

**תפקודי microRNAs בצמחים ירודים: זיהוי ואפיון
microRNAs ותעתיקי-המטרה שלהם מטחב**

**עבודת גמר
מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות
הסביבה של האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת התואר
"מוסמך למדעי החקלאות"**

מאת מלי טלמור-ניימן

אוגוסט 2006

רחובות

אב תשס"ו

עבודה זו בוצעה בהנחייתם של:

ד"ר צחי ארזי, המחלקה לפרחים, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן.
ד"ר נעמי אורי, המכון למדעי הצמח וגנטיקה, בפקולטה למדעי החקלאות, המזון
ואיכות הסביבה, של האוניברסיטה העברית בירושלים.

ברצוני להודות

לד"ר צחי ארזי על ההדרכה, הידע הרב והתמיכה בנועם ובסבלנות לכל אורך הדרך.
לרני סתו על העזרה בעבודה היומיומית ובטיפול בטחבים.
לד"ר עמית גל-און וליואל שיבולת על הסיוע והיעוץ בכל שאלה.
לד"ר נעמי אורי על האוזן הקשבת והדלת הפתוחה לכל בקשה.

לחברי המעבדה רינת יסעור-ברקוביץ' וקובי בוקסדורף על התמיכה, שיתוף הפעולה והאווירה הטובה במהלך העבודה.

לכל חברי המחלקה לפרחים, ובניין גנומיקה והשבחת מטעים במכון וולקני, שתרמו לאווירה הנעימה.

תודה לאוניברסיטה העברית על מילגות המחייה ומילגת לוכסמבורג,
ולמשרד החינוך וארגון בני ברית על המילגות, שהוענקו לי ברוב לב.

לאחרונים אך היקרים מכל: בעלי מיכה ולכל משפחתי המורחבת על שעודדו, דירבנו, ואיפשרו לי להשקיע את מירב המאמצים בעבודת המחקר.

תוכן העניינים

1	תקציר	1
3	1. סקירת ספרות	3
3	1.1 RNAs קטנים ותפקידם בצמחים	3
4	1.2 miRNAs בגנום ולאורך האבולוציה	4
5	1.3 ביוגנזה ומנגנון הפעולה של miRNA	5
8	1.4 זיהוי ואיפיון miRNAs	8
8	1.5 חיזוי ווידוא תעתיקי מטרה של miRNAs	8
9	1.6 ביוגנזה של trans-acting siRNAs	9
11	1.7 RNA polymerase RNA-dependant - אנזים מפתח במטבוליזם siRNAs	11
11	1.8 אבולוציה ושימור בטחב <i>Physcomitrella patens</i>	11
11	1.9 רקומבינציה הומולוגית ב- <i>P. patens</i>	11
12	1.10 הידע על ה-EST והגנום של <i>P. patens</i>	12
12	1.11 מעגל החיים של הטחב <i>P.patens</i>	12
15	הצגת הבעייה	15
15	מטרת העבודה	15
16	2. שיטות וחומרים	16
16	2.1 חומר צמחי ותנאי גידול	16
16	2.2 הפקת חומצות גרעין	16
17	2.3 sRNA Northern blot	17
18	2.4 אנליזה ביואינפורמטית: חיפוש אחר מועמדים ל-miRNAs וחיזוי תעתיקי-מטרותיהם	18
18	2.5 ווידוא תעתיקי-המטרה ע"י מיפוי אתרי החיתוך שלהם	18
19	2.6 זיהוי ואיפיון צמחים שעברו אינטגרציה מלאה של קסטת ה-PpRDR6 knock-out	19
19	3. תוצאות	19
19	3.1 אנליזה ביואינפורמטית לזיהוי miRNAs מתוך אוכלוסיית sRNAs ששובטו מטחב	19
35	3.2 בדיקת ביטוי של miRNAs מועמדים מספריית ה- <i>P. patens</i>	35
39	3.3 בדיקת שימור miRNAs בין טחבים	39
40	3.4 השפעת אוקסין (NAA) על רמת ביטוי של miRNAs	40
42	3.5 חיזוי תעתיקי מטרה של miRNAs שזוהו	42
45	3.6 ווידוא ניסויי של תעתיקי מטרה חזויים	45
48	3.7 sRNAs יחודיים מהספרייה, שאינם miRNAs	48
49	3.8 ווידוא חיתוך קונטיג 13502 ע"י Ppt-miR390a	49
49	3.9 בדיקת הקשר בין המועמדים ל-ta-siRNAs לבין RdRp בטחב	49
54	4. דיון	54
54	4.1 עתיקות הטחב מאפשרת חקר מנגנוני השתקה לאורך האבולוציה	54
54	4.2 אוכלוסיות sRNAs בצמחים	54
54	4.3 שימור miRNAs בין טחב וצמחים עילאיים	54
55	4.4 חיזוי והוכחה של miRNAs ב- <i>P. patens</i>	55
56	4.5 בחינת תבנית הביטוי ותעתיקי המטרה של ה-miRNAs החדשים למען הבנת תפקידם	56
59	4.6 ביוגנזה של miRNA בטחב	59
60	4.7 ta-siRNAs	60
62	רשימת ספרות	62
C	פרסומים שנבעו מעבודה זו.	C
A	תקציר בשפה האנגלית.	A

DCL	Dicer-like
MIRNA	גן המקודד ל-miRNA
miRNA (miR)	microRNA
miRNA*	הרצף המשלים בדופלקס ל-miRNA
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella Patens</i>
pri-miRNA	פרקורסור ראשוני ל-miRNA
Ppt-miR	<i>P. patens</i> miRNA
Pre-miR	פרקורסור שניוני ל-miRNA
RdRp	RNA dependant RNA polymerase
RISC	RNA Induced Silencing Complex
siRNA (siR)	small interfering RNA
sRNA	small RNA
TAS	Trans-Acting siRNA תעתיק היוצר
ta-siRNA	trans acting siRNA

תקציר

small RNAs (sRNAs) הינם RNA קצרים באורך של 20-24 נוקלאוטידים לערך, המעורבים במגוון תהליכי השתקה בבעלי חיים ובצמחים. הם כוללים שתי קבוצות בולטות: small interfering RNA (siRNA), ו-microRNA (miRNA). שתי הקבוצות מעורבות בהשתקת גנים ע"י השתלבות בקומפלקס ה-RISC והנחייתו לחיתוך תעתיקים, המכונים "תעתיקי-מטרה" או לעיכוב תרגומם. זיהוי תעתיקי המטרה על ידי RISC מתבצע על בסיס השלמת בסיסים ל-sRNA. בצמחים miRNAs מבקרים תעתיקים המקודדים למגוון רחב של פקטורי שיעתוק, וחלבונים נוספים המעורבים בבקרה הורמונלית, פולריות וזהות של איברים, פריחה, גדילת העלה, מעברי שלבים התפתחותיים או אף ביוגנזה של sRNAs. מכיון ש-miRNAs נוצרו מוקדם באבולוציה של אאוקריוטים מקובל לחשוב שמילאו תפקידים שמורים במהלך האבולוציה של צמחים. טחבים הינה אחת הקבוצות העתיקות ביותר של צמחי יבשה וכנראה שחולקים אב קדמון עם הצמחים העילאיים. אחת הסיבות שבעקבותיה *Physcomitrella patens* (*P. patens*) משמש כצמח מודל היא שיעור הרקומבינציה ההומולוגית הגבוה בו, המאפשר חיסול גנים בקלות יחסית.

מטרת המחקר הנוכחי הייתה זיהוי ואפיון miRNAs ותעתיקי המטרה שלהם מהטחב *P. patens*. במעבדה שובטו בעבר sRNAs מגמטופיט צעיר (פרוטונומה) של *P. patens*. על מנת לזהות miRNAs מתוך כלל הרצפים בספריה השתמשנו בשלושת הגישות הבאות: חיפוש הומולוגיה בין sRNAs מספרייתנו לבין miRNAs ידועים; חיפוש רצפים החובקים sRNAs מספרייתנו, ודומים לפרקורסור של miRNA; והברידיזציות Northern blot לקביעת הצטברות ה-sRNAs בתא. אסטרטגיה זו הביאה לזיהוי של 28 miRNAs, המתחלקים ל-23 משפחות, מתוכן 4 (miR156, miR319, miR390, miR535) שמורות גם בצמחים עילאיים. בנוסף, זוהו 3 תוצרי ביניים של ביוגנזה miRNAs, אחד מהם אף חזוי לתפקד כ-miRNA. זיהויים מעיד על מעורבות אנזים דמוי Dicer, שעדיין לא אופיינו בביוגנזה של miRNAs בטחב. בזכות השלמת הבסיסים הטובה הקיימת בין רצף ה-miRNA לתעתיקי המטרה בצמחים, נחזו תעתיקי מטרה ל-13 מה-miRNAs, ואף 6 מהם וודאו ניסויית.

מתבנית הביטוי של miRNA ניתן ללמוד רבות על תפקידו בצמח. בבחינת הביטוי של ה-miRNAs שזוהו הבחנו ב-3 תבניות ביטוי: ביטוי ברמה דומה לכל אורך התפתחות הגמטופיט, וביטוי תלוי התפתחות בגמטופיט הצעיר או הבוגר. כמו כן נמצא שביטוי שני miRNAs עולה, ואחד יורד בהשפעת אוקסין.

לאחרונה התגלה בארבידופסיס תעתיק מטרה של miR390 (*TAS3*), המקודד ל-ta-siRNAs ולא לחלבון. זוהי קבוצת siRNAs שזוהתה לאחרונה, ומבקרת שלילית גנים אחרים *in trans* בדומה ל-miRNA, אך בניגוד לו הביוגנזה שלהם תלויה ב-RNA dependant RNA polymerase 6 (RDR6). במהלך האנליזה של הספריה נמצא כי תעתיק-המטרה (contig 13502) של Ppt-miR390a, זהה ל-11 sRNAs מספריית הטחב. גילוי זה הוביל לסדרת ניסויים, שבהם

הוכחה היותו תעתיק מטרה של Ppt-miR390a המקודד ל-ta-siRNAs טחביים. כמו כן נמצא שהביוגנזה שלהם בדומה לאלה של ארבידופסיס תלוייה בהומולוג הטחבי של RDR6, ושקווי RDR6 knock out, שאינם מבטאים ta-siRNAs, מקדימים להתבגר. פנוטיפ זה מזכיר את קווי הארבידופסיס, שנפגמה בהם יצירת ta-siRNAs, שמקורם ב-TAS3.

לסיכום, בעבודה זו זוהו מגוון קבוצות של sRNA בטחב, מתוכם לפחות 23 משפחות של miRNAs. מספר זה אינו נופל ממספר משפחות ה-miRNAs הידועות בצמחים עילאיים בעלי גנום ידוע (ארבידופסיס, אורז, צפצפה). מכך, ששיעור הבקרה ע"י miRNAs בצמחים ירודים כטחבים לפחות שווה בהיקפו לזה שבצמחים עילאיים, עובדה המשקפת את תפקידם המרכזי של miRNAs באבולוציית צמחי היבשה.

1.1 RNAs קטנים ותפקידם בצמחים

בשנת 1999 התגלה ש-RNA קטנים הינם המחוללים של תופעת ההשתקה לאחר שעתוק בצמחים (Post Transcription Gene Silencing) (Hamilton and Baulcombe, 1999). במחקר זה נחשף בצמחים קיומו של עולם ניסתר של RNA קטנים, הקרויים small RNAs (sRNAs), ומעורבים במיגוון תהליכי השתקה לאחר שעתוק. התברר ש-RNA קטנים אלו משמשים בין היתר כבקרים של התפתחות ושל הגנה על הגנום מפני וירוסים וחומצות גרעין זרות (Meins et al., 2005). מערכת בקרה זו, נוצלה לפיתוח טכנולוגיות חדשות לאפיון תפקוד גנים (Novina and Sharp, 2004).

sRNAs הינם מקטעים קצרים באורך של 20-24 נוקלאוטידים לערך, המעורבים במיגוון תהליכי השתקה בבעלי חיים ובצמחים. הם כוללים שתי קבוצות בולטות: הראשונה נקראת small interfering RNA (siRNA), והתגלתה לראשונה בצמחים (Hamilton and Baulcombe, 1999). הקבוצה השנייה קרוייה microRNA (miRNA). היא זוהתה לראשונה בבקרת זמני התפתחות ב-*Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993), ולפני פחות מארבע שנים התגלתה גם בצמחים (Reinhart et al., 2002). הדמיון בין שתי הקבוצות מתבטא במבנה ותפקיד: בשתייהן נוצר דופלקס RNA פולרי קצר, המעורב בהשתקת גנים ע"י ניטרול התעתיקים שלהם, המכונים "תעתיקי-מטרה". השוני בין שתי הקבוצות נעוץ בדרך היווצרותם: siRNAs נוצרים מתעתיקים דו-גדיליים של טרנסקן, וירוס (Hamilton and Baulcombe, 1999), רצף חוזרני אנדוגני או טרנספוזון (Hamilton et al., 2002; Xie et al., 2004) התעתיקים הדו-גדיליים נוצרים בחלק מהמקרים בעזרת האנזים RNA dependant RNA polymerase (RdRp) או לחילופין בעקבות שיעתוק רצף פלינדרומי, היוצר מבנה דמוי סיכת ראש (hairpin) (Chen, 2005). לעומתם, miRNA נוצר מפרקורסור RNA דו גדילי בעל מבנה של סיכת ראש, המשתעתק כולו מגן אנדוגני *MIRNA (MIR)*¹ (Kurihara and Watanabe, 2004). ייחודם של ה-miRNAs נובע גם מהיותם במקרים רבים שמורים בין אורגניזמים (Lagos-Quintana et al., 2001; Reinhart et al., 2002).

הבדל נוסף בין שתי הקבוצות הוא בכך ש-siRNAs מבצעים השתקה *in cis*, כלומר על התעתיקים שמהם נוצרו. זאת בעוד ש-miRNAs מבצעים השתקה *in trans*, כלומר בתעתיקים השונים מהגנים שיצרו אותם במקור (Bartel, 2004; Boutet et al., 2003; Mallory and Vaucheret, 2004; Vazquez et al., 2004a). עם זאת לאחרונה התגלתה בצמחים קבוצה חדשה ויוצאת דופן של siRNAs, אשר חברה נוצרים באופן דומה ל-siRNAs, אך בדומה ל-miRNAs מבצעים השתקה *in trans* (Bartel, 2004; Boutet et al., 2003; Mallory and Vaucheret, 2004).

1 הערת נומנקלאטורה (nomenclature):

- א. microRNAs מכונים miRNA (miR), והגן המקודד להם מכונה *MIRNA (MIR)* (Ambros et al., 2003).
- ב. הפרקורסורים של miR1 יקראו *MIR1a, MIR1b*.
- ג. הפרקורסורים של miR1b, בן משפחתו של miR1, יקראו *MIR1c, MIR1d*.

Peragine et al. (2004); Vazquez et al., 2004a), ומכאן שמה: trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) (al., 2004; Vazquez et al., 2004b).

1.2 miRNAs בגנום ולאורך האבולוציה

MIRs מופיעים כנראה בכל היצורים הרב-תאיים (Bartel, 2004) באזורים אינטֶרֶגְנִיים (בין גנים מקודדים) או בתוך אינטרונים בבע"ח (Voinnet, 2004). היקף ה-*MIRs* המשוער הוא כ-1% מכלל הגנים המקודדים בגנום האורגניזם (Bartel, 2004; Goldberg, 1988; Lim et al., 2003). *MIRs* ממקומות שונים בגנום יכולים לקודד miRNAs זהים (Bonnet et al., 2004).

על פי ה-microRNA registry (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>) ידועים כיום 73 miRNAs בארבידופסיס (Adai et al., 2005; Allen et al., 2005; Gustafson et al., 2005; Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Mette et al., 2002; Palatnik et al., 2003; Wang et al., 2004c), 64 miRNAs באורז (Reinhart et al., 2002; Sunkar and Zhu, 2004; Wang et al., 2004c), ו-37 miRNAs בצפצפה (Dezulian et al., 2005; Liu et al., 2005; Sunkar et al., 2005; Lu et al., 2005).

מידע מועט קיים עדיין על מקורם האבולוציוני של *MIRs* בצמחים. עם זאת הוכחה דרך היווצרות אחת שלהם, והיא ע"י הכפלה במהופך (inverted duplication) של רצף גן המטרה, המקודד לחלבון (Allen et al., 2004). הכפלה זו היא שיצרה את שתי הזרועות במבנה סיכת הראש של פרקורסור ה-miRNA.

