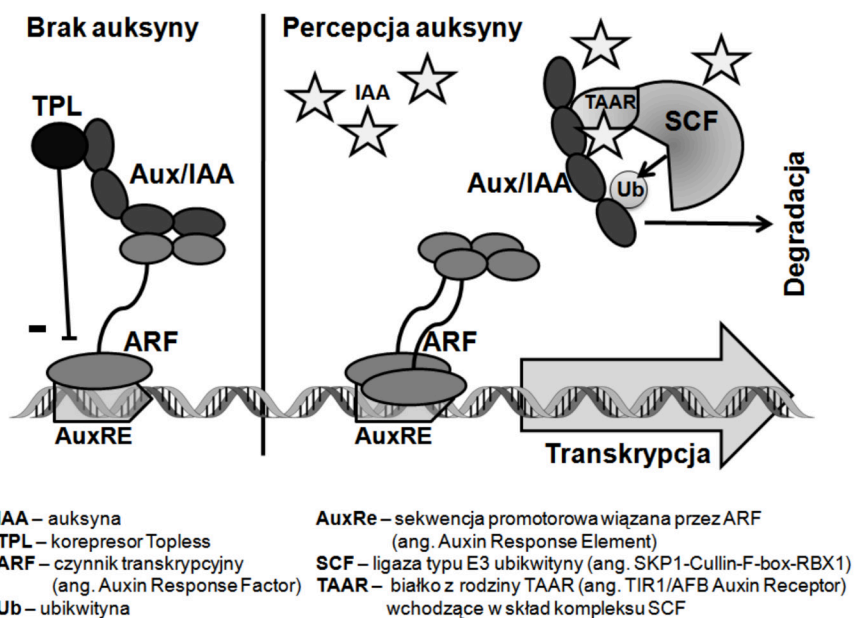
nizmu, a następnie transportowane do pozostałych komórek pełniąc w nich przypisane im funkcje. Niejednokrotnie skutki działania poszczególnych hormonów nakładają się na siebie, stąd trudno czasem wskazać reakcję, która podlegałaby kontroli tylko jednego hormonu (MARCINIAK i współaut. 2010).

Doniesienia ostatnich lat wskazują na istotną rolę sRNA w genetycznej kontroli szlaków transdukcji sygnału hormonów u roślin. Najlepiej opisany został dotychczas udział miRNA oraz siRNA w regulacji działania auksyn, co jest przedmiotem niniejszej pracy przeglądowej.

Auksyny należą do grupy hormonów odpowiadających za właściwy przebieg procesów takich jak: embriogeneza, stymulacja podziałów komórkowych, wzrost komórek na długość, dominacja wierzchołkowa, kontrola morfogenezy itp. (QUINT i GRAY 2006). Najważniejszą i najlepiej poznaną do tej pory auksyną jest kwas indolilo-3-octowy (ang. INDOLE-3-ACETIC ACID, IAA). Transdukcja sygnału auksynowego obejmuje szereg reakcji, w wyniku których następuje odpowiedź rośliny na fitohormon, co prowadzić może między innymi do zmian fizjologicznych w roślinie. W skład szlaku wchodzi białko F-box kompleksu SCF (z ang. SKP1-Cullin-

-F-box-RBX1) będące receptorem auksyn z rodziny TAAR (TIR1/AFB AUXIN RECEPTOR), a mianowicie TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) i jego homologi AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (AFB), białka AUX/IAA oraz czynniki transkrypcyjne AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) (QUINT i GRAY 2006, GUILFOYLE i HAGEN 2007, LAU i współaut. 2008, OSTROWSKI i JAKUBOWSKA 2008, MARCINIAK i współaut. 2010).

Mechanizm regulacji ekspresji genów przez auksynę (Ryc. 2) zakłada, że w warunkach niskiego stężenia IAA białka AUX/IAA tworzą heterodimery z czynnikami transkrypcyjnymi ARF. Powstanie dimeru ARF-AUX/IAA uniemożliwia tworzenie homodimeru między cząsteczkami ARF oraz wiązanie go z sekwencjami docelowymi w DNA (LISCUM i REED 2002). Gdy w komórce pojawia się auksyna, białka AUX/IAA wiązane są przez receptor IAA z rodziny TAAR, np. TIR1, które tworzą ligazy E3 ubikwityny typu SCF<sup>TIR1</sup> (MARCINIAK i współaut. 2010). Białko to rozpoznaje i wiąże określone AUX/IAA (DHARMASIRI i współaut. 2005, KEPINSKI i LEYSER 2005, WOODWARD i BARTEL 2005). Związanie auksyny przez białko TIR1 prowadzi do zmiany powinowactwa ligazy SCF<sup>TIR1</sup> względem danego AUX/IAA, powodując jego



Ryc. 2. Schemat szlaku trasdukcji sygnału auksyn. W sytuacji braku auksyny białka AUX/IAA tworzą heterodimery z czynnikami transkrypcyjnymi ARF. Powstanie dimeru ARF-AUX/IAA uniemożliwia tworzenie homodimeru między cząsteczkami ARF i hamuje ich funkcjonowanie jako czynników transkrypcyjnych. Gdy w komórce pojawia się auksyna, białka AUX/IAA wiązane są przez receptor IAA z rodziny TAAR, który wchodzi w skład ligazy SCF, co powoduje ich ubikwitynację i skierowanie na drogę degradacji proteasomalnej. Degradacja AUX/IAA umożliwia tworzenie homodimerów ARF co w konsekwencji prowadzi do aktywacji bądź represji transkrypcji regulowanych genów (wg QUINT i GRAY 2006, zmodyfikowana).

ubikwitynację i skierowanie na drogę degradacji proteasomalnej. Degradacja AUX/IAA umożliwia tworzenie homodimerów ARF. W tej postaci wiążą się one do promotorów genów pierwotnej odpowiedzi na auksynę, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji bądź represji transkrypcji na matrycy regulowanych genów (HEJKA i KOWALCZYK 2006, QUINT i GRAY 2006, LAU i współaut. 2008, MARCINIAK i współaut. 2010, DEPUYDT i HARDTKE 2011).

Choć na pozór szlak ten wydaje się prosty, w rzeczywistości jego regulacja jest dużo bardziej skomplikowana. Wraz z jego bardziej szczegółowym poznawaniem pojawia się dużo więcej elementów, jak choćby białka TPL (TOPLESS), będące swoistym korepresorem dla ARF razem z omawianymi białkami AUX/IAA (LAU i współaut. 2008). Ponadto, u np. *A. thaliana* zidentyfikowano 6 genów z rodziny TAAR (dokładniej opisano cztery: *TIR1* i *AFB1*, *AFB2* i *AFB3*), 23 geny *ARF* i 29 *AUX/IAA*, co dodatkowo umożliwia tworzenie wielu wariantów szlaku transdukcji sygnału auksyn zależnych od obecnych w danym momencie fizjologicznym komórki

elementów szlaku, które mogą różnić się powinowactwem do swoich partnerów (VERNOUX i współaut. 2011, PIYA i współaut. 2014).

#### REGULACJA SZLAKU TRANSDUKCJI AUKSYNY PRZEZ sRNA

Wymienione elementy szlaku auksynowego podlegają często bezpośredniej regulacji przez małe regulatorowe RNA, głównie miRNA oraz ta-siRNA. Do elementów tych należą geny kodujące białka ARF (GUILFOYLE i HAGEN 2007, GLAZIŃSKA i współaut. 2011), IAA28 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE28) (WANG i GUO 2015) oraz TIR1 wraz z jego homologami AFB1-3 (DHARMA-SIRI i współaut. 2005, MOCKAITIS i ESTELLE 2008, MARCINIAK i współaut. 2010). Część czynników transkrypcyjnych odpowiedzi na auksynę z rodziny ARF podlega bezpośredniej kontroli przez miR167 i miR160 (GLAZIŃSKA i współaut. 2011) oraz przez tasiR-ARF pochodzące z locus *TAS3* (MARIN i współaut. 2010). Wykazano, że transkrypt genu *IAA28* może ulegać degradacji pod wpływem związania miR847 (WANG i GUO

Tabela 2. Zestawienie sRNA zaangażowanych w regulację ekspresji genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn u *Arabidopsis thaliana* (wg miRBase, CHITWOOD i współaut. 2009, GLAZIŃSKA i współaut. 2011, SI-AMMOUR i współaut. 2011, WANG i współaut. 2015).

sRNA	Pochodzenie sRNA	Długość sRNA [nt]	Geny docelowe	Funkcja
miR160	<i>MIR160a</i> , <i>MIR160b</i> , <i>MIR160c</i>	20	<i>ARF10</i> , <i>ARF16</i> , <i>ARF17</i>	Regulacja morfogenezy liści, korzeni i kwiatów.
miR167	<i>MIR167a</i> , <i>MIR167b</i> , <i>MIR167c</i> , <i>MIR167d</i>	20 21	<i>ARF6</i> , <i>ARF8</i>	Regulacja powstawania i rozwoju liści oraz kwiatów.
miR390	<i>MIR390a</i> , <i>MIR390b</i>	21	<i>TAS3</i>	Biogeneza tasiR-ARF.
miR393	<i>MIR393a</i> , <i>MIR393b</i>	22	Rodzina TAAR	Synteza siTAAR. Regulacja rozwoju liści i korzeni. Odpowiedź na patogeny i stresy.
miR847	<i>MIR847</i>	21	<i>IAA28</i>	Regulacja podziałów komórkowych podczas tworzenia późnych liści rozetowych i korzeni bocznych.
siTAAR	<i>AFB2</i> , <i>AFB3</i>	21	Rodzina TAAR, <i>At3g18850</i> , <i>At5g24650</i>	Regulacja rozwoju liści i korzeni. Odpowiedź na patogeny i stresy.
tasiR-ARF	<i>TAS3</i>	21	<i>ARF2</i> , <i>ARF3</i> , <i>ARF4</i>	Regulacja powstawania i starzenia liści, tworzenia korzeni bocznych, odcinania kwiatów oraz otwierania łuszczyń.

2015). Natomiast *TIR1* i *AFB1*, 2, 3 posiadają w swojej sekwencji miejsce docelowe dla miR393 i drugorzędowego siTAAR (Tabela 2) (NAVARRO i współaut. 2006, VIDAL i współaut. 2010, SI-AMMOUR i współaut. 2011, WINDELS i VAZQUEZ 2011).

### REGULACJA AKTYWNOŚCI GENÓW KODUJĄCYCH RECEPTORY AUKSYNY

Białka z rodziny TAAR są komponentami kompleksu ligazy Skp-Cullin-F-box-ubikwityny, który w warunkach wysokiego stężenia auksyny bierze udział w zależnej od proteasomu degradacji białek z rodziny AUX/IAA. Wskutek tego procesu białka AUX/IAA uwalniają transkrypcyjny korepresor TPL (TOPLESS) i pozwalają AUXIN RESPONSE FACTOR działać jako czynniki transkrypcyjne i regulować aktywność genów odpowiedzi na auksynę. Badania na mutantach *tir1/afb Arabidopsis thaliana* pozwoliły stwierdzić, iż funkcje tych genów wzajemnie się pokrywają i uzupełniają, ale przede wszystkim są kluczowe dla prawidłowego rozwoju i wzrostu. Dzięki porównaniu sekwencji aminokwasowej *TIR1* i *AFB1* wykazano, że ich budowa jest w 70% homologiczna, natomiast *AFB2* i *ARF3* wykazują 84% podobieństwa. Wszystkie zawierają bogate w leucynę domeny LRR (ang. leucine rich repeats) oraz domenę F-box. Jednak mimo zbliżonej budowy, i oddziaływań wzajemnie się uzupełniających, dotychczasowe przesłanki każą sądzić, że każde z nich może mieć swoją osobną, ściśle określoną funkcję (DHARMASIRI i współaut. 2005, PARRY i ESTELLE 2006).