בצמחים קיים שימור אבולוציוני של ה-miRNA הַבְּשָׁל, אך לא של כל הפרקורסור (Rhoades et al., 2002). עם זאת, miRNAs אורתולוגים ימצאו תמיד על אותה הזרוע במבנה סיכת הראש במינים השונים (Bonnet et al., 2004). בבדיקה פילוגנטית נמצא כי miRNAs רבים בצמחים נותרו ללא שינוי עוד מלפני תקופת הופעת הצמחים הפורחים. כמו כן נמצאו גני-מטרה בטחבים ושרכים, שהינם הומולוגים לגני-מטרה בארבידופסיס (Axtell and Bartel, 2005). כלומר, שימור ה-miRNAs קיים 450 מיליון שנה בקירוב, מאז התפצלו הטחבים משאר צמחי היבשה (Adai et al., 2005; Bonnet et al., 2004; Jones-Rhoades and Bartel, 2004; Reinhart et al., 2002; Sunkar and Zhu, 2004; Wang et al., 2004c).

miRNAs צמחיים מבקרים תעתיקים המקודדים למגוון רחב של חלבונים, ביניהם פקטורי שיעתוק רבים (Jones-Rhoades et al., 2006). דוגמאות לכך הינם משפחות פקטורי השיעתוק הבאות, המעורבות גם בתזמון פריחה: SPL המעורבת בהנצת עלים ודומיננטיות אפיקלית (Schwab et al., 2005); MYB בפוריות זכרית (Achard et al., 2004); TCP בסימטריות העלה (Palatnik et al., 2003) ועוד. מלבדם, מבקרים miRNAs חלבונים רגולטוריים נוספים בעלי תפקיד בהתפתחות הצמח או ב-signal transduction כגון: TCP4 המעורב בחיוניות שתילים והפרדת פסיגים (Palatnik et al., 2003); ARF16 המעורב במספר השורשים הלטרליים, גודל

הצמח ורמת פוריותו וביטוי גנים המושפעים מאוקסין (Wang et al., 2004c); UBC המעורב בתגובה לפוספט נמוך (Herr et al., 2005) ועוד. כיום ניתן לומר, שגנים המבוקרים ע"י miRNAs, מעורבים בבקרה הורמונלית, יצירת מחיצות, הפרדה, פולריות וזהות של איברים, התפתחות רבייתית, גדילת העלה, מעברי שלבים התפתחותיים או אף ביוגנזה של sRNAs (Chen, 2005).

1.3 ביוגנזה ומנגנון הפעולה של miRNA

miRNA הינו RNA אנדוגני קטן באורך של 21-24 נוקלאוטידים, והוא התוצר הסופי של גן *MIR*, שיכול להכיל אינטרונים ככל גן, ותוצרו הסופי הוא mRNA. 83% מה-*MIRs* מכילים קופסת TATA בת 8 נוקלאוטידים, 29 נוקלאוטידים לפני אתר תחילת השיעתוק (איור 1, שלב 1) (Xie et al., 2005). מיקומה תואם לקופסאות TATA בגנים המקודדים לחלבונים (Patikoglou et al., 2003; Lorkovic et al., 2003; Shahmuradov et al., 1999). ה-*MIR* משועתק ע"י RNA polymerase II (al., 2000; Shahmuradov et al., 2003). *pri-miRNA* אורכו נע בין 70 ל-300 נוקלאוטידים (Jones-Rhoades et al., 2006), והוא בעל CAP ופולי-A (Kim, 2005). הוא מעובד, לפחות פעמיים, ע"י אנזימים מסוג Dicer (DCL1 בארבידופסיס) (Chen, 2005) המכיל: RNA helicase, PAZ, 2 RNase III, dsRNA Binding (dsRBD) domains (Carmell and Hannon, 2004). מנגנון הזיהוי של אתר החיתוך ע"י ה-Dicer טרם ידוע, אך ידוע כי הוא מושפע מהמבנה השניוני ולא מרצף ה-miRNA עצמו, לכן בשמירה על המבנה והיציבות ניתן להחליף את רצף ה-miRNA הבשל, ולא לפגוע בביוגנזה (Parizotto et al., 2004; Vaucheret et al., 2004).

בשלב העיבוד הראשון DCL1 חותך ומבודד מתוך ה-*pri-miRNA* את מבנה סיכת הראש, אשר ניקרא *pre-miRNA* (איור 1, שלבים 2,3). החיתוך מותיר בקצה 3' של ה-*pre-miRNA* עודף של 2 נוקלאוטידים (3' overhang) (Lee et al., 2003). מבנה זה נקשר ע"י ה-PAZ domain של DCL1 (Song et al., 2003; Yan et al., 2003; Zhang et al., 2004). חיתוכים נוספים (איור 1, שלב 4). בארבידופסיס החלבון הגרעיני HYL1 (Han et al., 2004; Park et al., 2004a; Vazquez et al., 2002) בעל שני מוטיבים הקושרים dsRNA, מעורב בשלבי החיתוך יחד עם DCL1 (איור 1, שלבים 2,3). התוצר הסופי הוא דופלקס של RNA באורך של כ-21 נוקלאוטידים, בעל 3' overhang בשני הגדילים (איור 1, שלב 4) (Chen, 2005; Kurihara and Watanabe, 2004). יש לציין שבארבידופסיס *pre-miR163* עובר שלב עיבוד נוסף ל-*pre-miR163* קצר. הוצע ששלב זה עלול להתרחש בעיקר בפרקורסורים, אשר אורך זרועות סיכת הראש שלהם לפחות 42 נוקלאוטידים (Chen, 2005).

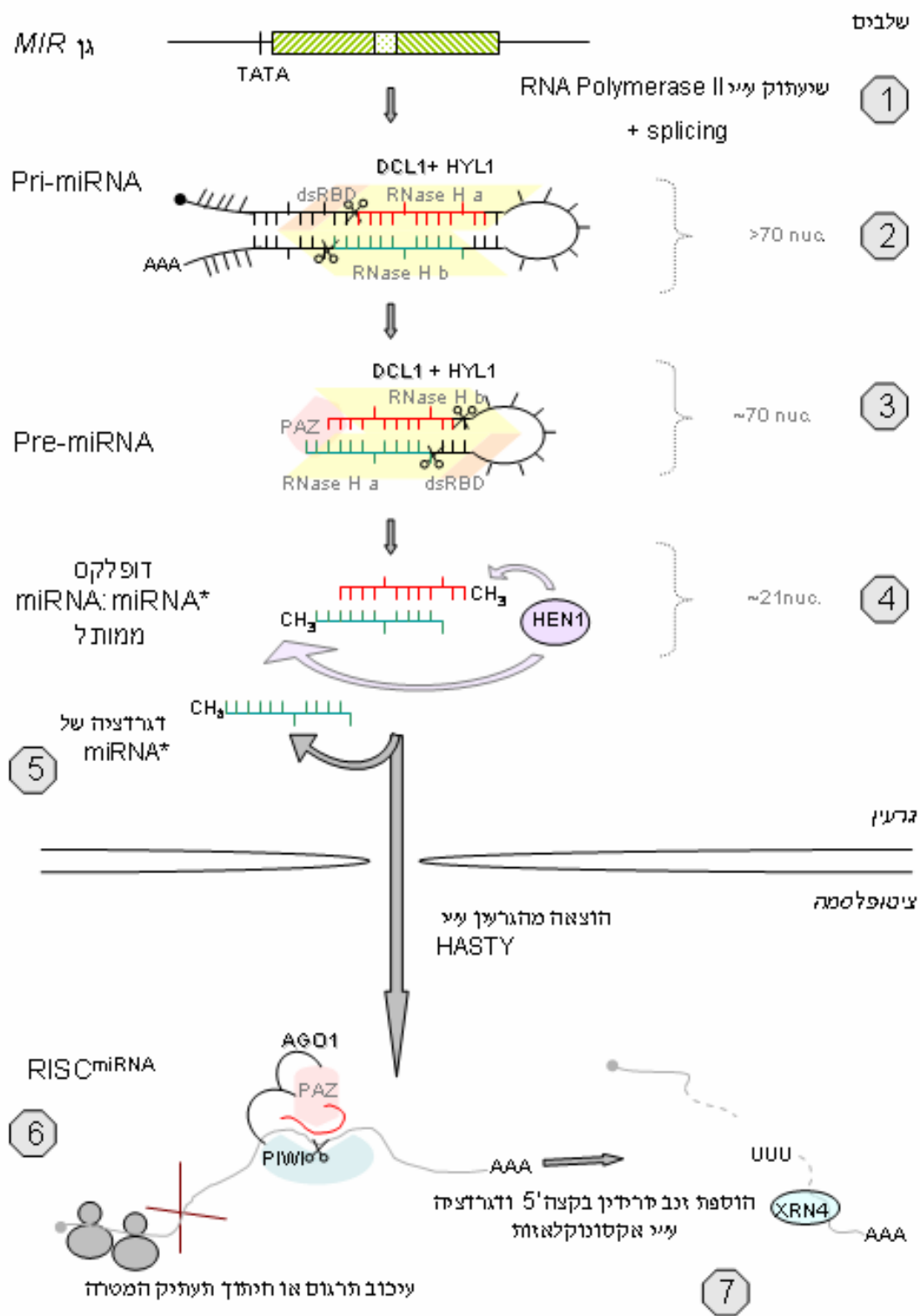
בארבידופסיס החלבון HEN1 מבצע מתילציה של הריבז' בנוקלאוטיד האחרון בשני גדילי הדופלקס (איור 1, שלב 4) ע"י זיהוי המבנה הייחודי שלו ולא דווקא הרצף (Chen, 2005). יתכן כי מתילציה זו מונעת מהדופלקס לעבור דגרדציה או שינוי ע"י אנזימים המעכלים קבוצות הידרוכסיל, נוקלאוטידים אחרונים ברצף או המוסיפים נוקלאוטידים כמו ליגאזות, טרמינל-

נוקלאוטידיל-טראנספראזות או פולימראזות (Li et al., 2005a), ובכך נמנעת הדגרדציה שלהם (Chen, 2005) והטרוגניות בגודל הדופלקסים (Han et al., 2004; Park et al., 2002).

הגדיל בו קצה 5' פחות יציב, הוא ה-miRNA הבשל המשתלב בקומפלקס החלבוני RNA Induced Silencing Complex (RISC) (Lund et al., 2004; Schwarz et al., 2003). הגדיל המשלים לו בדופלקס, ה-miRNA* (איור 1, שלב 5) עובר דגרדציה, ולכן רמתו נמוכה יחסית (Tomari and Zamore, 2005). כפי הנראה שלבי עיבוד ה-miRNA מתרחשים בגרעין (Papp et al., 2003), אך לא ברור עדיין אם הרכבת RISC נעשית בגרעין, והוא מוצא יחד עם ה-miRNA לציטופלסמה ע"י HASTY (הומולוג צמחי של exportin5 בצמחים), או שמא הרכבתו נעשית רק בציטופלסמה. בהמשך, המסלול המרכזי של חיתוך/עיכוב תרגום תעתיק-המטרה מתרחש בציטופלסמה (Chen, 2005).

ב-RISC, מוטען ה-miRNA לחלבון ה-Argonaut (AGO1 בארבידופסיס) (איור 1, שלב 6). זהו Slicer (Baumberger and Baulcombe, 2005) בעל PIWI domain, דמוי קערה, שעליו יושב PAZ domain. ה-PAZ domain, נקשר לקצה 3' הבולט של ה-miRNA, ומאפשר את הטענת קצה 5' שלו לתוך ה-PIWI domain (Tomari et al., 2004). תעתיק-המטרה ממוקם ב-AGO1 (Collins and Cheng, 2005) במבנה היוצר קרבה בין העמדות המשלימות לעמדות 10 ו-11 של ה-miRNA, מקצה 5' לבין האתר הקטליטי של ה-PIWI domain (Herr, 2005). אתר קטליטי זה הינו אנדוריבונוקלאז, החותך קשר פוספודיאסטרי אחד, O-P, בתעתיק המטרה (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b; Liu et al., 2004; Parker et al., 2005; Song et al., 2004).

לאחר חיתוך תעתיק-המטרה תוצרי החיתוך עוברים דגרדציה ע"י אקסוריבונוקלאזות: החלק הנושא את קצה 5' שלה עובר דגרדציה ע"י 3'-5' אקסונוקלאז (Souret et al., 2004). לחלק, הנושא את קצה 3' שלה, נוסף זנב Uridine (איור 1, שלב 7), זהו כנראה סיגנל, המזרז את הדגרדציה בכוון 5'-3' (Shen and Goodman, 2004) בארבידופסיס AtXRN4.



איור מס' 1 : המודל המקובל לביגונה של miRNA בצמחים
 מספריים מייצגים אתרי החיתוך. miRNA מסומן באדום, miRNA* בירוק ותעתיק-מטרה באפור. nuc.-nucleotide. הסבר מפורט ניתן למצא בגוף העבודה לפי מספרי השלבים.

1.4 זיהוי ואיפיון miRNAs

miRNAs התגלו עד כה ע"י שלוש גישות מרכזיות: שיבוט ישיר, חיזוי ביואינפורמטי, שלאחריו ווידוא ניסויי ו-forward genetics. הדרך הישירה ביותר היא השיבוט, בה יוצרים ספריית sRNAs לריצוף (Jones-Rhoades et al., 2006). את הרצפים המועמדים ל-miRNAs בוררים על פי הקריטריונים המגדירים miRNA (Ambros et al., 2003; Jones-Rhoades et al., 2006), שיפורטו בפרק התוצאות.

ניתן לוודא ניסויית מועמד לפרקורסור כפי שהוכיחו Parizotto et al., 2004, ע"י שיבוטו במערכת ביטוי יתר (כגון אגרובקטריום), הדבקת צמח הניסוי, ובדיקת רמות ה-miRNA מול WT. שימוש בצמח בעל מוטציית חסר ל-miRNA יהווה ביקורת נוספת לניסוי.

1.5 חיזוי ווידוא תעתיקי מטרה של miRNAs

תעתיקי-מטרה של miRNAs בצמחים, נוטים להכיל אתר קומפלימנטרי יחיד, בעל התאמה טובה למשפחת miRNA אחת, והן מנוטרלים לרוב ע"י חיתוך. זאת בניגוד לבע"ח בהם תעתיקי-המטרה נוטים להכיל מספר אתרי השלמה חלשים, המנוטרלים ע"י עיכוב תרגום (Allen et al., 2004). הדבר מביא לבקרה עדינה אצל בע"ח לעומת בקרת "on-off" בצמחים (Voinnet, 2004).

בזכות ההתאמה הטובה בין רצף ה-miRNA לתעתיק-המטרה בצמחים גני-מטרה של miRNAs בצמחים נחזו באופן אמין *in-silico* (Llave et al., 2002b; Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002; Rhoades et al., 2002; Sunkar and Zhu, 2004; Wang et al., 2004c). שיטה נוספת פחות יעילה לחיזוי תעתיקי-מטרה היא ביצוע microarrays לסריקת כלל הגנום אחר שינויים בביטוי תעתיקים (Lim et al., 2005) בצמחים המבטאים miRNA ביתר או בחסר. אמיתותם של רבים מתעתיקי-המטרה חוזקה ע"י שימור אתרי הבקרה בין ארבידופסיס ואורז (Rhoades et al., 2002)

ווידוא ניסויי של תעתיקי-מטרה משתמש בשיטת RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends (RACE) על מנת לשבט תוצר חיתוך של תעתיק-המטרה. ריצוף תעתיק-מטרה מאושר ניסויית יהיה כזה, שקצה רוב תוצרי החיתוך המשובטים ימצא בסמוך לנוקלאוטידים המשלימים לעמדות 10 ו-11 מקצה 5' של ה-miRNA (Llave et al., 2002a). שיטות ווידוא ניסויית נוספות הן שימוש באינפילטרציה של אגרובקטריום במטרה לבחון חיתוך תעתיק מונחה miRNA בעלי *Nicotiana benthamiana* (Kasschau et al., 2003; Llave et al., 2002a), וב-wheat-germ lysate (Mallory et al., 2002a; Mallory et al., 2004b; Tang et al., 2003). אך בהן, שלא כמו ב-RACE, לא נבחן חיתוך הנעשה בצורה אנדוגנית בצמח המחקר הרלוונטי.

לאחרונה התגלה בארבידופסיס כי תעתיקי-מטרה של miR173, miR390 מקודדים ל-ta-siRNAs ולא לחלבון (Allen et al., 2005). זוהי קבוצת siRNAs באורך של כ-21 נוקליאוטידים שזוהתה יחסית לאחרונה. (Bartel, 2004; Boutet et al., 2003; Mallory and Vaucheret, 2004;)

Vazquez et al., 2004a) בדומה ל-miRNA ובשונה מ-siRNA היא מבקרים שלילית גנים אחרים (Allen et al., 2005) *in trans*. עם זאת, הביוגנזה שלה דומה לזאת של siRNAs בהיותה תלויה ב-RdRp.