### miR393, siTAAR I GENY Z RODZINY TAAR

Zarówno mRNA *TIR1*, jak i *AFB 1-3* posiadają w swojej sekwencji miejsce wiązania dla miR393. Może on powstawać z dwóch genów, *MIR393a* i *MIR393b*, zlokalizowanych kolejno na 2 i 3 chromosomie *A. thaliana*, dających gotowy produkt w postaci 22 nt miR393 (miRBase) (GRIFFITHS-JONES 2004; GRIFFITHS-JONES i współaut. 2006, 2008; KOZOMARA i GRIFFITHS-JONES 2011). Dwa zidentyfikowane geny *MIR*, które wykazują różnice w sekwencji prekursorów, w konsekwencji dają produkty o identycznym składzie nukleotydowym, lecz pełniące odmienne funkcje (WINDELS i VAZQUEZ 2011). *MIR393b* jest niezbędny do syntezy 21 nt siTAAR, wtórnych siRNA, z co najmniej dwóch transkryptów genów rodziny TAAR (*AFB2* i *AFB3*) przez szlak podobny do szlaku ta-siRNA. Wtórne siR-

NA regulują ekspresję wszystkich członków rodziny TAAR oraz potencjalnie innych genów niespokrewnionych (np. At5g24650 oraz At3g18850), prowadząc do degradacji ich mRNA (SI-AMMOUR i współaut. 2011). SI-AMMOUR i współaut. (2011), badając ekspresję *MIR393b*, zaobserwowali wysoki poziom transkryptu tego genu w organach nadziemnych, natomiast znikomy w korzeniu, gdzie z kolei dominuje ekspresja *MIR393a*.

Dalsze badania wykazały także, że miR393 odpowiada za regulację licznych procesów rozwojowych w liściach (WINDELS i VAZQUEZ 2011), prawidłową architekturę korzenia (VIDAL i współaut. 2010), obronę podczas ataku patogenów (NAVARRO i współaut. 2006, ZHAO i współaut. 2010) i jest także zaangażowany w odpowiedź rośliny na obecność azotanów i zmiany zasolenia (VIDAL i współaut. 2010, LI i współaut. 2011, SI-AMMOUR i współaut. 2011). Co ciekawe, mechanizm działania miR393 jest różny, zależnie od regulowanego procesu. U *Arabidopsis* w odpowiedzi na bakteryjną infekcję liści, miR393 generowany z transkryptu genu *MIR393a*, przeprowadza wyciszenie genów *AFB1* oraz *TIR1*, *AFB2* i *AFB3* (NAVARRO i współaut. 2006). W korzeniach natomiast, w odpowiedzi na azotany dochodzi do degradacji mRNA *AFB3*, ale nie mRNA innych genów TAAR (VIDAL i współaut. 2010). Właściwa regulacja *AFB3* przez miR393 objawia się wzrostem korzeni głównych i bocznych w odpowiedzi na działanie azotanów (VIDAL i współaut. 2010).

### REGULACJA ILOŚCI TRANSKRYPTU GENU IAA28 PRZEZ miR847

Dotychczas opisano tylko jeden przypadek regulacji ekspresji genu kodującego białko represorowe odpowiedzi na auksynę, a mianowicie IAA28 (WANG i GUO 2015).

WANG i GUO (2015) wykazali, że miR847 wiąże się z mRNA *IAA28* i powoduje jego ciecie. MiR847 długości 21 nt u *A. thaliana* kodowany jest przez jeden gen zlokalizowany na chromosomie 1 (miRBase) (GRIFFITHS-JONES 2004; GRIFFITHS-JONES i współaut. 2006, 2008; KOZOMARA i GRIFFITHS-JONES 2011). Ekspresja zarówno *MIR874*, jak i *IAA28* zachodzi głównie w częściach marginalnych liści oraz miejscu inicjacji powstawania korzeni bocznych. Badania wykazały, że miR847 jest pozytywnym, zależnym od auksyny, regulatorem rozwoju organów bocznych. Ektopowa ekspresja genu *MIR874* powoduje zwiększenie aktywności genów cyklu komórkowego i przedłużenie czasu tworzenia liści z postrzępioną blaszką liściową (WANG i GUO 2015).

## REGULACJA EKSPRESJI GENÓW KODUJĄCYCH CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE ODPOWIEDZI NA AUKSYNĘ ARF

U *Arabidopsis* zidentyfikowano 23 geny kodujące białka ARF, ostatni z których wydaje się być pseudogenem. Zlokalizowane zostały one na wszystkich pięciu chromosomach (OKUSHIMA i współaut. 2005). Wszystkie, z wyjątkiem ARF3, ARF13 i ARF17, w swojej budowie posiadają domenę wiążącą DNA (ang. DNA BINDING DOMAIN, DBD) na N-końcu oraz tzw. domenę CTD (ang. C-TERMINAL DOMAIN) na końcu C. W centralnej części znajduje się domena MD (ang. MIDDLE DOMAIN), która w zależności od tego, czy zawiera przewagę aminokwasu glutaminy czy seryny, będzie decydowała odpowiednio o właściwościach aktywatorowych lub represorowych czynnika transkrypcyjnego. Do tej pory ustalono, że ARF 5, 6, 7, 8 i 19 funkcjonują jako aktywatory transkrypcji genów wczesnej odpowiedzi na auksynę, pozostałe są raczej represorami, choć nie we wszystkich przypadkach zostało to precyzyjnie ustalone (GUILFOYLE i HAGEN 2007).

### MiR160 I ARF10, ARF16 ORAZ ARF17

MiR160 jest liczącą 20 nt regulatorową cząsteczką RNA. U *A. thaliana* kodowany jest przez trzy geny: *MIR160a*, *MIR160b* i *MIR160c*, zlokalizowane kolejno na 2, 4 i 5 chromosomie. Różnice w obrębie sekwencji mRNA tych trzech genów występują tylko na etapie pri- i pre-mRNA. Dojrzały miRNA we wszystkich trzech przypadkach ma taką samą sekwencję (miRBase) (GRIFFITHS-JONES 2004; GRIFFITHS-JONES i współaut. 2006, 2008; KOZOMARA i GRIFFITHS-JONES 2011).