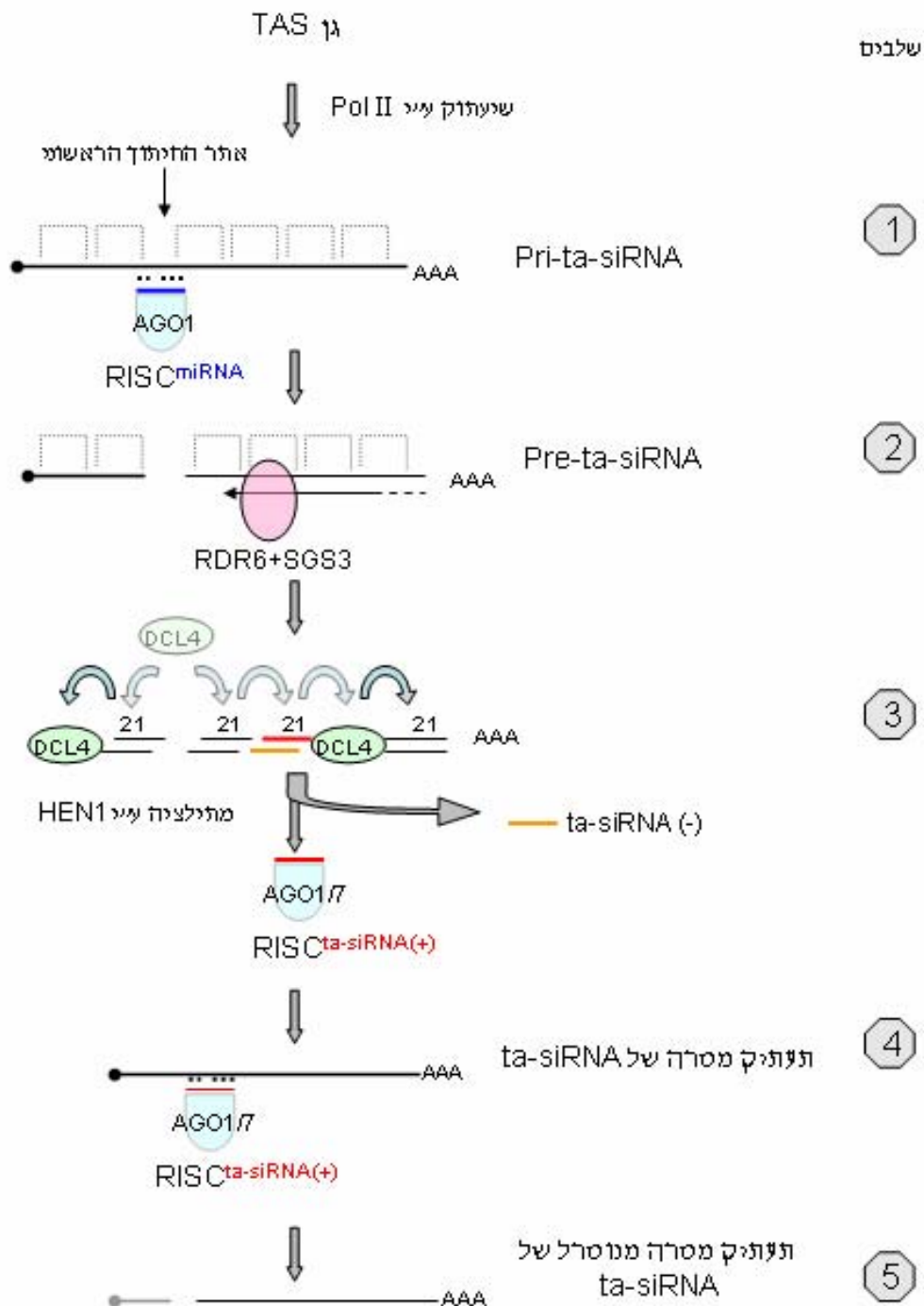
1.6 ביוגנזה של trans-acting siRNAs

גנים של ta-siRNAs משועתקים ע"י RNA Polymerase II ליצירת תעתיקים חד גדיליים, שאינם מקודדים לחלבון. תעתיקים אילו מבוקרים על ידי miRNAs, החותכים אותם בקצה 5' או 3' (איור 2, שלב 1) (Yoshikawa et al., 2005). RDR6 (RDR6) ו-Suppressor of Gene Silencing 3 (SGS3) בארבידופסיס משתמשים בתוצר החיתוך, כתבנית ליצירת מולקולות RNA דו גדילי ארוך (איור 2, שלב 2) (Allen et al., 2005). מולקולות אלה עוברות עיבוד ע"י Dicer (DCL4) בארבידופסיס, החותך אותן מדי 21 נוקלאוטידים (איור 2, שלב 3), וע"י HEN1, המבצע מתילציה בעמדה 3' בריבוז האחרון, למניעת דגרדציה מוקדמת (איור 2, שלב 3) (Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004b). כצפוי מתכונותיהם הידועות של Dicers, שני הגדילים בדופלקסים הנוצרים מהחיתוך, נמצאים בהסטה של שני נוקלאוטידים אחד לשני.

לכל ta-siRNA ישנה התאמה למטרה מסוימת, ולכן החיתוך שלו בפאזה המדויקת הינו חשוב ביותר. דיוק החיתוך מתקיים כנראה הודות למדידה מהאתר מונחה-החיתוך ע"י ה-miRNA, בקצה התעתיק (Allen et al., 2005; Vazquez et al., 2004b). עם זאת נמצא (Allen et al., 2005) כי בחלק מה-ta-siRNAs ישנם אי-דיוקים קלים בפאזה החיתוך, אשר כנראה אינם משבשים את ההומולוגיה לתעתיק מטרה.

לאחר החיתוך, ה-ta-siRNAs הַבְּשֵׁלִים נפרדים מהגדילים המשלימים להם בדופלקס, ומשתלבים בקומפלקסים, שכנראה משתתפים גם במסלולים של miRNAs ו-siRNAs אחרים. קומפלקס RISC^{ta-siRNA} מונחה לתעתיק המטרה (איור 2, שלב 4), ובעזרת AGO1 או AGO7 הידועים כ-slicers (Allen et al., 2005; Jones-Rhoades et al., 2006; Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004b) מביא לחיתוכה (איור 2, שלב 5).

בצמחים בעלי מוטציית איבוד תפקוד של האנזים RDR6 (*rdr6*) לא מתקיימת יצירת ta-siRNAs וישנה הצטברות של מטרותיהם (Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004b). כמו כן מוטנטים אלה מראים האצה של שלב המעבר מהצעיר (*juvenile*) לבוגר בלווי פגמים מורפולוגיים (Allen et al., 2005; Peragine et al., 2004). מעורבותו של RDR6 בביוגנזה של ta-siRNAs מחד, ואי-מעורבותו בביוגנזה של miRNAs מאידך, מציבה אותו בעמדת מפתח להבחנה ביניהם.



איור מס' 2 : המודל לביוגנזה של ta-siRNA על פי הנעשה בארבידופסיס
 המודל נבנה על פי pri-ta-siRNA, המונחה-חיתוך ע"י miRNA בקצה 5' (Allen et al., 2005 ; Xie et al., 2005b). RNA Induced Silencing Complex (RISC) המלבנים הפתוחים מייצגים פאזות של 21 נוקלאוטידים, המיועדים לחיתוך ע"י DCL4, בעקבות חיתוך ראשוני, המונחה ע"י miRNA. בשלב 3 ה-ta-siRNA ההיפותטי, העתיד להשתלב בקומפלקס ה-RISC (ta-siRNA+) מסומן באדום, ואילו המשלים לו (ta-siRNA-) מסומן בכתום.

1.7 RNA polymerase dependant RNA- אנזים מפתח במטבוליזם siRNAs

זוהי קבוצת אנזימים חשובה במטבוליזם של siRNAs הקיימת בצמחים, פטריות ותולעים, אך לא בחרקים וביונקים (Herr, 2005). כיום ידועים 6 חלבונים במשפחה זו בארבידופסיס (RDR1-6). הם אינם מעורבים בביוגנזת miRNAs, אך RDR6 בארבידופסיס נחוץ ליצירת ta-siRNAs (Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004b). RNA חד גדילי חריג, שאינו בעל CAP או פולי-A כמו טרנסקריפציה של RNA שפסק להשתעתק טרם זמנו או RNA שעבר חיתוך, מזוהה ע"י RdRp, שמסתז לו גדיל משלים, והופך אותו למולקולה דו גדילית. מולקולה זו עוברת בהמשך חיתוך ל-siRNAs.

בנוסף לתפקידו ביצירת siRNAs יכול RdRp גם לתחזק השתקת גן, ממנו נוצרו siRNAs. זאת ע"י שימוש ב-siRNA כתחל, וב-RNA ממנו הוא נוצר, כתבנית לסינתזת גדיל משלים. מולקולות ה-RNA הדו גדיליות שנוצרו הן בעלות פוטנציאל עתידי לעבור שוב עיבוד ל-siRNAs (Sijen et al., 2001). בנוסף, סינתזת הגדיל המשלים מתבצעת גם עבור גנים אחרים השכנים באותו תעתיק. בצמחים RdRp מסוגל לסנתז משני כווני התחל, ולכן השתקת גנים נוספים יכולה להתבצע הן בכיוון 5' והן ב-3' של גן המטרה (Sijen et al., 2001; Vaistij et al., 2002).

1.8 אבולוציה ושימור בטחב *Physcomitrella patens*

טחבים מהווים את אחת הקבוצות הקדומות בין צמחי היבשה. הם הופיעו לפני כ-350 מיליון שנה לאחר שהאב הקדמון שלהם התפצל מצמחים פורחים לפני יותר מ-400 מיליון שנה. עם זאת על פי השוואות מאובנים, טחבים השתנו מעט מאוד לאורך השנים (Cove et al., 1997). מחקרים שהשוו את הטרנסקריפטום של *Physcomitrella patens* (*P. patens*) עם זה של *A. thaliana* הראו שלפחות 66% מהגנים בארבידופסיס הינם בעלי הומולוגיה לגנים ב-*P. patens* (Nishiyama et al., 2003).

מחקרים מולקולריים בטחבים נערכו עד היום בעיקר בטחב החד ביתי *P. patens* (Cove, 2000) (Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Bryophyta; Bryopsida;) (Funariidae; Funariales; Funariaceae; Physcomitrella). הסיבה העיקרית לכך הינה שיעור היעילות הגבוה שלו ברקומבינציה הומולוגית.

1.9 רקומבינציה הומולוגית ב-*P. patens*

"החלפת" גן בשיטת מוטגנזה מכוונת ע"י רקומבינציה הומולוגית הינה יעילה ביותר ב-*P. patens* (Reski, 1997) (Schaefer and Zryd, 1997), ואינה נופלת מזו של השמר *Saccharomyces cerevisiae* (Reski, 1998). שיעור היעילות הגבוה שלה נובע מהיותה המנגנון הדומיננטי, המתקן שברי DNA בשני הגדילים, בניגוד לאיחוד קצוות לא הומולוגיים, כפי שקיים לרוב בצמחים ובע"ח (Schaefer, 2001). זוהי כנראה הדרך הטובה ביותר לשמור על מהימנות הגנום ההפלואידי הדומיננטי בבריופיטים (Bryophytes) (Schaefer, 1994; Schaefer and Zryd, 1997; Schaefer and Zryd, 1997).

(2001), כלי יעיל זה, יחד עם הפלואידיות הטחב, מאפשרים בקלות יחסית ביצוע שינוי בגן על ידי החסרת הגן או הפרומוטר, החלפתו בוורסיה בעלת מוטציה נקודתית והכנת אוסף אללים מוטנטים (Reski, 1998; Schaefer and Zryd, 2001).

1.10 הידע על ה-EST והגנום של *P. patens*

ל-*P. patens* $n=27$ כרומוזומים באורך של $1-2\mu\text{m}$ (Reski et al., 1994). הגנום שלו גדול למעלה מפי שלוש לערך מזה של ארבידופסיס, 460Mbp (Reski, 1999). לאחרונה פורסם רצף גנום ה-*P. patens* הגולמי, שנעשה בשיטת shotgun genome sequence, והוא מכיל 7,341,086 רצפים (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi), שטרם עברו אנוטציה. בנוסף, על פי ה-NCBI taxonomy browser (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi) ידועים ב-*P. patens* נכון לשנת 2006, 140,616 ESTs, 932 רצפים נוקלאוטידיים אחרים ו-665 חלבונים הגלויים לציבור. על פי האתר (http://moss.nibb.ac.jp/) PHYSCObase, ESTs אלה נותחו, אורגנו למעלה מ-15,000 קונטיגים, וחלקם עברו אנוטציה. יתר על כן, 110,000 ESTs נוספים רוצפו, אך עדיין אינם פתוחים לציבור הרחב (Rensing et al., 2002). גנום כלורופלסט הטחב רוצף אף הוא (Sugiura et al., 2003), ונמצא מכיל 122,890bp, ומקודד ל-31 tRNAs ו-4 rRNAs.

1.11 מעגל החיים של הטחב *P. patens*

מעגל החיים המתואר בפרק זה הובא ממאמרו של (Reski, 1998), ומסוקר שם בהרחבה. *P. patens* הינו צמח בר חלוף, המתפתח בתחילת הקיץ מנבגים (ספורות) שנוצרו בשלהי הקיץ הקודם ושרדו את החורף. תפוצתו באזורים ממוזגים, הוא גדל לצד נהרות, אגמים, ביצות, שדות לחים וכדומה (Schulte and Reski, 2004). הוא תלוי במים לצורך התרבותו, אך מסוגל לשרוד ביובש מסוים (Schaefer and Zryd, 2001). כמו כן הוא חסר צינורות הובלה, ולכן מפריש לסביבתו הלחה הורמונים צמחיים (Reutter, 1997) לשם תקשורת בין חלקי הצמח השונים ובין צמחי טחב שונים הגדלים באותו מדיום. מעגל החיים של *P. patens* בטבע אורך כ-3 חודשים. המופע המרכזי במעגל החיים של הטחב הוא דור הגמטופיט ההפלואידי פוטוטרופי, אשר תומך בדור הספורופיט הדיפלואידי הפשוט יחסית. הגמטופיט קיים בשתי צורות מורפולוגיות שונות: הצורה הצעירה החוטית הנקראת protonema (איור 3, תמונה 3), והצורה הבוגרת הנקראת gametophore (איור 3, תמונות 7-8) ודומה לצימחון בעל גבעול ואברים דמויי עלים.

א. פרוטונמה - הגמטופיט הצעיר

מחזור החיים של הטחב מתחיל בנבג, ממנו מנץ הגמטופיט הצעיר, הפרוטונמה. תחילה מוצגת הפרוטונמה במופע של תאים בלתי ממויינים (כלורונמה), ולאחר מכן במופע של תאים ממויינים (קאלונמה).

תאי כלורונמה (איור 3, תמונות 2,4) הינם תאים פוטוסינתטיים קצרים יחסית המכילים מספר כלורופלסטים עגולים. הם מתרבים ע"י התחלקות התא האפיקלי, כך שנוצרת שושלת ישרה של תאים. התאים התת-אפיקליים יכולים להתחלק גם הם וליצור ענפים צדדיים, אך בד"כ אין הדבר

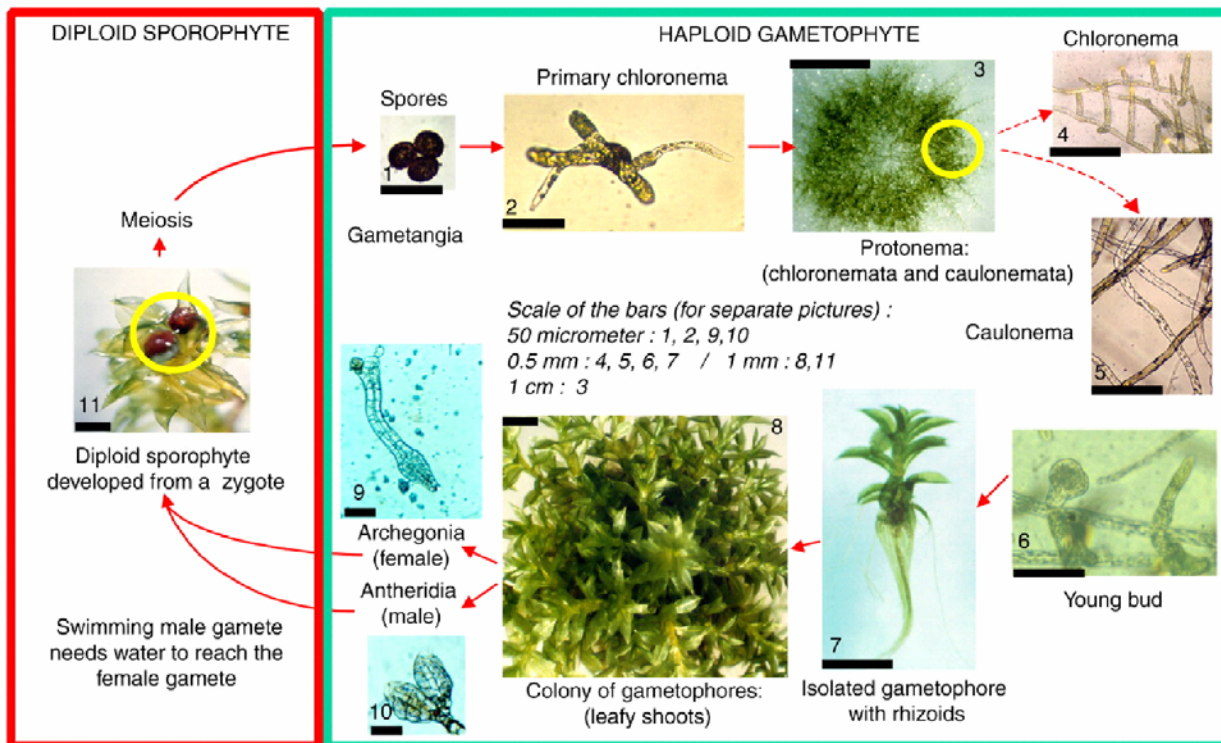
קורה יותר מפעמיים (איור 3, תמונה 4) (Cove, 2005). הסתעפות הכלורונמה מושרת ע"י תנאי אנרגיה נמוכה כמו מעט אור, וגם ע"י ציטוקינין (Thelander et al., 2005). בהמשך, תאי הכלורונמה, מתמיינים לתאי הקאולונמה, והתפשטות הכלורונמה מעוכבת (Thelander et al., 2005). אוקסין (Johri and Desai, 1973; Ashton et al., 1979) ותנאי אנרגיה גבוהה, כמו אור חזק וגלוקוז משרים יצירת תאי קאולונמה, ואילו ציטוקינין (Thelander et al., 2005) ו-ammonium tartrate כמקור חנקן (Jenkins, 1983) מעכבים את יצירתם.

תאי הקאולונמה (איור 3, תמונה 5) הינם ארוכים, דקים, בעלי כלורופלסטים קטנים ומעטים, דופן התא שלהם אלכסוני ביחס לציר הגדילה, וישנה בהם הסתעפות רגולרית (Bopp, 1979; Knoop, 1984) בניגוד לתאי הכלורונמה. ענף צדדי של קאולונמה חוזר בדרך כלל לשושלת של תאי כלורונמה, אך לעיתים ישנה המשכיות של תאי קאולונמה או התפתחות של ניצן (Cove, 2005). מבסיס הניצן/הגמטופור יוצאים בצורה רגולרית תאים הנקראים ריזואידים (איור 3, תמונה 7). ניתן להבחין גם בריזואיד בודד היוצא ישירות מהנבג (Schoene, 1906). תאים אלה דומים מורפולוגית לקאולונמה אך ניתן להשוותם לשורשים (Schaefer and Zryd, 2001). הם גרביטרופיים חיוביים, אינם מסועפים ואינם מבצעים פוטוסינתזה (Schaefer and Zryd, 2001).

ב. המעבר לגמטופיט הבוגר - הגמטופור

המעבר בגמטופיט בין מופע הפרוטונמה למופע הגמטופור מתבטא בהופעה הראשונה של תא אפיקלי תלת מימדי: הניצן (bud) (איור 3, תמונה 6). יצירתו מושרת ע"י ציטוקינין (Gorton, 1957) וביחס חיובי למספר שעות אור. תאי הבת של התא העליון בניצן מתחלקים בתדירות גבוהה יותר מזו של התא המרכזי, ויוצרים סוללה, ממנה תוצר פרימורדיית העלים (Janzen, 1929). הניצן עתיד להתפתח לגמטופור, שישא את אברי הרבייה (איור 3, תמונה 6).

הגמטופור מורכב מגבעול הנושא ריזואידים מבסיסו, עלים, ואיברי מין נקביים (archegonia) וזכריים (antheridia) (איור 3, תמונות 8-10) בעלי יכולת הפרייה עצמית. העלים הם בעובי של שכבת תאים אחת (Frey, 1981), ומסודרים בצורה ספיראלית סביב ציר הגבעול (איור 3, תמונה 8) (Schaefer and Zryd, 2001). הגבעול והעלים הינם פוטוסינתטיים וחסרי צינורות הובלה. הפרת ושמירת דומיננטיות אפיקלית בטחבים דומה לזו שבצמחים עילאיים.



Schaefer, D. G., et al. Plant Physiol. 2001;127:1430-1438 : הובא מתוך

איור מס' 3: מעגל החיים של הטחב *P. Patens*

(1) נבגים, (2) כלורונמה ראשונית מנצה מהנבג, (3) מושבה של פרוטונמה בגיל 15 יום, (4) כלורונמה מסתעפת, (5) תאי קאולונמה, המאופיינים ע"י דופן אלכסונית לציר הגדילה, ומספר מועט של כלורופלסטים, (6) מעבר ממבנה חוטי דו-מימדי למבנה תלת מימדי, עם הופעת ניצן צעיר, (7) הניצן מתפתח לגבעול עם עלים, הוא הגמטופור, (8) גמטופיט בוגר בן 4 שבועות, (9) archegonia (נקבי), שהוצאה מגמטופור, (10) שני antheridia (זכרי), שהוצאו מגמטופור, (11) לאחר הפרייה ע"י שחיית הספרמטוזואידים במים, תא הביצה מתפתח לספורופיט דיפלואידי קטן, אשר בתוך הקפסולה שלו מתרחשת מיוזה. כתוצאה ממנה נוצרים כ-5000 נבגים בקפסולה. כל המעגל יכול להתרחש במשך 12 שבועות תחת תנאים אופטימליים.

הצגת הבעייה

בשנים האחרונות הולך ומצטבר מידע על sRNAs בכלל ועל miRNAs בפרט בצמחים עילאיים. למרות זאת, אין כמעט מידע על miRNAs בצמחים ירודים. מידע זה חיוני על מנת להרחיב את הבנתנו לגבי תפקידיהם של ה-miRNAs בצמחי היבשה. לאור זאת:

מטרת העבודה: תפקודי miRNAs בצמחים ירודים: זיהוי ואפיון microRNAs

ותעתיקי המטרה שלהם מטחב

מטרות משנה:

- א. אנליזה ביואינפורמטית של small RNAs, ששובטו מטחב וזיהוי ה-miRNAs מביניהם.
- ב. איפיון תבנית הביטוי של ה-miRNAs, שזוהו, לאורך התפתחות הגמטופיט.
- ג. חיזוי ווידוא תעתיקי המטרה של ה-miRNAs שזוהו.

2. שיטות וחומרים

2.1 חומר צמחי ותנאי גידול

הפרוטונמה של הטחב *P. Patens* גודלה על מצע מינימאלי מוצק בשם PPNO3, המתואר ע"י (Ashton et al., 1979). במקומות המצוינים הוספו למצע 2.7mM NH_4 tartrate, המעכב את התמיינות הפרוטונמה לגמטופורים. מצע מסוג זה קרוי PPNH4. הפרוטונמה גודלה בצלחות פטרי בקוטר של 9 ס"מ על גבי דסקית צלופן בקוטר של 8 ס"מ (type 325P, A.A. Packaging Limited, Preston UK) שהונחה על גבי מצע מוצק המכיל 0.7% אגר (Merck 1614), וכוסה. צלחות הפטרי גודלו בחדר גידול ב $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. הצלחות הווארו מלמעלה ע"י 2-4 נורות פלורוסנט (Osram L 18W/10) במשטר של 16 שעות אור ו-8 שעות חושך ביממה. הפרוטונמה הורבתה וחדשה מידי שבוע ע"י טחינה בהומוגניזר מסוג פוליטרון (type PT 1600E, Kinematika) וחולקה למספר צלחות חדשות. על מנת לבדוד גמטופורים בוגרים פיסות קטנות באורך של עד 4 מ"מ של פרוטונמה בת שבוע גודלו על מצע מינימאלי מוצק בצלחות פטרי בקוטר של 9 ס"מ למשך 30 יום, תחת אותם תנאי טמפ' ותאורה. בידוד הגמטופורים הבוגרים מהפרוטונמה התבצע ע"י חיתוך גבעוליהם מ"מ אחדים מפני מצע האגר ע"י מספריים עדינות. בניסויים שנועדו לבחון השפעות ארוכות טווח של אוקסין על ה-sRNAs, גודלה פרוטונמה לאחר טחינה בהומוגניזר על מצע NH_4 מינימאלי בתוספת $5\ \mu\text{M}$ של 1-naphthalene acetic acid (NAA, Sigma) על גבי צלופן למשך שבוע. לעומת זאת, בניסויים שנועדו לבחון השפעות קצרות טווח של הורמונים אקסוגניים אילו על ה-sRNAs, דסקיות צלופן שעליהן פרוטונמה בת שבוע הועברו לצלחות פטרי המכילות מצע מוצק מינימאלי בתוספת של $5\ \mu\text{M}$ הורמון למשך הזמן המצוין.

2.2 הפקת חומצות גרעין

RNA כללי הופק מפרוטונמה או מגמטופורים בעזרת TRI reagent (Sigma) על פי הוראות היצרן. בנוסף, הפאזה העליונה של הנוזל במבחנה, המכילה את פרקציית ה-RNA, נוקתה מעבר להוראות היצרן, וזאת על ידי שתיים עד שלוש פנולציות בעזרת 25:24:1 phenol/chloroform/isoamil alcohol, על מנת להסיר מהפרקציה חלבונים קושרי sRNA. לאחר שלב הוספת ה-isopropanol, במקום אינקובציה של 5 דקות בטמפ' החדר, קוררה הדוגמא ב- 20°C למשך לילה אחד לפחות. שלב זה נועד לשפר את שקיעת ה-sRNA. לאחר סרכוז בקור למשך חצי שעה לפחות, נשטף הפלט באתנול, הורחף ב-50% formamide (Sigma) ונשמר ב- 80°C עד לשימוש. עבור דוגמאות RNA שרוכזה בהם פרקציית ה-sRNAs, ההרחפה נעשתה במים בלבד. הדוגמא סרוכזה מספר שניות בטמפ' החדר על מנת לסלק משקעים שאינם מסיסים במים, והפרקצייה העליונה הועברה בקולונות ריכוז microcon YM-100 על פי הוראות היצרן. במידה ונפח הדוגמא היה גבוה מדי, היא הושקעה למשך הלילה עם 100% אתנול $2.5 \times$, 0.1 נטרן אצטאט

ו- $2-3 \mu\text{l}$ גליקוגן (Glicoblue, Ambion). לכל הדוגמאות המרוכזות, שהורחפו במים, הוסף פורמאמיד באותו נפח של הדוגמא. הדוגמאות נשמרו ב- 80°C עד לשימוש.

DNA גנומי הופק מפרוטונמה בת 7 ימים בעזרת בופר מיצוי, המורכב מהחומרים הבאים: $10\text{ml } 0.1\text{M Tris-HCl PH}=8.0$, 2g CTAB , 8.3g NaCl , $4\text{ml Na}_2\text{EDTA}$, 2g PVP40 השימוש בבופר הוספו $7 \mu\text{l } \beta$ -מרקפטואתנול ו 10mg חומצה אסקורבית לכל 10ml של הבופר המוכן מראש, והבופר חומם ל 65°C לפני השימוש. לאחר מעיכת פרוטונמה והוצאת המים, הדוגמא נכתשה בחנקן נוזלי והוסף לה 1ml בופר מיצוי עבור פרוטונמה מצלחת אחת. לאחר המשך כתישה הוספת 1ml בופר מיצוי נוספים, והמשך כתישה עד הומוגניזציה. לדוגמא הוסף $15 \mu\text{l RNase A}$ (20mg/ml) והיא הוכנסה לאינקובציה ב 37°C למשך 5 דקות. הוספת $3\text{ml chloroform-isoamyl alcohol}$ (24:1) וערבוב בעזרת vortex. הדוגמא סורכזה במשך 10 דקות, הפרקציה העליונה בודדה והוספו לה 2.1ml איזופרופנול. לאחר ערבוב הדוגמא סורכזה מייד במהירות של $12,000\text{g}$ במשך 5 דקות. שטיפת הפלט התבצעה בעזרת 70% אתנול, ויובשה באויר. הפלט הורחף ב $100 \mu\text{l}$ TE (10mM Tris-HCl ; $\text{PH}=8$, $1\text{mM Na}_2\text{EDTA}$), והמבחנה אף נשטפה ב $100 \mu\text{l}$ TE נוספים. הדוגמא סורכזה במהירות של $12,000\text{g}$ למשך 2 דקות. הפאזה העליונה בודדה, והדוגמא נשמרה ב- 20°C עד לשימוש.

sRNA Northern blot 2.3

RNA כללי ו/או פרקציה מרוכזת של sRNA הופרדה ע"י אלקטרופורזה על גיל 15% פוליאקרילאמיד דה-נטורטיבי, המכיל 7M אוריאה בבופר (45mM Tris-borate, pH 8.0 and TBE 1.0mM EDTA). ה-RNA הועבר ע"י חשמל (electroblotting) לממברנות Zeta-Probe (Bio-Rad) ע"י trans-blot transfer cell (Bio-Rad) למשך שעה ב 500mA . אחרי הטרנספורמציה עברה הממברנה קיבוע בקרינה אולטרה סגולה במכשיר stratallinker (Stratagene) וייבוש באפייה בתנור ב 80°C למשך 15 דקות או לחילופין ייבוש בטמפ' החדר למשך הלילה. גלאים מסומנים רדיואקטיבית הוכנו ע"י סימון קצה של DNA oligonucleotides, המשלימים בדיוק רצפי sRNA, ע"י $\gamma^{32}\text{-ATP}$ בעזרת T4 polynucleotide kinase (NEB). הממברנות עברו פרה-הברידיזציה והברידיזציה ב EZ-hybridization solution (Biological Industries), ב- 40°C . ההברידיזציה ארכה משך לילה אחד. הממברנות נשטפו פעמיים-שלוש בבופר שטיפה ($2\times\text{SSC}$, 0.2% SDS), ב- 50°C . הממברנות עברו אוטורדיוגרפיה בעזרת מכשיר hosphoimager (Fuji). בדיקת צפיפות דנסיטומטרית לתוצאות נערכה ע"י תוכנת ImageJ 1.33u (NIH) על מנת לקבוע את יחסי רמות הביטוי של דוגמאות ה sRNA השונות.

2.4 אנליזה ביואינפורמטית: חיפוש אחר מועמדים ל-miRNAs וחיזוי תעתיקי-

מטרותיהם

חיפוש תעתיקי-מטרה ע"י סריקת רצפים משלימים ל-miRNAs נערך בעזרת תוכנת (PATSCAN Dsouza et al., 1997). חלוקה לקבוצות של הרצפים המועמדים על פי דמיון נערכה בעזרת תוכנת CLUSTALW (Thompson et al., 1994). בדיקת קיפול למבנה סיכת ראש נערכה בעזרת תוכנת MFOLD (Zuker, 2003), ווידוא המבנה ובדיקת אנרגיה חופשית של המבנה ע"י גבולות מובהקות סטטיסטית $0.001 \leq p \leq 0.005$ נערכו בעזרת תוכנת RANDFOLD (Bonnet et al., 2004).

2.5 ווידוא תעתיקי-המטרה ע"י מיפוי אתרי החיתוך שלהם

ראקציות RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends (5'- RACE) בעזרת GeneRacer Kit (Invitrogen) לפי (Llave et al., 2002a). RNA כללי הופק מפרוטונמה בת 10 ימים או גמטופורים בני 45 ימים, שגודלו על מצע מינימאלי בתוספת NH_4 tartrate. Poly(A)-mRNA מוצה בעזרת Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen) ועבר ישירות ליגציה ל-GeneRacer RNA Oligo adaptor ללא שינויים נוספים. התחל של GeneRacer, אוליגו dT-18, נוצל לסינתזת cDNA יחד עם reverse transcriptase superscript II (Invitrogen). ה-cDNA הוגבר עם התחל GeneRacer 5' (5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3') ועם תחלי 3' הבאים:

(5'-TGAACACAAGGTCTTCAGGAATACCCTTAGGAATA-3'),

(5'-GCGGCTGCTCGTAGTTGAAGGAGAAGA-3'),

(5'-GTTCAGCACAGTCCCCACGTATCCAAGAC-3'),

(5'-CGGCAATAACAGGAATCGCGAACACCTTAG-3'),

(5'-GCAGATCGGTGAACCCGCGGTGCTCAC-3'),

(5'- GCCTGTGGCCGGCTAAGACAACAAAATA-3'), הספציפיים לגנים

756726571, pphf2k14, 824685933, 859476845, PpSBP3, contig13502 בהתאמה. על

תוצרי ההגברה של הגנים 756726571, 824685933, 859476845 נעשה גם PCR מקונן (nested)

עם התחל GeneRacer 5' nested (5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'), ועם

תחלי 3' המקוננים הבאים: (5'-CTGCCGCGTAGGCTGCTTGCAAATTAGAC-3'),

(5'-TACGCAAGATAAGCTCCCATTGCCATGAG-3'),

(5'-AGACTCGGCTTTCCGACACAGGTAATGAAGA-3'), הספציפיים לגנים הנ"ל

בהתאמה. שתי ההגברות התבצעו לפי תנאי הוראות היצרן. התוצרים המוגברים בודדו מגיל, שובטו

ורוצפו.

2.6 זיהוי ואיפיון צמחים, שעברו אינטגרציה מלאה של קסטת ה-PpRDR6 knock-

out

צמחים טרנספורמנטים, עמידים לאנטיביוטיקה מסוג G418 נבדקו לשילוב קסטת nptII לתוך הגן *PpRDR6* בעזרת PCR על DNA גנומי. לשם כך הובאו לשימוש שני זוגות התחלים הבאים: הראשון, ספציפי לאזור upstream לנקודת המפגש של RDR6-5' (5'- RDR6-1- 5'-) (5'- AACTACTAGCTGCTCTGATTCTCACTC-3') עם nptII-2 (5'- TCCAGATCATCCTGATCGACAAGAC-3'), והשני ספציפי לאזור downstream לנקודת המפגש של RDR6-3' (3'- TTCAAATTGAGCTCGGAATTCTTCG-3') (RDR6-4-5'-) עם (5'- CTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTG-3') nptII-3. כביקורת על ניסוי ה-PCR, הובאו לשימוש גם תחלים ספציפים ל-PpPDS: PpPDS-fwd (5'- TCCACTACGTGTAAGGAGTACTACGACC-3') ו-PpPDS-rev (5'- CTTGAAATCCTGTACAATGGATTGGG-3').