U *A. thaliana* miR160 odpowiada za bezpośrednią kontrolę trzech genów ARF, a mianowicie ARF10, ARF16 i ARF17 (BONNET i współaut. 2006). Dwa pierwsze są szczególnie zaangażowane w rozwój korzeni, natomiast ARF17 w szeroko pojęte procesy morfogenezy kontrolowane przez auksynę (BONNET i współaut. 2006, QUINT i GRAY 2006). WANG i współaut. (2005) zaobserwowali ekspresję wszystkich trzech genów ARF w korzeniu, łodydze, liściach oraz kwiatostanach. Przy czym, zdecydowanie najwyższą ekspresję we wszystkich wymienionych organach wykazywał ARF16, który w korzeniu, razem z ARF10, odpowiadał za różnicowanie komórek czapeczki. Nadekspresja *MIR160*, tak jak podwójna mutacja *arf10arf16*, powodowała niekontrolowane podziały komórek czapeczki oraz zahamowanie ich różnicowania prowadząc do powstawania rakopodobnych struktur.

ARF17 zaangażowany jest w rozwój części nadziemnych, głównie liści i kwiatów (MAL-

LORY i współaut. 2005). U roślin, w których sekwencja mRNA *ARF17* została zmieniona tak, aby nie zawierała fragmentu komplementarnego do miRNA, ale bez zmiany składu aminokwasowego kodowanego białka (co powodowało, że gen *ARF17* był „odporny” na regulację przez miR160), podwyższony był poziom ekspresji genów z rodziny GH3 (związanych z syntezą koniugatów IAA) (MALLORY i współaut. 2005). Fenotypowo, obserwowano powstawanie atypowych zakorkowanych i skreconych liści. Dodatkowo, rośliny te przedwcześnie kwitły, a powstające kwiaty miały zmienioną morfologię oraz często pozostawały nieplodne (CHEN 2005). Podobne objawy zaobserwowano również w mutantach z „odpornym” na miR160 genem *ARF10* (LIU i współaut. 2007). Doświadczenia GUTIERREZ i współaut. (2009) wskazują, że *ARF17* wpływa również na powstawanie korzeni bocznych i jest negatywnym regulatorem tego procesu. Ponadto, tworzenie tych organów jest pozytywnie sprzężone z działaniem *ARF6* i *ARF8*, będących genami docelowymi dla miR167.

### MiR167 I ARF6 ORAZ ARF8

U *A. thaliana* miR167 kodowany jest przez cztery geny: *MIR167a*, *MIR167b*, *MIR167c* i *MIR167d*. Trzy pierwsze zostały zlokalizowane na 3 chromosomie i generują ostatecznie cząsteczkę RNA długości 20 nt, natomiast ostatni na chromosomie 1 jest źródłem 21 nukleotydowego miR167d (miRBase) (GRIFFITHS-JONES 2004; GRIFFITHS-JONES i współaut. 2006, 2008; KOZOMARA i GRIFFITHS-JONES 2011).

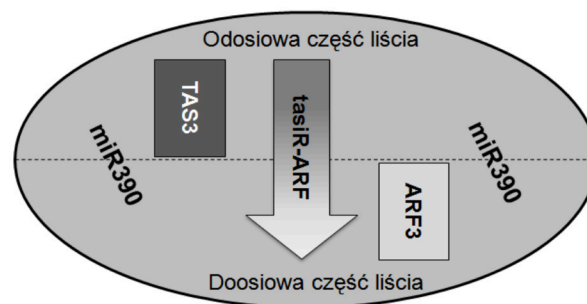
MiR167 posiada miejsce komplementarne do mRNA dwóch genów kodujących czynniki transkrypcyjne ARF6 i ARF8, które odpowiadają za kontrolę rozwoju szupkowiec i precykowiec (GLAZINSKA i współaut. 2011). Badania przeprowadzone u *Arabidopsis* wykazały, że oba czynniki są zaangażowane w wydłużanie nitki pręcika oraz pęknięcie pylników. Poza tym, odpowiadają one za dojrzewanie szupkowiec i otwieranie pąków kwiatowych. Utrata funkcji u podwójnych mutantów genów *ARF6* i *ARF8*, powoduje wystąpienie problemów z zapyleniem. Kwiaty nie są zdolne do otwarcia i produkcji zawierających nasiona luszczyn (NAGPAL i współaut. 2005). *MIR167*, podobnie jak *MIR160*, zaangażowany jest również w rozwój liści. Badania WU i współaut. (2006) na *Arabidopsis*, z wykorzystaniem nadekspresji *MIR167*, pozwoliły na uzyskanie roślin z krótszymi liśćmi. Widoczna była także redukcja długości kwiatostanów i zahamowany rozwój kwiatów. Podobny fenotyp dawały podwójne mutanty *arf6arf8*. Dodatkowo, u mutantów *mir167* nie dochodziło do rozwoju załazka i uwalniania ziaren

pyłku (RU i współaut. 2006, WU i współaut. 2006). Na tej podstawie można wyciągnąć wniosek, że utrzymanie przez miR167 odpowiedniego poziomu transkryptów *ARF6* i *ARF8* umożliwia właściwy rozwój liści, kwiatów i kwiatostanów (RU i współaut. 2006, WU i współaut. 2006). *ARF6* i *ARF8* biorą udział w zapoczątkowaniu pęknięcia pylników, w odpowiednich warunkach indukując syntezę kwasu jasmonowego. W ten sam sposób jest możliwe także wspieranie wzrostu płatków korony lub jego hamowanie, chociaż należy zwrócić uwagę, że potrafią też regulować inne aspekty dojrzewania kwiatu, niezależnie od wpływu tego fitohormonu (BRIOUDES i współaut. 2009).

Badania wykazały, że miR167, kontrolując aktywność genu *ARF8* poprzez hamowanie jego ekspresji, wpływa na geny *GH3*, co w konsekwencji prowadzi do regulacji poziomu wolnej auksyny. Gdy następuje zmniejszenie ilości miRNA obserwuje się wzrost ilości transkryptu *ARF8*, a także *GH3* (YANG i współaut. 2006).