הסתכלות בצלחות נעשתה בעין ובעזרת בינוקלר Leica M2FL III Microsystem AG, Heerbrugg Switzerland, דרך עדשת plan APO 0.63 לפי ההגדלות המצויינות. התמונות צולמו במצלמת DC200 ונותחו בעזרת תוכנת Leica IM 1000

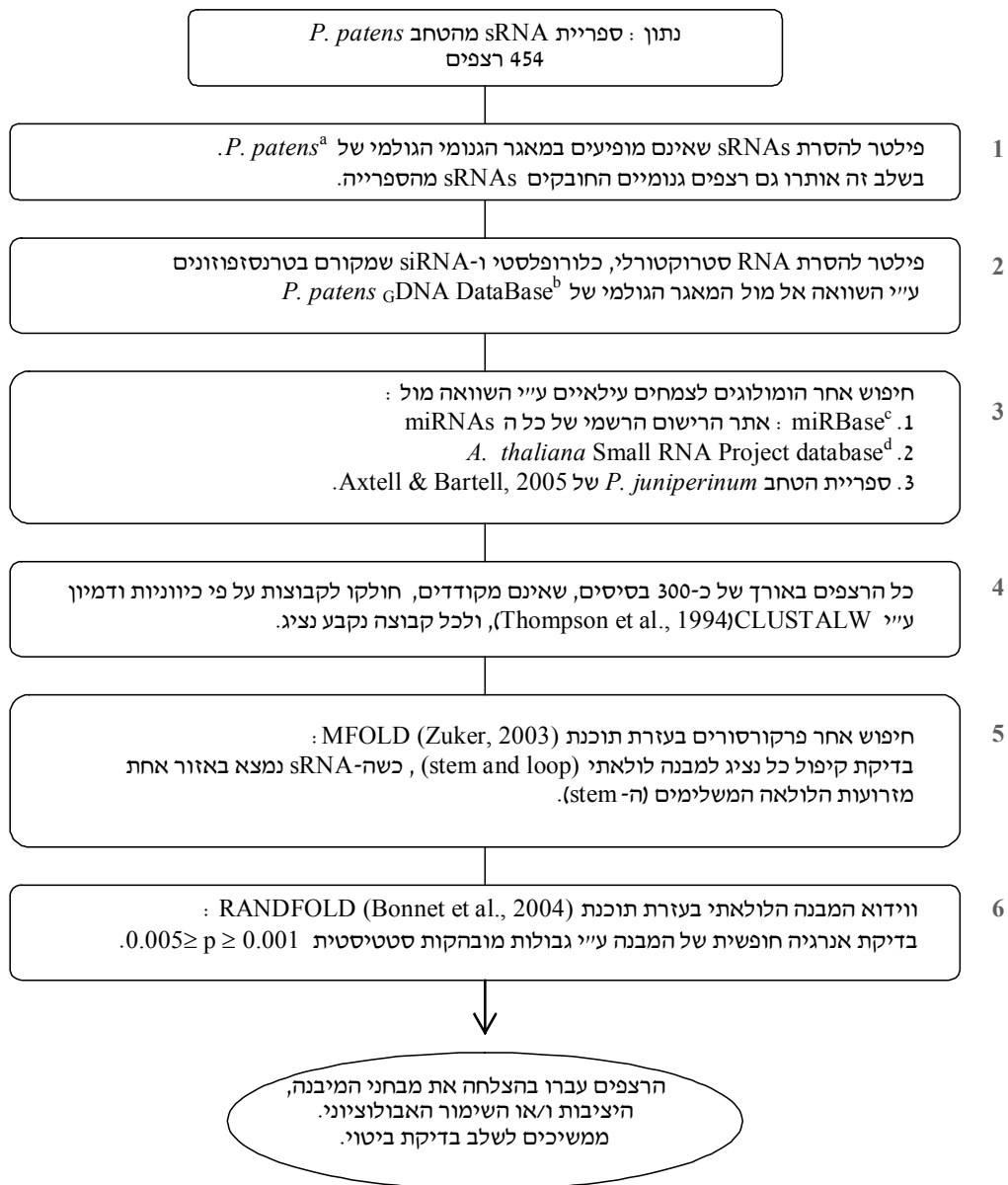
3. תוצאות

בעבודה זו התגלו ב- *P. patens* 28 miRNAs מאושרים ו-2 miRNAs חזויים. לאחרונה, לאחר פרסומים שמותיהם אושרו ע"י ה-microRNA registry. על מנת למנוע בלבול, אכנה אותם על פי שמותיהם המאושרים, כבר מתחילת העבודה.

3.1 אנליזה ביואינפורמטית לזיהוי miRNAs מתוך אוכלוסיית sRNAs ששובטו

מטחב

בעבר שובטו במעבדה small RNA מפרוטונמה. הספרייה נבנתה מפרוטונמה בת 7-10 ימים, שגודלה על מצע $PPNH_4$. תחת תנאי גידול אלה פרוטונמה בגיל זה אינה מתמיינת עדיין, ולכן מורכבת בעיקר מתאי כלורונמה (Reski, 1998). מהספרייה רוצפו בהצלחה 454 רצפים (איור 4, שלב 1), מהם 288 רצפי sRNA ייחודיים (טבלה S1, (Arazi et al., 2005)). על מנת לזהות אילו מהם מועמדים לתפקד כ-miRNAs, נקטנו בגישה ביואינפורמטית המסוכמת באיור 4 ותפורט להלן.



איור מס' 4 : אנליזה ביואינפורמטית לזיהוי miRNAs ב- *P. patens*

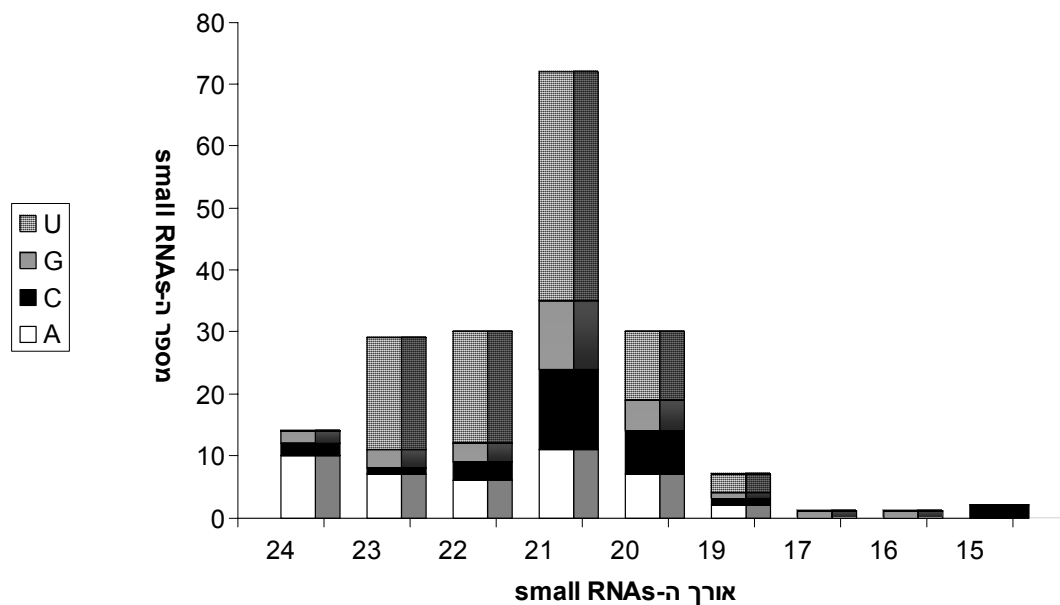
- a- (<http://moss.nibb.ac.jp/blast/blast.html>)
 b- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/trace.cgi>)
 c- (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>)
 d- (<http://asrp.cgrb.oregonstate.edu/>)

כל חלון מייצג שלב המסנן את רצפי הספרייה. רצפים שלא עמדו בקריטריון הסינון לא עברו לשלב הבא. נתונים: 454 רצפים ייחודיים (unique) מהטחב. שלב מס' 1: פילטר להסרת sRNA שאינו מופיע במאגר הגנומי של הטחב. בשלב זה אותרו גם רצפים גנומיים החובקים sRNAs מהספרייה. שלב מס' 2: סינון שברי structural RNA (tRNA, rRNA) שלב מס' 3: סריקת BLAST לחיפוש של miRNAs ידועים מצמחים עילאיים. עבור שלב זה בלבד, כל הרצפים המשיכו לשלב הבא. שלב מס' 4: רצפים שנמצאו בשלב הסינון הקודמים, כחובקים sRNAs מהספרייה, מוינו ליצירת רשימה ייחודית. שלב מס' 5: נבדקה התאמת הרצפים למבנה של פרקורסורים. זאת על פי מידת התאמתם למבנה שניוני יציב של סיכת ראש (Xie et al, 2005). שלב מס' 6: ווידוא המבנה השניוני של המתאימים על פי מובהקותם הסטטיסטית ליציבות.

3.1.1 סינון שברי RNA סטרוקטורלי, כלורופלסטי ומיטוכונדריאלי

לשם ניפוי שברים של RNA סטרוקטורלי, כלורופלסטי ומיטוכונדריאלי, נערכה לרצפי הספרייה המפורסמים בגנום הטחב סריקת BLAST מול בנק הגנים ב- NCBI (איור 4, שלב 2). בחיפוש זה

נתגלו 79 רצפים (27.4%) בעלי הומולוגיה מובהקת ל-RNA ריבוזומלי, ו-23 רצפים (7.9%) בעלי זהות לגנים מכלורופלסט הטחב (Sugiura et al., 2003). רצפים אלו לא נותרו בהמשך העבודה. בדיקת 186 הרצפים הייחודיים שנותרו העלתה כי טווח אורכי הרצפים נע בין 15 ל-24 נוקלאוטידים. רב הרצפים היו בני 21 נוקלאוטידים (איור 5), כפי שמאפיין miRNAs ו-trans-acting RNAs (Reinhart et al., 2002; Vazquez et al., 2004b), ובעלי Uracil בקצה 5' (איור 5), המאפיין את רב ה-miRNAs בצמחים עילאיים (Bartel and Bartel, 2003; Reinhart et al., 2002).



איור מס' 5 : התפלגות רצפי small RNAs יחודיים בספרייה על פי אורך, מספר וסוג הנוקלאוטיד הראשון בקצה 5' התרשים כולל את 186 הרצפים הייחודיים של הספרייה, לאחר סינון שברי RNA סטרוקטורלי, כלורופלסטי ו-siRNA, שמקורם בטרנסזפוזונים.

3.1.2 סריקת BLAST לחיפוש הומולגים של miRNAs ידועים מצמחים עילאיים

נכון לתחילת מחקר זה היה ידוע שתעתיק המטרה של miRNA166/165 בארבידופסיס מצוי בטחבים (Floyd and Bowman, 2004). כדי לבדוק האם בספרייה שלנו קיימים הומולוגים של miRNAs ידועים מצמחים עילאיים, בוצעה סריקת BLASTN של הספרייה מול ה-miRNAs Registry (Ambros et al., 2003), המכיל את כל רצפי ה-miRNAs הידועים, ומול ה-Small RNA Project database *Arabidopsis thaliana* המכיל רצפי sRNA ששובטו מארבידופסיס (איור 4, שלב 3). בסריקה זוהו 6 sRNAs בעלי דמיון רב או זהות ל-miRNA ידועים מצמחים עילאיים (טבלה 1): Ppt-miR156, Ppt-miR390a, הופיעו יותר מפעם אחת בספרייתנו, והיו זהים ל-miR156, miR390 בארבידופסיס, בהתאמה. Ppt-miR319b הופיע גם הוא מספר

פעמים בספרייה, ונמצא זהה ל-miR319b בארבידופסיס, מכך ששני רצפי הספרייה הדומים לו :
 גם Ppt- miR319a, Ppt-miR319c, דמו גם ל-At-miR319. ל-At-miR319 נמצאו רצפים שמורים גם
 בשבעה צמחים עילאיים נוספים (איור 6). רצפי הטחב Ppt-miR319a-c הכילו Cytosine בקצה 5',
 שלא הופיע כלל בכל שבעת הצמחים העילאיים. בנוסף לדמיון בין רצפי הספרייה ל-miRNAs
 ידועים נתגלתה עבור Ppt-miR535 זהות לאזור אינטרגני בכרומוזום 11 באורז. בחינתו של אזור זה
 תתואר בהמשך בפרק 3.1.7.

שם	רצף
Ppt-miR319a	CUUGGACUGAAGGGAGCUCC-
Ppt-miR319b	CUUGGACUGAAGGGAGCUCCC
Ppt-miR319c	CUUGGACUGAAGGGAGCGCC-
At-miR319b ^x	-UUGGACUGAAGGGAGCUCCC
Osa-miR319b ¹	-UUGGACUGAAGGG <u>u</u> GCUCCC

איור מס' 6: הומולוגיה בין sRNAs משובטים מטחב לבין miRNAs ידועים מצמחים עילאיים
 הרצפים הושו ע"י תוכנת CLUSTALW. נוקלאוטידים שמורים מצוינים באותיות גדולות. שינוי ברצף מצוין
 באותיות קטנות ומודגשות. רצפי miRNAs, שמקורם אינו בטחב, נלקחו מה-miRNA registry.
 Pp, *P. patens*; At, *A. thaliana*; Osa, *O. sativa*
^x - miRNA זה זהה/נכלל ב-miRNAs הבאים: *Glycine max*- miR319a, *Medicago truncatula*- miR319, *Populus trichocara*- miR319a,c,d
¹ - miRNA זה זהה/נכלל ב-miRNAs הבאים: *Sorghum bicolor* -miR319, *Zea mays* -miR319b,d.

3.1.3 השוואת רצפי sRNAs בין טחבים

בשל קיום שימור של miRNAs בין צמחים היה עניין להשוות את רצפי הספרייה לרצפים ידועים
 מטחבים אחרים. השוואה לספריית sRNA מהטחב *P. juniperinum*, שהתפרסמה לאחרונה
 (Axtell and Bartel, 2005), הראתה זהות מוחלטת בין Ppt- miR1210, Ppt-miR1212, Ppt-
 miR536, Ppt-miR538 לבין Pj_10, Pj_170, Pj_34, Pj_159 בהתאמה. כמו כן, לרצפים: Ppt-
 miR1213, Ppt-miR1222 הייתה זהות של 90.5% עם הרצפים: Pj_201, Pj_62 בהתאמה (איור
 7). מכך ניתן להסיק כי sRNAs אלה שמורים בקרב הטחבים.

שם	רצף
Ppt-miR1213	GUUGGAAGCCUUCGUGGGAGA
Pj_201	GUU <u>a</u> GAAGCCU <u>u</u> GUGGGAGA
Ppt-miR1222	UUGAAGGAGUUC <u>A</u> UUGGU <u>A</u> U <u>A</u>
Pj_62	UUGAAGGAGUUC <u>a</u> UGGU <u>a</u> <u>c</u> <u>A</u>

איור מס' 7: הומולוגיה בין sRNAs מ-*P. Patens* ומ-*P. juniperinum*
 הרצפים הושו ע"י תוכנת CLUSTALW. נוקלאוטידים שמורים מצוינים באותיות גדולות. שינוי ברצף מצוין
 באותיות קטנות ומודגשות. Pj- *P. juniperinum*.

3.1.4 בדיקת התאמת הרצפים, החובקים sRNAs מהספריה, לפרקורסורים של

miRNAs

אחרי קריטריון השימור בין צמחים, קריטריון חשובים להגדרת miRNA הינו היותו כלול במבנה סיכת ראש אופייני להלן :

4 קריטריונים מבדילים בצמחים miRNAs מ-siRNAs (Jones-Rhoades et al., 2003; Ambros et al., 2006) :
: (et al., 2006)

א. יכולתו של האזור החובק את ה-miRNA להתקפל לפרקורסור דמוי סיכת ראש, המכיל

את ה-miRNA באחת מזרועותיו.

מבנה סיכת הראש יהיה בעל רמת האנרגיה הנמוכה ביותר החזויה בעזרת תוכנת קיפול RNA. עליו לכלול לפחות 16 נוקלאוטידים מתוך 22 הנוקלאוטידים הראשונים של רצף ה-miRNA, ואת המשלימים להם בזרוע השנייה. ה-miRNA כולל בדר"כ עד 7 נוקלאוטידים לא מזווגים, כאשר יש עד 3 כאלה בֶּרֶצֶף, ועד 2 ב-miRNA*. אסור שהמבנה יכיל בליטות או לולאות פנימיות גדולות, בייחוד לא א-סימטריות. המבנה משתנה באורכו, ויכול לנוע מ-70 נוקלאוטידים ועד כמה מאות.

ב. שימור פילוגנטי של ה-miRNA הַבָּשָׁל, והמבנה השניוני של הפרקורסור שלו.

מבנה סיכת הראש, שנמצא שמור, אינו חייב להיות בעל רמת האנרגיה הנמוכה ביותר החזויה, ושיעור התאמת הבסיסים בו תיךמה לזו שבפרקורסור השמור.

ג. זיהוי מקטע RNA באורך של כ-21 נוקלאוטידים ע"י הברידיזצית Northern blot.

עבור צמחים בעלי גנום ידוע, רלוונטי גם הקריטריון הבא :

ד. הוכחת תלות ביטוי ה-miRNA בגנים ייחודיים לביוגנזה של miRNAs.

דוגמא לכך היא DCL1. במקביל יש להוכיח את אי-תלותו בגנים ייחודיים לביוגנזה קבוצות אחרות של sRNAs.

בנוסף, ניתן לחזק את מעמד ה-miRNA ע"י הוכחת הקריטריונים הבאים :

1) זיהויו הן בספריית cDNA של מקטעים קצרים והן ברצף הגנומי של האורגניזם.

2) זיהוי ריצופי של מרכיבי הדופלקס miRNA:miRNA*, הממוקמים במקום

המתאים בסיכת הראש, ונמצאים בהסטה של שני נוקלאוטידים ב-3'.

3) הוכחת תפקוד ההשתקה.

עבור צמחים ללא גנום ידוע, בכדי להוכיח שרצף מסוים הינו miRNA, קריטריון השימור הפילוגנטי לבדו מספיק לקביעת אורתולוג של miRNA. עבור miRNA חדש, די שיקיים את קריטריוני המבנה השניוני והביטוי.

על מנת לזהות אילו sRNAs מספרית הטחב כלולים במבנים שניוניים דמויי סיכת ראש, נבדקו רצפים שנמצאו בשלב הסינון השני חובקים sRNAs מהספריה. לשם יצירת רשימה ייחודית לבדיקת פרקורסורים רצפים אלה מוינו לקבוצות על פי דמיון בעזרת תוכנת CLUSTALW. לכל קבוצה נבחר רצף מייצג באורך של כ-300 נוקלאוטידים (איור 4, שלב 4).

משום שפרקורסור של miRNA אינו מקודד לחלבון, אלא RNA הוא תוצרו הסופי, נערכה לרצפי רשימה זו סריקת tBLASTX לשלילת היותם רצפים המקודדים למסגרת קריאה. מספר sRNAs היו זהים לרצף המקודד לחלבון ולכן לא עברו לשלב הבא. דוגמא אחת לכך הוא Pp_61 שתאם בקוטביות חיובית (sense) לקונטיג 12207. קונטיג זה מקודד באופן מובהק (E value=1E-) לאנזים adenosine 5' phosphosulfate reductase מ-*P.Patens* (CAD22096). דוגמא שנייה היא Pp_57 שתאם בקוטביות חיובית לקונטיג 621, המקודד באופן מובהק (E value=E-06) לפולי-פרוטאין של רטרו-טרנספוזון מדרוזופילה, פולי סויה, תירס ואורז (CAB39733). מכך ניתן לשער כי Pp_57 מייצג sRNA הקשור בטרנספוזון. בצמחים עילאיים כבר שובטו בעבר כמה sRNAs הקשורים ברטרו-טרנספוזונים (Llave et al., 2002b; Yoo et al., 2004). רצפי הרשימה לבדיקת פרקורסורים, שלא נמצאו מקודדים לחלבונים, נבחנו עבור מבנה שניוני מתאים ע"י קיפול *in silico* בעזרת תוכנת MFOLD (איור 4, שלב 5). הרצפים נבדקו ליכולתם להתקפל למבנה שניוני דמוי סיכת ראש, המכיל את ה-sRNA באחת מזרועותיו על פי הקריטריונים הבאים (Xie et al., 2005):

(1) מינימום של 16 בסיסים משלימים, ומקסימום 3 אי-התאמות בדופלקס

ה-miRNA:miRNA*.

(2) דופלקס ה-miRNA:miRNA* חייב להיכלל בזרוע (stem) אחת של סיכת הראש.

3.1.5 ווידוא המבנה השניוני של המועמדים לפרקורסורים על פי מובהקותם יציבות

המבנה

הרצפים בעלי המבנה השניוני הרצוי נבחנו ליציבות תרמודינמית של ערך מינימום האנרגיה החופשית עבור מובהקות סטטיסטית של $0.001 \leq p \leq 0.005$ ע"י תוכנת RANDFOLD (איור 4, שלב 6). הרצפים הבאים התגלו כבעלי יכולת התקפלות יציבה במבנה הרצוי, ולכן נמצאו מתאימים להיות פרקורסורים משוערים של miRNAs (איור 8):

Ppt-MIR156, Ppt-MIR319a-d (miR319a, miR319b), Ppt-MIR390a-c, Ppt-MIR533a-c (miR533a, miR533b, miR533c), Ppt-MIR534, MIR535a-d (miR535a, miR533b), Ppt-MIR536, Ppt-MIR537a-b, Ppt-MIR538a-c, Ppt-MIR1210, Ppt-MIR1211, MIR1212, Ppt-MIR1213, Ppt-MIR1214, Ppt-MIR1215, Ppt-MIR1216, Ppt-MIR1217, Ppt-MIR1218, Ppt-MIR1219a-d (miR1219a, miR1219b), Ppt-MIR1220a-b, Ppt-MIR1221, Ppt-MIR1222, Ppt-MIR1223, Pp_26.533, Pp_44.569.

Ppt-MIR156.271

```

      GU      U U GA      -      GC A U      AUG
5' G G C G      G G G A      G G G      G U G A C A G      A A G A G A G U G A G C A C A      U G G C A G U A C      A
3' U C G C      U U U C C U      C C C      C G C U G U C      U U C U C U C A C U C G U G U      A C C G U C A U G      G
      A G      - U - A      C      G U C U      A A G
-65, 0.001

```

Ppt-MIR156.024

```

      G      C      A      -      G      C      C U      A G G
5' G G G G A G      G G G      G U G A C A      G A A G A G A G U G A G C A C G      U U G G C      G U A C G      \
3' U C C C U C      U C C      C G C U G U      C U U C U C U C A C U C G U G U      A A C C G      C A U G C      A
      -      -      G      A      G      U      U U      A A U
-67.1, 0.001

```

Ath-MIR156

```

      C      A A C      - A A      A      -      -      A      - - -      U U      U A
5' A A G A G A      G C A      G A A      C U G A C A G A A      G A G      A G U G A G C A C      C A A      A G G C A A      U G C A      U
3' U U C U C U      C G U      C U U      G A C U G U C U U      C U C      U C A C U C G U G      G U U      U U C G U U      A C G U      C
      U      A G U      G G C      A      U      G      C      C U C      - C      U A

```

Ppt-MIR319a.995 (Ppt-miR319a)

```

      G      U      U G      C      A      G      U      C      C      G      A A U      C      C      U      U      G C
5' G U G G A G C U C C      U U U C G G U C C A A      A G      G C U G      G      C G G A A G G U      G      C C      G      U      C C G      C A      A C G U      C G G G U      C C      U A U C G G G G      A
3' C A C C U C G A G G      G A A G U C A G G U U      U C      C G G C      G C C U U C C A      C      G G      C      A      G G C      G U      U G C A      G C C U A      G G      A U A G C C C C      G
      -      -      C      U G      -      C      G      U      U      A      G      C C U      U      A      U      C      G G
-99.6, 0.001

```

Ppt-MIR319b.662 (Ppt-miR319b)

```

      - -      U      C A      G      C      A      U A C C      G      A C      A      C      C
5' G A G C U C U U U C A G U C C A G      A G      G C U A A U      U      G A      G G U U G      G C U      C C G      U C A      A C U U      C G G      U U C C A U A U C A C G A
3' C U C G A G G G A A G U C A G G U U      U C      C G A U U G      A      C U      C U A G C      C G A      G G C      A G U      U G G A      G C C      A A G G U A U A G U G C C
      U C      C      U A      G      C      -      U A G U      G      C U      C      A      U
-83.7, 0.001

```

Ppt-Mir319c.036 (Ppt-miR319b)

```

      U      C U      U      U      U      U      U A      -      A      U      G      A C      A      U U C      C      C      U U
5' U A A C C      C A      G G C      G U G G G A G C U U C C U C G G U U C A A      A G      G G C U G A      U G A G G      U U G C      C      G C U      C C G      U C A      A C      C G G      U U C C U C      U C      A
3' A U U G G      G U      C U G      U A C C C U C G A G G G A A G U C A G G U U      U C      U C G A C U      A C U U C      G G C G      G      C G A      G G C      A G U      U G      G C C      A A G G G A      G G      A
      U      U U      -      C      U      C A      U      A      U      G      G U      C      U A A      U      C      U A
-99.1, 0.001

```

Ppt-MIR319d.374 (Ppt-miR319b)

```

      U      U U      U      U G      A      U      U      G      A C      A      U U C      C      C      U      A C
5' C A G C G      G G A G C U      C U U C G G U C C A A      A G      G C U G A G U C G      A G G U U G      G C      G C U      C C G      U C A      A C      C G G      U U C C      U A      C C A      \
3' G U C G C      C C U C G A      G A A G U C A G G U U      U C      C G A U U C G G C      U C U A A C      U G      C G A      G G C      A G U      U G      G C C      A A G G      A U      G G U      C
      C      G G      C      U A      C      U      U      G      A U      C      U A A      U      U      -      C C
-93.4, 0.001

```

Ath-MIR319b

```

      A      U U      C U      U A A U A U      -      - G A      A C      C      A A      A      A A      U
5' A G      G A G C U      C U U C G G U C C A      C A U G G A G      G U G A      G A U U U A A U U      C U C U C G      U C A U U C A U      C A      U A C C A      A U G A      G A A      U
3' U C      C U C G A      G A A G U C A G G U      G U A U C U C      C A C U      C U G A G U U A A      G A G A G C      A G U A A G U A      G U      A U G G U      U A C U      C U U      U
      C      G G      U C      - - - - U U      U      A C A      G U      A      A A      A      - -      G

```

Ppt-MIR390a.281 (Ppt-miR390a)

```

      - -      U      A      A      G      -      U U C U      U      G      - C      U
5' C A U G A      A C A      U U      C G A A G C U C A G G A      G G A U A G C G C C A U      U C U C U G U U C      C U A      C      A C A      U U G G      A
3' G U G C U      U G U      A A      G U U U C G A G U C U U      C C U A U U G C G G U A      A G A G A C G G G      G A U      G      U G U      G A C C      A
      U C      C      G      C      A      U      U A U C      C      -      U C      A
-66, 0.001

```

Ppt-MIR390b.429 (Ppt-miR390a)

```

      A U C A A G C U G C U      A      A      A      G      C C      -      - C      -      U      A U C      U A
5' G G G      G A U A C A      U U      C G A A G C U C A G G A      G G A U A G C G      C A      G C      C U G C      U U U U A C U G U      C A      A G U      G
3' C C C      C U G U G U      A A      G U U U C G A G U C U U      C C U A U C G C      G U      C G      G A C G      A G A A U G A U A      G U      U C G      A
      /      \      C      C      C      A      - A      A      U A      U      -      - C U      U G
(30 nt. side loop)
-75.8, 0.001

```

Ppt-MIR390c.430 (Ppt-miR390b)

5' GGUAAUA UUA A G CAUCUCA UUU - UU A GG
3' CCAUGUU CAG GCUCAGGA GGAUAGCGCC GUC UUUAGC AUCCAA GAA UG \

-60.34, 0.001

Ath-MIR390a

5' GUAG AGAAGA C GU AAGCUCAGGA GGAUAGCGCCA GAU GAU AC U
3' CAUC UCUUCU G UA UUUAGUCCU CCUAUCGCGGU UUA CUA UG U

Ppt-MIR533a.659 (Ppt-miR533a-underlined; Ppt-miR533b-in bold)

5' AUGGGAGCUG CAGGCUGAGGG GGAGC GUUGG G GGCU U
3' UGCUCUCGAC GUCUGACACUCCU CUUCG CGACC C CCGG U

-59.4, 0.002

Ppt-MIR533c.236 (Ppt-miR533b)

5' GGAGGA GAUAUGGAGAGCUGU CAGGCUGUGAGGG GAGC CU GUAUUCUUU CU \

-78.3, 0.001

Ppt-MIR534.476

5' AUAUG AUGCAACU GUGGACA ACUGA CUAGUC AG GUGU GUGG AGUAUU GU GGU GAUG CAC UGUUG \

-75.32, 0.001

Ppt-MIR535a.452 (Ppt-miR535a)

5' GGAGG GAA GUGGAGAA GGUGACAACG AGAG GCACGCUGGAAUGC UUCA GC A

-71, 0.001

Ppt-MIR535b.253 (Ppt-miR535a)

5' GUGACA CG GAGAG GCACGC GAAU ACUC UGU A

-40.6, 0.001

Ppt-MIR535c.233 (Ppt-miR535a)

5' GUGACAACG GAGAG GCACGC GAAUUGC UUCA GC A

-45.3, 0.001

Ppt-MIR535d.268 (Ppt-miR535b)

5' GGUGAC ACG GAGAG GCACGC GAAUGC UUCA GCA \

-48.5, 0.001

Ppt-MIR536.573

5' UGA CCACC GG UGU CAC GCUUGGCAC AAUCCUCU UUGUG GUCCUC GUGG AGAGUU GUACU AC UUUAU CAU \

-57.3, 0.005

Ppt-MIR537a.544

```

      -   A   A           G   C   A G   A   -AU   U   GC           AUAA   U
5' GUUGUCG UCAUAU UGG CUGUAGAAACACCU AAG G UGAGG CC CCGAU CUA CAUGGAAACAG GAGCUCA G
3' CGAUAGU AGUAUA AUC GACAUCUUUGUGGA UUC C ACUUC GG GGCUA GAU GUGUCUUUGUC CUUGGGU U
      U   C   G           G   U   AA   -   AUU   C   --   ----   C

```

-80.6, 0.001

Ppt-MIR537b.343

```

      C   A           G   U   AC           A   -           ----AGGUA   A   A   C
5' UCAUAU UGG CUGUAGAAACACCU AAG G UGAAGUU GU CCGUUU   UG GAAUG UUGGAG A
3' AGUAUA AUC GACAUCUUUGUGGA UUC C ACUUCGA CG GGCCAAA   AC CUUGU GACCUC C
      C   G           G   U   GA           A   U           GUAAUGUAG   -   A   U

```

-65.84, 0.001

Ppt-MIR538a.251

```

      U   UG   UG   A   C           CU           U           U           UU   -----U   CCG   AA   U
5' UACAA AGUU UG GU UC CAUG GCUCUAACAU GCAUGGAG CUAUGUCUGGAGUA GUCCU   CAUUC   UGCA   UGC G
3' AUGUU UCAA GC CA AGGUGU UGAGAUUGUA CGUACUUC GAUGCAGACCUUAU CAGGG   GUAAG   ACGU   AUG A
      A   CA   GU   C   A           AG           -           C           --   UUACAAGU

```

-83.5, 0.001

Ppt-MIR538b.697

```

      G   U   A   U           U           C   -----   -   UUG   U
5' CCAU CU CUCUA CGU GCAUGGAG CUAUGUCUGGA CUC   CUC CAU   CUCU U
3' GGUA GA GAGAU GUA CGUACUUC GAUACAGGCUU GAG   GAG GUA   GAGA C
      A   U   C   -           C           A   CUUUA   U   --A   A

```

-50.2, 0.001

Ppt-MIR538c.303

```

      U   AG   U   A           UGCUUC   A   U           U   U           -   --U   -   -UUUC   U
5' UACAA AGUUC UG GUCUCCA   UCUG CGU GCAUGGAG CUA GUCUGGA CCUUC   C CA   CUCU U
3' AUGUU UCAA GC CGGAGGU   AGAU GUA CGUACUUC GAU CAGGCUU GGAAG   G GU   GAGA C
      A   CA   U   C           UCUAUA   C   -           U   U           A   UUC   A   UGUAA   A

```

-61.6, 0.001

Ppt-MIR1210.266

```

      A   C           U           C   A-   A   U   G
5' AGGC GUUG UUUUUCCUCUCCC CAAAGGCUUC AAC UG UG GC U
3' UUCGG UAAC AAGAAGGAGAGGG GUUCCGAAG UUG AC AC CG A
      C   A           U           A   CA   -   -   A

```

-55.6, 0.001

Ppt-MIR1211.171

```

      U           --   GU   AA           GGGUG           C
5' UACAUGAU U C CAGGGAGGGAUGGUUAUGCAAGA CAAGAGGUGG A
3' AUGUAUUG A G GUCCUUCUCUGCCAGUACGUUCU   GUUCUCUACU G
      A           AG   UG   AC           ACGAA           A

```

-62, 0.001

Ppt-MIR1212.562

```

      G   UG   G   C   C           G   AU   C   G   GC
5' UA AGGA UUGCAU CU UGCUGU CCCAC GCGU GU GC \
3' AU UCCU GCGUA GA ACGACA GGGUG CGCG CG CG G
      -   GU   A           A U           -   --   C   G   GU

```

-46.2, 0.004

Ppt-MIR1213.278

```

      -   UGGUU           U   G   U           UCA           A   UC--   U   C   UGA           UUA
5' GAGUCU CUAU ACAGGG GUUC UUU UCUCCC AAGGCUUCCAACA CAG GGAAU AA UC UGCGCCA \
3' UUCGGA GGUU UGUUCC CAAG AAG AGAGGG UUCGGAAGGUUGU GUC UCUUA UU AG ACGUUGGU U
      A   -----   -   A   C           UGC           C   UUGA   -   A   UG-   CAC