#### MiR390, tasiR-ARF I *ARF2*, *ARF3* ORAZ *ARF4*

MiR390 długości 21 nt u *A. thaliana* kodowany jest przez dwa geny, *MIR390a* i *MIR390b*, zlokalizowane odpowiednio na 2 i 5 chromosomie (miRBase) (GRIFFITHS-JONES 2004; GRIFFITHS-JONES i współaut. 2006, 2008; KOZOMARA i GRIFFITHS-JONES 2011). *MIR390a* i *MIR390b* wykazują odmienny wzorzec ekspresji tkankowej, której wynikiem jest miR390 o identycznym składzie nukleotydowym (CHITWOOD i współaut. 2009). Inicjuje on powstanie tasiR-ARF poprzez indukcję cięcia RNA niekodującego białka *TAS3* (MONTGOMERY i współaut. 2008). Powstające siRNA pośredniczy w regulacji poziomu transkryptów genów *ARF2*, *ARF3* i *ARF4*, a w konsekwencji wpływa na prawidłowy rozwój korzeni, a także formowanie się liści i kwiatów (NEMHAUSER i współaut. 2000, HUNTER i współaut. 2006). Obniżenie ekspresji *ARF2* poprzez interferencję RNA (dsRNAi) powoduje opóźnienie kwitnienia, starzenia liści rozetowych, a także odpadania organów kwiatowych i otwierania łuszczyń *A. thaliana* (ELLIS i współaut. 2005). *ARF2* jest także negatywnym regulatorem szlaku odpowiedzi na kwas absycynowy (ABA) podczas kiełkowania i wzrostu korzenia pierwotnego, a jego ekspresja jest indukowana przez ten fitohormon (WANG i współaut. 2011). Wszystkie te dane wskazują, że *ARF2* jest plejotropowym regulatorem zaangażowanym w regulację szeregu procesów rozwojowych roślin i wydaje się łączyć szlaki odpowiedzi na auksyny, etylen, brasi-nosteroidy i ABA (WANG i współaut. 2011).



Ryc. 3. Schemat lokalizacji miR390, tasiR-ARF i białka *ARF3* podczas rozwoju liścia *A. thaliana*. MiR390 obecny jest w obrębie całego liścia, ekspresja genu *TAS3* następuje w części odosiowej i tam powstaje tasiR-ARF, które przemieszcza się w stronę doosiową tworząc gradient (strzałka). tasiR-ARF prowadzi do degradacji mRNA genu *ARF3* co powoduje, że obecność białka jest notowana tylko w części brzusznej liścia (wg CHITWOOD i współaut. 2007, CHITWOOD i współaut. 2009).

Sugeruje się, że szlak miR390, tasiR-ARF odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju roślin (AXTELL i współaut. 2007). Poziom miR390 pochodzącego z ekspresji *MIR390b* odzwierciedla stężenie auksyny w organach, a regulacja *ARF2*, *ARF3* i *ARF4* przez tasiR-ARF odgrywa istotną funkcję w rozwoju organów bocznych, w tym korzeni i liści (HUNTER i współaut. 2006, CHITWOOD i współaut. 2007, MARIN i współaut. 2010, YOON i współaut. 2010). Szczegółowe dane dotyczące zależności między ilością miR390, tasiR-ARF i *ARF3* pochodzą z badań nad rozwojem liści *A. thaliana*. Wykazały one, że miR390 akumulowany jest w obrębie całego liścia. Ekspresja genu *TAS3A* zachodzi w części górnej i tam tasiR-ARF występuje w największej ilości. Cząsteczki tasiR-ARF mają zdolność przemieszczania między komórkami, w konsekwencji tworzy się gradient ich stężenia w stronę dolnej części rozwijającego się organu. Gradient ten w konsekwencji przekłada się na ilość mRNA *ARF3* - największa jego ilość występuje po stronie dolnej i zanika w kierunku górnym (Ryc. 3) (CHITWOOD i współaut. 2009).

Ekspresja *MIR390* jest również indukowana podczas inicjacji powstawania korzeni bocznych, w rejonach której jego produkt ulega akumulacji i wpływa na lokalną syntezę ta-siRNA. Powstałe w primordium korzenia bocznego tasiR-ARF hamując aktywność *ARF2*, *ARF3* i *ARF4* promują wzrost tego organu. Te z kolei są potrzebne do prawidłowej ekspresji *MIR390* poprzez pętlę sprzężenia zwrotnego (MARTIN i współaut. 2010, YOON i współaut. 2010).



## PODSUMOWANIE

W przeciągu ostatniej dekady ilość opisanych, małych regulatorowych sRNA znacząco wzrosła (KOZOMARA i GRIFFITHS-JONES 2011), umożliwiając szersze poznanie zaangażowania zarówno mi-, jak i siRNA w regulację rozwoju roślin. Ewolucyjnie zachowane mikro RNA często wpływają, podobnie jak fitohormony, na szereg procesów rozwojowych (VOINNET 2009). Badania ostatnich lat wykazały, że działanie sRNA często związane jest właśnie z regulacją hormonalną roślin, poprzez wpływanie przede wszystkim na lokalizację tkankową i czasową elementów szlaków hormonalnych (CURABA i współaut. 2014). Ogromny postęp w zrozumieniu działania sRNA przyniosło poznanie możliwości przemieszczania się siRNA pomiędzy komórkami i tworzenia gradientu stężeń, podobnie jak to ma miejsce w przypadku hormonów (MARIN i współaut. 2010, SI-AMMOUR i współaut. 2011). Ponadto sRNA stanowią często „łączniki” pomiędzy działaniem różnych fitohormonów (CURABA i współaut. 2014). Przyszłość pokaże jak bardzo jest to istotne dla całościowej koordynacji rozwoju organizmów roślinnych.

## STRESZCZENIE

Auksyna wpływa na większość procesów wzrostu i rozwoju roślin. Szlak transdukcji sygnału auksyn tworzony jest przez komponenty białkowe, z których kluczowe są: receptory z rodziny TAAR (TIR1 oraz AFB1-3), represory odpowiedzi na auksynę AUX/IAA i czynniki transkrypcyjne AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF). Aktywność genów kodujących niektóre elementy tego szlaku jest regulowana przez niskocząsteczkowe regulatorowe RNA, miRNA (micro RNA), i siRNA (short-interfering RNA), endogenne, niekodujące małe RNA (small RNA, sRNA) o długości 20-25 nukleotydów, różniące się sposobem powstawania (prekursorowymi molekułami i szlakami syntezy) oraz funkcją. Sekwencje TIR1 i AFB1-3 zawierają miejsce docelowe dla miR393 i drugorzędowe dla siTAAR. Transkrypt genu IAA28 jest celem dla miR847. Ekspresja genów: ARF10, ARF16 i ARF17 podlega bezpośredniej kontroli przez miR160, ARF6 i ARF8 przez miR167, natomiast ekspresja ARF2-4 podlega regulacji przez miR390 za pośrednictwem ta-siRNA pochodzącego z locus TAS3. sRNA wpływają przede wszystkim na lokalizację tkankową i czasową opisanych elementów szlaku auksynowego.

## LITERATURA

- ADENOT X., ELMAYAN T., LAURESSERGUES D., BOUUTET S., BOUCHÉ N., GASCIOLLI V., VAUCHERET H., 2006. *DRB4-Dependent TAS3 trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7*. *Curr. Biol.* 16, 927-932.
- AXTELL M.J., SNYDER J.A., BARTEL D. P., 2007. *Common functions for diverse small RNAs of land plants*. *Plant Cell* 19, 1750-1769.
- BLEVINS T., RAJESWARAN R., SHIVAPRASAD P. V., BEKNAZARIANTS D., SI-AMMOUR A., PARK H.-S., VAZQUEZ F., ROBERTSON D., MEINS F. JR., HOHN T., POOGGIN M. M., 2006. *Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing*. *Nucl. Acids Res.* 34, 6233-6246.
- BONNET E., VAN DE PEER Y., ROUZÉ P., 2006. *The small RNA world of plants*. *New Phytologist* 171, 451-468.
- BRIODES F., JOLY C., SZÉCSI J., VARAUD E., LEROUX J., BELLVERT F., BERTRAND C., BENDAHMANE M., 2009. *Jasmonate controls late development stages of petal growth in Arabidopsis thaliana*. *Plant J Cell Mol Biol* 60, 1070-1080.
- BRODERSEN P., VOINNET O., 2006. *The diversity of RNA silencing pathways in plants*. *Trends Genet.* TIG 22, 268-280.
- BRODERSEN P., SAKVARELIDZE-ACHARD L., BRUUN-RASMUSSEN M., DUNOYER P., YAMAMOTO Y. Y., SIEBURTH L., VOINNET O., 2008. *Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs*. *Science* 320, 1185-1190.
- CHEN X., 2005. *MicroRNA biogenesis and function in plants*. *FEBS Lett.* 579, 5923-5931.
- CHEN X., 2009. *Small RNAs and their roles in plant development*. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 25, 21-44.
- CHITWOOD D. H., GUO M., NOGUEIRA F. T. S., TIMMERMANS M. C. P., 2007. *Establishing leaf polarity: the role of small RNAs and positional signals in the shoot apex*. *Development* 134, 813-823.
- CHITWOOD D. H., NOGUEIRA F. T. S., HOWELL M. D., MONTGOMERY T. A., CARRINGTON J. C., TIMMERMANS M. C. P., 2009. *Pattern formation via small RNA mobility*. *Genes Develop.* 23, 549-554.
- CSORBA T., PANTALEO V., BURGYÁN J., 2009. *RNA silencing: an antiviral mechanism*. *Adv. Virus Res.* 75, 35-71.
- CURABA J., SINGH M. B., BHALLA P. L., 2014. *miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways*. *J. Exp. Bot.* 65, 1425-1438.
- DEPUYDT S., HARDTKE C. S., 2011. *Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation*. *Curr. Biol.* 21, R365-R373.
- DHARMASIRI N., DHARMASIRI S., ESTELLE M., 2005. *The F-box protein TIR1 is an auxin receptor*. *Nature* 435, 441-445.
- DHARMASIRI N., DHARMASIRI S., WELJERS D., LECHNER E., YAMADA M., HOBBIE L., EHRISMANN J. S., JÜRGENS G., ESTELLE M., 2005. *Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins*. *Develop. Cell* 9, 109-119.
- DUAN C.-G., WANG C.-H., GUO H.-S., 2012. *Application of RNA silencing to plant disease resistance*. *Silence* 3, 5.
- EBERT M. S., SHARP P. A., 2012. *Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes*. *Cell* 149, 515-524.
- ELLIS C. M., NAGPAL P., YOUNG J. C., HAGEN G., GUILFOYLE T. J., REED J. W., 2005. *AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana*. *Development* 132, 4563-4574.
- GLAZIŃSKA P., BRACHA J., WILMOWICZ E., KOPCEWICZ J., 2011. *Udział mikro RNA w rozwoju generatywnym roślin*. *Kosmos* 60, 141-152.
- GÓMEZ G., MARTÍNEZ G., PALLÁS V., 2008. *Virus-induced symptoms in Nicotiana benthamiana plants are dependent on RDR6 activity*. *Plant Physiol.* 148, 414-423.