```

-73.9, 0.001

Ppt-MIR1214.998

```

      U   U           GUUU   A           UC           CCA           UU
5' G GGUUGG   UC CUAUGAGAA UCGCGG AGGUGGUU G
3' C CCGAUC   AGA GAUACUCUU AGCGUC UUUACCAG C
      A   C           AAGU   C           UU           ---   CA

```

-40, 0.001

Ppt-MIR1215.002

```

      A   U   C-   U   A   G   -CAACUUGA   -   AUU
5' CGUG AGG ACUGGAG UCAU GC AAACUGUAUAC AUCCUUU   ACA GC   C
3' GUAC UCC UGACCUC GGUG CG UUUGACAUAUG UAGGAGA   UGU CG   G
      A   C   AA   U   C   G   \   /   U   AAA
                                     (11 nt. side loop)

```

-51, 0.001

Ppt-MIR1216.283

```

      -   UUU   UC-   U   CU   A   U   C   UCU   AAGG   GU
5' GCGAGGUU GGU GUAUG CAG GU GUCA UGUCGUUGA GGUGAUG GCUUGUA CGA ACCAUUC G
3' CGCUCCAA CCA CAUAC GUC CG CAGU ACAGCAACU CCACUAC CGAACAU GCU UGGUAG A
      A   CCU   UUU   -   CC   -   C   C   UGU   GCUG   GG

```

-83.6, 0.001

Ppt-MIR1217.252

```

      UG   G   AU   GU   G   GG   C   UG-   GG
5' UCC UUUCUG UUG CUUG AUCAUGUU CAAAU CAAA CUG ACC \
3' AGG GAAGGC AAC GAAC UAGUACGA GUUUA GUUUU GAC UGG A
      UU   -   AU   UG   A   AA   U   UCA   UA

```

-43, 0.001

Ppt-MIR1218.216

```

      U   ACA   G   U   C   C   CU   -   GAA-   AG UC
5' CAG GAUU UGU UCG GGUAGG AUC UUAGAGUCGUAGGC CUGUG UG UUCAAGAU U \
3' GUC UUAU ACA GGC CUAUCC UAG AGUCUCAGCAUCCG GACAC AC AAGUUUUG G A
      U   ---   G   U   A   A   AG   U   ACAC   CU AC

```

-60, 0.001

Ppt-MIR1219a.909.1 (Ppt-miR1219a)

```

      U   C-   A   CA   -   C   -   U   U   C   A   UCC   A
5' GAAGUGUGGA GAUGGAG GU GC CU UUCCUG CC C CA UAGCUUC UCCCUCC CUAU \
3' CUUCACACCU UUAUUC CA CG GA AAGGAC GG G GU AUCGAGG AGGGAGG GAUU U
      A   AU   C   --   C   U   U   U   -   U   A   UCU   U

```

-67, 0.001

Ppt-MIR1219b.909.2 (Ppt-miR1219a)

```

      C   C   C   CUUCA   CGAA   CG   G
5' CU UUCCUGC UCUCU UAG UCCCUU ACC AG \
3' GA AGGGACG AGGGU AUC AGGGAA UGG UC U
      C   A   U   -----   -----   AA   A

```

-26.7, 0.057

Ppt-MIR1219c.517.2 (Ppt-miR1219a)

```

      U   C   -   C   A   C   CU
5' GGCC CU--UCCUGC UCU CA UAGCUUC UCCCU AGAAG G
3' CCGG GA AGGACG AGA GU AUCGAGG AGGGA UCUUC A
      U   -   A   C   A   C   UA

```

-54.5, 0.001

Ppt-MIR1219d.517.1 (Ppt-miR1219b)

```

      C   AG   AC   A   -   U   C   CU   C   C   UGC   AG
5' AGAGGCGUGUG GG C CGUG GU CU UUCCUG CU CA UAGCUUCU CCUCC CUG \
3' UCUUUUACGC CC G GCAC CG GA AAGGAC GA GU AUCGAGGAA GGAGGG GAC U
      A   CU   AU   G   C   U   A   UG   U   U   UCU   GC

```

-68.9, 0.001

Ppt-MIR1220a.541

```

                                     (12 nt. side loop)
      C   C   G   UGC   /   \   ACGU   -   C   ---   AAC   U   C   -   C
5' ACUUCUUG ACUCCUCUAUCU CCUCG CACC ACAG UAUCUUC UGGUG GC ACGU UCG AUA CC AUGC GGG A
3' UGAAGAAC UGAGGAGAUAGA GGAGU GUGG UGUC AUAGGAG ACCAU CG UGCG GGC UGU GG UGCG CCU A
      U   A   G   CCU   \   /   GUCU   U   U   ACC   ACA   -   A   G   C
                                     (21 nt. side loop)

```

-82, 0.001

Ppt-MIR1220b.468

```
5' ACUUCU C GACUCCUCUAUCU C C CUG CACC GCA AGUC AUUUUAUCA UC UG-- A UC-- AC \
3' UGAAGA CUUGAGGAGAUAGA GGAGU GUGG UGU UCAG UGUGGA UGCGGCC CGG GCG CU A
      A A G CCU C \ / -- UCAA - UACC AU
(50 nt. side loop)
```

-83.6, 0.001

Ppt-MIR1221.026

```
5' AACU G A GAG AACU CGUGGAUG UGUGCA GGGUCAAAU CUCU UGG UUC AUGUGUUU CCGCU CGGC \
3' UUGG CUG CUC UUGA GCAUCUAU ACACGU CCCGUUUUA GAGG ACU AAG UAUACACAG GGUGA GCUGU U
      U G C AC G A C -- -- - \ / A- GU
(16 nt. side loop)
```

-79.4, 0.001

Ppt-MIR1222.106

```
5' CACG UAG UGGU UGUUGUGGGCAUU UGUGCUAGU AACUCCUUA GCAG GUGC \
3' GUGC AUU GCCA ACAACACCCGUAA AUUAGGUUA UUGAGGAAGU CGUC CACG U
      A-- A GUAGU AU C U -- AUC
(16 nt. side loop)
```

-65.3, 0.001

Ppt-MIR1223.289

```
5' AGACUAGAGG GUCAG GGGUGUGUGACUCUAUAAUC AA GCU GUGC GAUC U
3' UCGAUCUUC CAGUC UCCACAUACUGAGAUGUUAG UU CGA CACG CUAG U
      A ACC C A ACCA UGAAG AA
(16 nt. side loop)
```

-67.3, 0.001

Pp_26.533

```
5' GGUAAA G UC UG AGAA UC UGGGGGGG GG CUG CUGGCUCUCCUGUAUG CA UUGCG AUUUUG CA \
3' CCAUUU C AG AC UCUU AG GCCCUUCU CC GAC GACUGAGGGACAUAC GU GAUC UGGGAC GU C
      CU GA U - - - ACGUU A- A C C A G GUU
(16 nt. side loop)
```

-70.3, 0.001

Pp_44.569

```
5' CUG CUGGCUCUCCUG AUGCCA CUG GGCUUG CAA \
3' GAC GACCGAGGGAC UACGGU GAU UCGAGC GUU U
      A A C C ACG U AG
(16 nt. side loop)
```

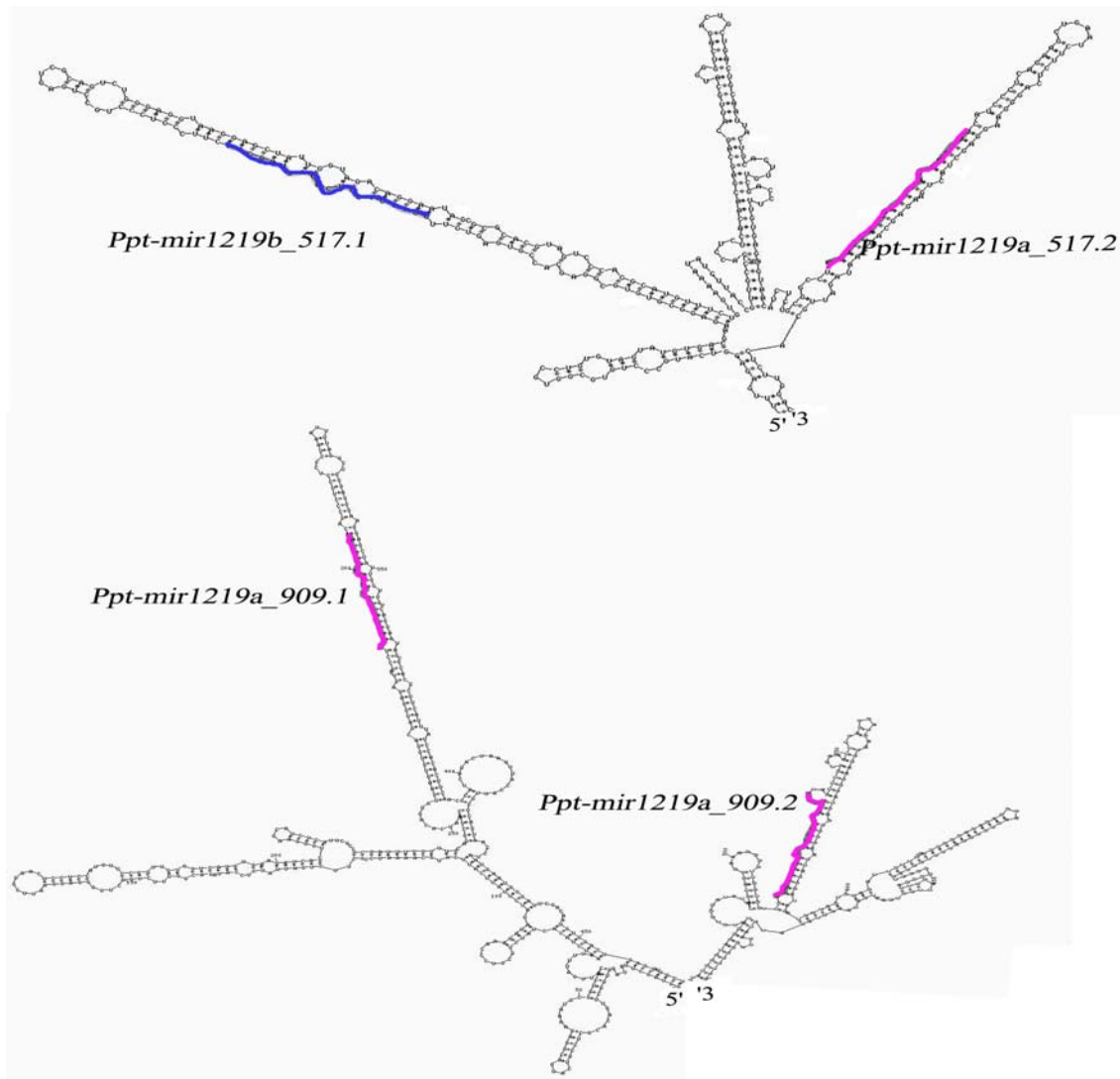
-52, 0.001

איור מס' 8: מבנים שניוניים חזויים של pre-miRNAs משוערים מ-*P. patens*, ו-pre-miRNAs ידועים מארבידופסיס

שמו של כל פרקורסור מ-*P. patens* מתחיל ב-Ppt/Pp וכולל אחרי הנקודה את שלושת הספרות האחרונות של שם הרצף הגנומי ממנו נלקח ב-NCBI. בסוגריים: שם ה-miRNA אותו הוא צפוי ליצור. רצפי ה-miRNAs מסומנים בקו תחתון; miRNAs משוערים מודגשים בכתב מוטה (איטלקי); *miRNAs אשר שובטו מודגשים בתיחום אפור. גודלו האמיתי של כל פרקורסור הינו משוער כיון שלא וודא ניסויית. תחת כל פרקורסור מופיעים ערך ΔG ליציבות המבנה השניוני ומובהקותו הסטטיסטית, בהתאמה, לפי תוכנת RandFold. פרקורסורים מארבידופסיס מתחילים ב-Ath, ונלקחו מה-miRNA registry.

3.1.6 פרקורסורים המסודרים באשכולות

בסריקה התגלו שלושה פרקורסורים : 755786909.2, 755786909.1, 824631517.2, שצפויים לקודד ל- Ppt-miR1219a, ופרקורסור אחד : 824631517.1, שצפוי לקודד לבן המשפחה Ppt-miR1219b, שעדיין לא שובט (איור 8). Ppt-miR1219a ו-Ppt-miR1219b נבדלים זה מזה רק בנוקלאוטיד הראשון שלהם (טבלה מס' 1). ארבעת הפרקורסורים הנ"ל מסודרים בשני אשכולות : 755786909 ו-824631517. כל אשכול מכיל שני פרקורסורים במרחק של כ-200 נוקלאוטידים אחד מהשני (איור 9). הוצע שהתקבצות פרקורסורים של miRNAs באשכולות, הינה דרך לתאום ביטויים של miRNAs ברקמות ובמצבים שונים (Bartel, 2004). בניגוד ל-pre-miRNAs אנימליים, אשר נמצאים לרב באשכולות, בצמחים עילאיים הסידור הפוליציסטרוני די נדיר, ודווח עד כה רק עבור miR399 בארבידופסיס (Sunkar and Zhu, 2004) ועבור miR395 באורז (Jones-Rhoades and Bartel, 2004).

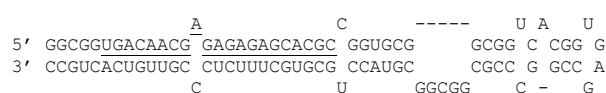


איור מס' 9 : מבנים שניוניים חזויים של pri-miRNAs פוליציסטרוניים עבור Ppt-miR1219a,b. רצפי Ppt-miR1219a ו-Ppt-miR1219b מודגשים בורוד ובכחול בהתאמה. שמם כולל אחרי הקו התחתון את שלושת הספרות האחרונות של שם האשכול בו נכלל הפרקורסור, ואחרי הנקודה את המספר הסידורי של הפרקורסור באשכול.

3.1.7 הומולוג מאורז ל-miRNA מטחב

בסריקה מול ה-NCBI non-redundant database (איור 4, שלב 1), נמצא Ppt-miR535a, זהה למקטע אינטרגני באורז בכרומוזום 11 (AC136786:116680-116660). לכן היה עניין לבחון את AC136786 עבור יציבות הקיפול. נמצא כי רצף של 94 נוקלאוטידים, החובק את הרצף ההומולוגי ל-Ppt-miR535a באורז, יצר מבנה יציב של סיכת ראש, הכוללת אותו באחת מזרועותיה (איור 10, בקו תחתון). תוצאה זו חשפה miRNA חדש מאורז, ומצביעה על כך ש-Ppt-miR535a הינו הומולוג שלו. יש לציין ש-miR535a אינו שמור בארבידופסיס.

Osa-MIR535



-68.3, 0.001

איור מס' 10: מבנה שניוני חזוי של Osa-MIR535 משוער מאורז

Osa-miR535, רצף Osa-miR535 מסומן בקו תחתון. גודלו האמיתי של הפרקורסור המשוער לא וודא ניסויית, ויתכן כי הוא מעט קצר או ארוך מהמוצג. מופיעים ערך ΔG ליציבות המבנה השניוני ומובהקותו הסטטיסטית, בהתאמה, לפי תוכנת RandFold.

3.1.8 sRNAs המשובצים במבני סיכות הראש, שאינם miRNAs

א. miRNAs*

בחינת הקיפול נראה, שרצפי הספרייה הבאים: Pp_34, Pp_103, Pp_108, Pp_111, Pp_124, Pp_76 מייצגים את ה-miRNA* של Ppt-miR533b, Ppt-miR534, Ppt-miR537, Ppt-miR319b, Ppt-miR1219a, Ppt-miR1222 miRNAs יותר את היות האחרונים miRNAs. יתר על כן, תדירותם בספרייה נמוכה יחסית ל-miRNAs המשלימים להם (טבלאות S1 במאמרים (Arazi et al., 2005; Talmor-Neiman et al., 2006a; Talmor-Neiman et al., 2006b), עובדה המחזקת את היותם miRNAs*, הידועים כלא יציבים (Tomari and Zamore, 2005).

כמו כן נמצא כי Pp_29 תואם לזרוע ה-3' במבנה סיכת ראש (איור 8, בתיחום אפור Ppt-MIR390b), כשהוא זהה לרצף המשלים את 20 הנוקלאוטידים האחרונים של Ppt-miR390a בהסטה של 2 נוקלאוטידים (טבלה 1). סיכת הראש אינה מכילה את הנוקלאוטיד הראשון של Ppt-miR390a, לכן Pp_29, אינו מייצג את ה-miRNA* של Ppt-miR390a, אלא של בן משפחתו שעדיין לא שובט: Ppt-miR390b. עבור הסטה של Pp_29 ב-2 נוקלאוטידים מ-Ppt-miR390b החזוי, צפוי ש-Ppt-miR390b הינו קצר בנוקלאוטיד אחד מ-Ppt-miR390a בקצה ה-5' שלו (טבלה מס' 1).