- GRIFFITHS-JONES S., 2004. *The microRNA Registry*. Nucleic Acids Res. 32, 109-111.
- GRIFFITHS-JONES S., GROCOCK R. J., VAN DONGEN S., BATEMAN A., ENRIGHT A. J., 2006. *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res. 34, D140-144.
- GRIFFITHS-JONES S., SAINI H.K., VAN DONGEN S., ENRIGHT A. J., 2008. *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic Acids Res. 36, 154-158.
- GUILFOYLE T. J., HAGEN G., 2007. *Auxin response factors*. Curr. Opin. Plant Biol. 10, 453-460.
- GUTIERREZ L., BUSSELL J. D., PACURAR D. I., SCHWAMBACH J., PACURAR M., BELLINI C., 2009. *Phenotypic plasticity of adventitious rooting in Arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance*. Plant Cell 21, 3119-3132.
- HEJKA T., KOWALCZYK S., 2006. *Zależna od ubikwityny proteoliza białek w regulacji procesów wzrostu i rozwoju roślin*. Post. Biol. Kom. 33, 159-174.
- HENDERSON I. R., ZHANG X., LU C., JOHNSON L., MEYERS B. C., GREEN P. J., JACOBSEN S. E., 2006. *Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning*. Nature Genet. 38, 721-725.
- HOHN T., VAZQUEZ F., 2011. *RNA silencing pathways of plants: silencing and its suppression by plant DNA viruses*. Biochi. Biophys. Acta 1809, 588-600.
- HUNTER C., WILLMANN M. R., WU G., YOSHIKAWA M., DE LA LUZ GUTIERREZ-NAVA M., POETHIG S. R., 2006. *Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in Arabidopsis*. Development 133, 2973-2981.
- KATIYAR-AGARWAL S., JIN H., 2010. *Role of small RNAs in host-microbe interactions*. Ann. Rev. Phytopathol. 48, 225-246.
- KEPINSKI S., LEYSER O., 2005. *The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor*. Nature 435, 446-451.
- KOZOMARA A., GRIFFITHS-JONES S., 2011. *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res. 39, 152-157.
- KRUSZKA K., PIECZYŃSKI M., WINDELS D., BIELEWICZ D., JARMOŁOWSKI A., SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z., VAZQUEZ F., 2012. *Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments*. J. Plant Physiol. 169, 1664-1672.
- LANET E., DELANNOY E., SORMANI R., FLORIS M., BRODERSEN P., CRÉTÉ P., VOINNET O., ROBAGLIA C., 2009. *Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs*. Plant Cell 21, 1762-1768.
- LAU S., JÜRGENS G., DE SMET I., 2008. *The evolving complexity of the auxin pathway*. Plant Cell 20, 1738-1746.
- LI H., DONG Y., YIN H., WANG N., YANG J., LIU X., WANG Y., WU J., LI X., 2011. *Characterization of the stress associated microRNAs in Glycine max by deep sequencing*. BMC Plant Biol. 11, 170.
- LISCUM E., REED J. W., 2002. *Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development*. Plant Mol. Biol. 49, 387-400.
- LIU P.-P., MONTGOMERY T.A., FAHLGREN N., KASSCHAU K.D., NONOGAKI H., CARRINGTON J.C., 2007. *Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages*. Plant J. 52, 133-146.
- LLAVE C., 2010. *Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions*. Trends Plant Sci. 15, 701-707.
- MALLORY A., VAUCHERET H., 2010. *Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins*. Plant Cell 22, 3879-3889.
- MALLORY A. C., BARTEL D. P., BARTEL B., 2005. *MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes*. Plant Cell 17, 1360-1375.
- MARCINIAK K., TUROWSKI T., WILMOWICZ E., FRANKOWSKI K., KEŚY J., KOPCEWICZ J., 2010. *Ligazy ubikwitynowo-białkowe w szlakach sygnałowych auksyn, jasmonianów i giberelin*. Post. Biol. Kom. 37, 409-432.
- MARIN E., JOUANNET V., HERZ A., LOKERSE A. S., WEIJERS D., VAUCHERET H., NUSSAUME L., CRESPI M. D., MAIZEL A., 2010. *miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth*. Plant Cell 22, 1104-1117.
- MARTIN R. C., LIU P.-P., GOLOVIZNINA N. A., NONOGAKI H., 2010. *MicroRNA, seeds, and Darwin?: diverse function of miRNA in seed biology and plant responses to stress*. J. Exp. Bot. 61, 2229-2234.
- miRBase. (b.d.). Pobrano 22 wrzesień 2015, z <http://www.mirbase.org/>
- MLOTSHWA S., PRUSS G.J., PERAGINE A., ENDRES M.W., LI J., CHEN X., POETHIG R.S., BOWMAN L.H., VANCE V., 2008. *DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis*. PloS One 3, e1755.
- MOCKAITIS K., ESTELLE M., 2008. *Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm*. Ann. Rev. Cell Develop. Biol. 24, 55-80.
- MONTGOMERY T. A., HOWELL M. D., CUPERUS J. T., LI D., HANSEN J. E., ALEXANDER A. L., CHAPMAN E. J., FAHLGREN N., ALLEN E., CARRINGTON J. C., 2008. *Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation*. Cell 133, 128-141.
- MOSHER R. A., MELNYK C. W., 2010. *siRNAs and DNA methylation: seedy epigenetics*. Trends Plant Sci. 15, 204-210.
- NAGPAL P., ELLIS C. M., WEBER H., PLOENSE S. E., BARKAWI L. S., GUILFOYLE T. J., HAGEN G., ALONSO J. M., COHEN J. D., FARMER E. E., ECKER J. R., REED J.W., 2005. *Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation*. Development 132, 4107-4118.
- NAKAZAWA Y., HIRAGURI A., MORIYAMA H., FUKUHARA T., 2007. *The dsRNA-binding protein DRB4 interacts with the Dicer-like protein DCL4 in vivo and functions in the trans-acting siRNA pathway*. Plant Mol. Biol. 63, 777-785.
- NAVARRO B., GISEL A., RODIO M.-E., DELGADO S., FLORES R., DI SERIO F., 2012. *Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins*. Biochimie 94, 1474-1480.
- NAVARRO L., DUNOYER P., JAY F., ARNOLD B., DHARMASIRI N., ESTELLE M., VOINNET O., JONES J. D. G., 2006. *A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling*. Science 312, 436-439.
- NEMHAUSER J. L., FELDMAN L. J., ZAMBRYSKI P. C., 2000. *Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis*. Development 127, 3877-3888.

- NOWAKOWSKA P., KOPCEWICZ J., 2006. *Symplastowy transport białek i RNA u roślin*. Post. Biol. Kom. 3, 473-491.
- OKUSHIMA Y., OVERVOORDE P. J., ARIMA K., ALONSO J. M., CHAN A., CHANG C., ECKER J. R., HUGHES B., LUI A., NGUYEN D., ONODERA C., QUACH H., SMITH A., YU G., THEOLOGIS A., 2005. *Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19*. Plant Cell 17, 444-463.
- OSTROWSKI M., JAKUBOWSKA A., 2008. *Receptory auksyn*. Post. Biol. Kom. 35, 79-95.
- PARRY G., ESTELLE M., 2006. *Auxin receptors: a new role for F-box proteins*. Curr. Opin. Cell Biol. 18, 152-156.
- PERAGINE A., YOSHIKAWA M., WU G., ALBRECHT H. L., POETHIG R. S., 2004. *SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis*. Genes Develop. 18, 2368-2379.
- PIYA S., SHRESTHA S. K., BINDER B., STEWART C. N., HEWEZI T., 2014. *Protein-protein interaction and gene co-expression maps of ARFs and Aux/IAAs in Arabidopsis*. Plant Syst. Synthet. Biol. 5, 744.
- QUINT M., GRAY W. M., 2006. *Auxin signaling*. Curr. Opin. Plant Biol. 9, 448-453.
- ROGERS K., CHEN X., 2013. *Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs*. Plant Cell 25, 2383-2399.
- RU P., XU L., MA H., HUANG H., 2006. *Plant fertility defects induced by the enhanced expression of microRNA167*. Cell Res. 16, 457-465.
- RUBIO-SOMOZA I., WEIGEL D., 2011. *MicroRNA networks and developmental plasticity in plants*. Trends Plant Sci. 16, 258-264.
- SI-AMMOUR A., WINDELS D., ARN-BOULDOIRES E., KUTTER C., AILHAS J., MEINS F., VAZQUEZ F., 2011. *miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 auxin receptor clade and auxin-related development of Arabidopsis leaves*. Plant Physiol. 157, 683-691.
- VAUCHERET H., 2006. *Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations*. Genes Develop. 20, 759-771.
- VAZQUEZ F., 2006. *Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways*. Trends Plant Sci. 11, 460-468.
- VAZQUEZ F., HOHN T., 2013. *Biogenesis and Biological Activity of Secondary siRNAs in Plants*. Scientifica 2013, 783253.
- VAZQUEZ F., VAUCHERET H., RAJAGOPALAN R., LEPELERS C., GASCIOLLI V., MALLORY A. C., HILBERT J. L., BARTEL D. P., CRÉTE P., 2004. *Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs*. Mol. Cell 16, 69-79.
- VERNOUX T., BRUNOUD G., FARCOT E., MORIN V., VAN DEN DAELE H., LEGRAND J., OLIVA M., DAS P., LARRIEU A., WELLS D., GUEDON Y., ARMITAGE L., PICARD F., GUYOMARCH S., CELLIER C., PARRY G., KOUMPROGIU R., DOONAN J. H., ESTELLE M., GODIN C., KEPINSKI S., BENNETT M., DE VEYLDER L., TRAAS J., 2011. *The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex*. Mol. Syst. Biol. 7, 508.
- VIDAL E. A., ARAUS V., LU C., PARRY G., GREEN P. J., CORUZZI G. M., GUTIÉRREZ R. A., 2010. *Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 4477-4482.
- VOINNET O., 2009. *Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs*. Cell 136, 669-687.
- WANG J.-J., GUO H.-S., 2015. *Cleavage of INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE28 mRNA by microRNA847 upregulates auxin signaling to modulate cell proliferation and lateral organ growth in Arabidopsis*. Plant Cell 27, 574-590.
- WANG J.-W., WANG L.-J., MAO Y.-B., CAI W.-J., XUE H.-W., CHEN X.-Y., 2005. *Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in Arabidopsis*. Plant Cell 17, 2204-2216.
- WANG L., HUA D., HE J., DUAN Y., CHEN Z., HONG X., GONG Z., 2011. *Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in Arabidopsis*. PLoS Genet. 7, e1002172.
- WINDELS D., VAZQUEZ F., 2011. *miR393: integrator of environmental cues in auxin signaling?* Plant Signal. Behav. 6, 1672-1675.
- WOODWARD A. W., BARTEL B., 2005. *A receptor for auxin*. Plant Cell 17, 2425-2429.
- WU M.-F., TIAN Q., REED J. W., 2006. *Arabidopsis microRNA167 controls patterns of ARF6 and ARF8 expression, and regulates both female and male reproduction*. Development 133, 4211-4218.
- YANG J. H., HAN S. J., YOON E. K., LEE W. S., 2006. *Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells*. Nucleic Acids Res. 34, 1892-1899.
- YOON E. K., YANG J. H., LIM J., KIM S. H., KIM S.-K., LEE W. S., 2010. *Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development*. Nucleic Acids Res. 38, 1382-1391.
- YOSHIKAWA M., PERAGINE A., PARK M. Y., POETHIG R. S., 2005. *A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis*. Genes Develop. 19, 2164-2175.
- ZHANG X., ZHANG X., SINGH J., LI D., QU F., 2012. *Temperature-dependent survival of Turnip crinkle virus-infected Arabidopsis plants relies on an RNA silencing-based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1*. J. Virol. 86, 6847-6854.
- ZHAO C.-Z., XIA H., FRAZIER T. P., YAO Y.-Y., BI Y.-P., LI A.-Q., LI M.-J., LI C. S., ZHANG B. H., WANG X.-J., 2010. *Deep sequencing identifies novel and conserved microRNAs in peanuts (Arachis hypogaea L.)*. BMC Plant Biol. 10, 3.

**KOSMOS Vol. 65, 3, 399–410, 2016**

INVOLVEMENT OF LOW MOLECULAR WEIGHT REGULATORY RNAS (siRNAS AND miRNAS) IN REGULATION OF AUXIN SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY

PAULINA GLAZIŃSKA, MILENA KULASEK, MICHAŁ GRZECA, WALDEMAR WOJCIECHOWSKI, KATARZYNA MARCINIAK,  
EMILIA WILMOWICZ, JAN KOPCEWICZ

*Chair of Plant Physiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University,  
Lwowska 1 Street, 87 100 Torun; e-mail: Paulina.Glazińska@umk.pl, milena.kulasek@gmail.com, michal.grzeца@gmail.com,  
wwojc@umk.pl, marciniak@umk.pl, emwil@umk.pl, kopcew@umk.pl*

Summary

Auxin affects almost all of the growth and development processes in plants. The auxin signal transduction pathway involves a number of proteins, among which the key elements are: TAAR auxin receptors (TIR1 and AFB1-3), AUX/IAA auxin response repressors and Auxin Response Factor (ARF) transcription factors. The activity of genes encoding some components of this pathway is affected by regulatory low-molecular-weight RNAs - miRNA (micro RNA) and siRNA (short-interfering RNA) - endogenous non-coding 20-25 nucleotides long small RNA (sRNA), differing in the way of formation (precursor molecules and biosynthesis pathways) and function. TIR1 and AFB1-3 contain miR393 target sequence and siTAAR secondary target site. IAA28 transcripts are targeted by miR847. Expression of ARF10, ARF16 i ARF17 is directly controlled by miR160, ARF6 and ARF8 by miR167, and ARF2-4 indirectly by miR390 through TAS3-derived ta-siRNAs. sRNAs influence primarily the tissue and temporal localization of described components of the auxin signal transduction pathway.