ב. sRNAs המייצגים תוצרי ביניים בביוגנזת miRNAs

מלבד miRNA*, בבדיקת ההתקפלות התגלו sRNAs נוספים שתאמו לפרקורסורים המשוערים Ppt-miR1219a_909 ו-MIR319d (איור 11). Pp_82 נמצא מתאים לבסיס מבנה סיכת הראש

של Ppt-miR1219a_909.1, 3 נוקלאוטידים upstream ל-Ppt-miR1219a (איור 11a). בנוסף, Pp_112 ו-Pp_115 נמצאו תואמים לבסיס זרועות סיכת הראש המאורכת של MIR319d בין Ppt- Pp_115 ו-Pp_112, miR319b: Ppt-miR319b* לבין לולאת סיכת הראש (איור 11b). יתר על כן, Pp_112 ו-Pp_115 צפויים להשלים אחד את השני עם הסטה של 2 נוקלאוטידים, כמקובל בדופלקס של miRNA:miRNA* בעקבות עיבוד ע"י Dicer (Lee et al., 2003).

(a) Pp_1219a_909.1

```

U      C-      A CA - C      - U U C      A      UCC  A
5'-GAAGUGUGGA GAUGGAG GU GC CU UCCUG CC C CA UAGCUUC UCCCUUC CUA \
3'-CUUCACACCU UUACUUC CA CG GA AAGGAC GG C GU AUCGAGG AGGGAGG GAUU U
A      AU      C -- C U      U U - U      A      UCU  U

```

(b) Ppt-MIR319d

```

U      UU      U UG      A      U      U      G      AC      A      UUC      C      C      U      AC
5'-CAGCG GGAGCU CUUCGGUCCAA AG GCUAGUCG AGGUUG GC GCU CCG UCA AC CGG UUC UA CCA \
3'-GUCGC CCUCGA GAAGUCAGGUU UC CGAUUCGGC UCUAAC UG CGA GGC AGU UG GCC AAGG AU GGU C
C      GG      C UA      C      U      U      G      AU      C      UAA      U      U      -      CC

```

איור מס' 11: sRNAs משובטים מ-*P. patens*, המייצגים תוצרי ביניים בעיבוד pre-miRNA
 (a) מבנה גזע ולולאה של הרצף Ppt-1219a_909.1. הרצפים **Ppt-miR1219a**, *Ppt-miR1219a ו-Pp_82 מסומנים בכתב אדום עם קו תחתון, בהדגשה של תיחום אפור ובכתב כחול בהתאמה.
 (b) מבנה גזע ולולאה של הגן MIR319d. הרצפים **Ppt-miR319b**, *Ppt-miR319b, Pp_112 ו-Pp_115 מסומנים בכתב אדום עם קו תחתון, בהדגשה של תיחום אפור, בכתב כחול ובהדגשה של תיחום צהוב, בהתאמה.

בשלב זה תם החיפוש הביואינפורמטי אחר miRNAs ב-*P. patens*. הרצפים שעמדו בתנאי המיבנה, היציבות ו/או השימור האבולוציוני, הינם מועמדים להיות miRNAs, מצויינים בטבלה מס' 1, וממשיכים לשלב בדיקת ביטוי.

טבלה מס' 1 : מועמדים ל-miRNAs, ו-sRNAs אחרים מספריית ה-*P. patens*

מספר	siRNA	אורך (נוק')	רצף	מקור הרצף	זרוע הקיפול/נוק'	RNA Blot	miRNA*	הומולוגיה	תדירות
1	Ppt-miR156	20	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	774445271-MIR156a 850661024-MIR156b	5'/115 5'/101	d		Ath	3
2	Ppt-miR319a	21	CUUGGACUGAAGGGAGCUCC	828198995-MIR319a	3'/160	nt		Ath, Osa, Gm, Mt, Sb, Pt	3
	Ppt-miR319b	21	CUUGGACUGAAGGGAGCUCC	715979662-MIR319b 755797036-MIR319c 846106374-MIR319d	3'/189 3'/170 3'/159	d	Pp_111		47
	Ppt-miR319c	20	CUUGGACUGAAGGGAGCGCC	-		nt			1
3	Ppt-miR390a	21	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC	756725281-MIR390a 824720429-MIR390b	5'/137 5'/175	d		Ath	2
	Ppt-miR390b	20	agcucaggagggauagegcc	784214430-MIR390c	5'/135	nt	Pp_29	Ppt-miR390a	0
4	Ppt-miR533a	21	GAGCUGGCCAGGCUGUGAGGG	755813659-MIR533a	5'/102	d	Pp_34	Fh	12
	Ppt-miR533b	22	GAGCUGGCCAGGCUGUGAGGGA	755813659-MIR533b	5'/108	nt	Pp_34	Ppt-miR533a	1
	Ppt-miR533c	21	GAGCUGUCCAGGCUGUGAGGG	835903236-MIR533c	5'/125	nt		Ppt-miR533a	1
5	Ppt-miR534	22	UAUGUCCAUGCAGUUGCAUAC	816251476-MIR534	3'/200	d	Pp_103		6
6	Ppt-miR535a	21	UGACAACGAGAGAGAGCACGC	755837452-MIR535a 830485253-MIR535b 830639233-MIR535c	5'/135 5'/81 5'/81	d		Osa, Fh	14
	Ppt-miR535b	22	UGACAACGAGAGAGAGCACGCC	756805268-MIR535d	5'/85	nt		Ppt-miR535a	1
7	Ppt-miR536	22	UUCGUGCCAAGCUGUGUGCAAC	831711733-MIR536	3'/199	d		Pj_34, Fh	17
8	Ppt-miR537	21	UUGAGGUGUUUCUACAGGCUA	713855544-MIR537a 816296343-MIR537b 839506432-MIR537c	3'/190 3'/149 3'/162	d	Pp_108	Fh	10
9	Ppt-miR538	22	UUGCAUGGAGUCUAUGUCUGGA	831659251-MIR538a 835924697-MIR538b 831668303-MIR538c 884935884-MIR538d	5'/179 5'/118 5'/160 5'/190	d		Pj_159, Fh	10
10	Ppt-miR1210	21	AGAAGCCUUUGUGGGAGAGGA	686715266-MIR1210	3'/99	d		Pj_10	2
11	Ppt-miR1211	21	AGGGAGGGAUGGUUAUGCAAG	713855171-MIR1211	5'/112	d			2
12	Ppt-miR1212	21	CGUGGGACAGCAUAGAAUGCG	713871562-MIR1212	3'/89	d		Pj_170	2
13	Ppt-miR1213	21	GUUGGAAGCCUUCGUGGGAGA	828270278-MIR1213	3'/164	d		Pj_201	1
14	Ppt-miR1214	21	UACUAUGAGAAUCUCGCGGCC	815622998-	5'/93	d			1

				MIR1214					
15	Ppt-miR1215	21	UCAUUGCAAACUGUAUACGA	831635002-MIR1215	5'/127	d			1
16	Ppt-miR1216	21	UGAUGGUGAUGCGCUUGUAUC	774450283-MIR1216	5'/158	d			5
17	Ppt-miR1217	21	AAUUUGAAGCAUGAUGUCAAG	830441252-MIR1217	3'/111	d			1
18	Ppt-miR1218	21	CCUUAGAGUCGUAGGCCUCUG	774610216-MIR1218	5'/119	d			2
19	Ppt-miR1219a	21	CUUCCUGCCUCUCACUAGCUU	755786909.1-MIR1219a 755786909.2-MIR1219b 824631517.2-MIR1219c	5'/135 5'/78 5'/152	d	Pp_124		1
	Ppt-miR1219b	21	uuuccugccucucacuagcuu	824631517.1-MIR1219d	5'/136	nt		Ppt-miR1219a	0
20	Ppt-miR1220	21	GAAGAUAGAGGAGUUCAAGAA	784303541-MIR1220a	3'/205	d			1
				863100468-MIR1220b	3'/205				
21	Ppt-miR1221	21	UGGAUGGUGUGCAGGGUCAAA	759445026-MIR1221	5'/177	d			1
22	Ppt-miR1222	21	UUGAAGGAGUUCAUUGGUAUA	759457106-MIR1222	3'/130	d	Pp_76	Pj_62	1
23	Ppt-miR1223	21	UUGUAGAGUCAACACCUCCA	831697289-MIR1223	3'/126	d			1
	siR11	20	AUAUACAACCGAUACAGGAG		-	d			1
	siR10	21	GACACGCAGACACGCGCGGCC		-	d			1
	siR8/9'	21	aCGGGUGGAUGGGAACACUAua		-	nd			1
	siR7	21	AGGCAGUAGAAGAGCACCGGA		-	d			1
	Pp_26	21	CCAUACAGGGAGUCAGACAGA	784207533	3'/162	nd			1
	Pp_44	21	GCAUCCAGGGAGCCAGACAGA	717625569	3'/85	nd			2
	Pp_82	20	UGUGGACGAUGGAGAGUCAG	755786909.1	5'/119	nt			2
	Pp_112	21	UCAAUCUCCGGCUUAGCAUCU	755797036-MIR319d	3'/149	nt			1
	Pp_115	21	UGGCUGAGUCGAAGGUUGUGC	755797036-MIR319d	5'/28	nt			3

^א - נוקלאוטידים באותיות קטנות-חזויים. הקצוות המדוייקים של ה-miRNAs עדיין לא נקבעו סופית.

^ב - עבור כל גן עצמאי מצויין מקור רצף (trace) אחד.

^ג - חזוי, האורך המדוייק של הפרקורסור לא וודא ניסויית, ויתכן כי הוא מעט ארוך או קצר מהמצויין.

^ד - nd – לא זוהה, d – זוהה, nt – לא נבדק בשל הומולוגיה של הרצף.

^ה - Pp-*Physcomitrella patens*, Pj-*Polytrichum juniperinum*, Ath-*Arabidopsis thaliana*, Osa- *Oriza sativa*,

Sb- *Sorghum bicolor*, Pt- *Populus trichocara*, Zm- *Zea mays*,

Gm-*Glycine max*, Mt-*Medicago truncatula*, Fh-*Funaria hygrometrica*

^ו - מספר הפעמים שרוצף מתוך 454 רצפי הספרייה.

^ז - siR8/9 מורכב משני siRNAs חופפים (איור 20a).

3.1.9 קבוצות דמיון בין רצפי ספריית ה- *P. patens*

בחיפוש אחר הומולוגיה ל-miRNAs ידועים התגלו מספר רצפים מהספרייה, הדומים ל-miR319 הידוע. מכך שישנן קבוצות דמיון בין רצפי הספרייה. על מנת לגלות קבוצות דמיון נוספות בוצעה השוואה בין רצפי הספרייה עצמם. נמצא כי Ppt-miR533b ו-Ppt-miR533c דומים ביותר, ו-Ppt-miR533b מכיל בתוכו את Ppt-miR533a (איור 12a). כמו כן, Ppt-miR535b מכיל בתוכו את Ppt-miR535a (איור 7b). היות והפרקורסורים שצפויים לקודד לרצפים הבאים: Ppt-miR533a,

Ppt-miR533b, Ppt-miR533c, Ppt-miR535a, Ppt-miR535b זוהו (איור 8), הדבר מרמז עליהם כשתי משפחות.

(a)	mIR533 family	
	Ppt-miR533a	GAGCUGGCCAGGCUGUGAGGG-
	Ppt-miR533b	GAGCUGGCCAGGCUGUGAGGG a
	Ppt-miR533c	GAGCUG u CCAGGCUGUGAGGG-
(b)	mIR535 family	
	Ppt-miR535a	UGACAACGAGAGAGAGCACGC-
	Ppt-miR535b	UGACAACGAGAGAGAGCACGC c

איור מס' 12: קבוצות דמיון בין רצפי ספריית ה- *P. patens*
 הרצפים הושוו ע"י תוכנת CLUSTALW. נוקלאוטידים שמורים מצוינים באותיות גדולות. שינוי ברצף מצוין באותיות קטנות ומודגשות. רצפי ה miRNAs שמקורם אינו בטחב נלקחו מה- miRNA registry. באיור זה הובא דמיון רק בין רצפים, שנתגלו בעבודה זו כמעניינים.

3.2 בדיקת ביטוי של miRNAs מועמדים מספריית ה- *P. patens*

ביטוי miRNAs בריקמה או בשלב התפתחותי מסויים יכול לרמז על תפקודו (Jones-Rhoades et al., 2006). על מנת לאפיין את ביטויים של המועמדים ל-miRNA, שזוהו בחיפוש הביואינפורמטי, ובכך גם לחזק את זהותם כ-miRNAs המתבטאים באופן יציב בטחב, בוצע RNA gel blot תוך שימוש בגלאי ספציפי לכל miRNA או משפחה קרובה.

על פי רב קל לזהות ביטוי של miRNA שכיח (Jones-Rhoades et al., 2006). לאור זאת חולקו ה-miRNAs המועמדים לנפוצים ונדירים. בהתאמה נבחר ביטויים בגמטופיט הטחב תוך שימוש ב- 30µg, 100µg של RNA כללי או בפרקציית RNA בעלת משקל מולקולארי נמוך השווה ל-500µg RNA כללי. תוצאות בדיקת הביטוי מתוארות באיור 13.

כפי שניתן לראות (איור 13a), זוהו סיגנלים חיוביים בגודל הצפוי, המאששים את ביטוי המועמדים ל-miRNAs הבאים: Ppt-miR533a, Ppt-miR534, Ppt-miR535, Ppt-miR536, Ppt-miR537, Ppt-miR538, Ppt-miRNA319b, Ppt-miRNA390, Ppt-miRNA156. ובהם גם הרצפים ההומולוגיים ל-miRNAs ידועים:

כדי לוודא שרצפים אלה אכן מייצגים miRNAs הייחודיים לזרוע מסוימת בפרקורסור ואינם siRNAs, המאופיינים בחיתוך רצפים משלימים משני הגדילים, ששכיחותם דומה, בוצעה הברידיזציה גם עם אוליגונוקלאוטיד הזהה ברצפו ל-sense של כל אחד מה-sRNAs הבאים: Ppt-miR533a, Ppt-miR534, Ppt-miR535, Ppt-miR536, Ppt-miR537, Ppt-miR538. ההברידיזציות לא התגלה סיגנל.

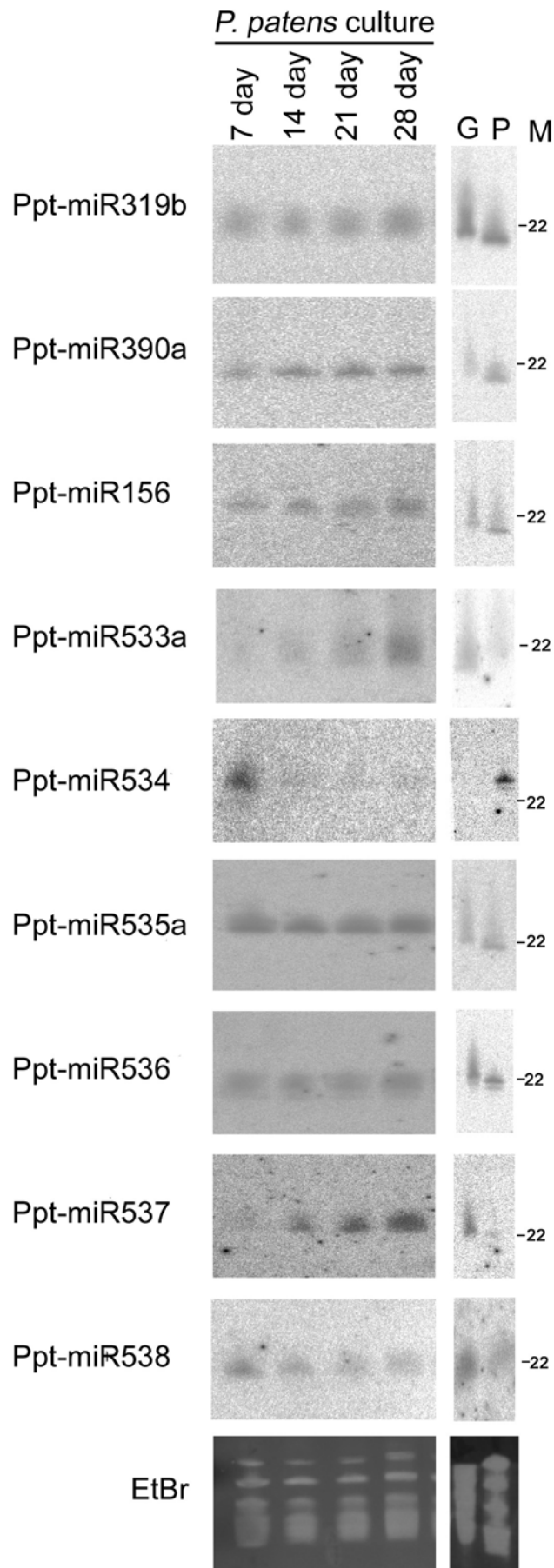
הרצפים Ppt-miR536, Ppt-miR535, miR390a, miR156, Ppt-miRNA319b, miR538 זוהו ברמה דומה בגמטופיט צעיר ובוגר. לעומת זאת Ppt-miR533a, Ppt-miR534, Ppt-miR537, Ppt-miR538 הראו שונות בביטוי (a). Ppt-miR534 נתגלה בעיקר בפרוטנומה בלתי ממוינת בת שבוע, וכמעט שלא התגלה בגמטופור. יתר על כן, רמתו ירדה באופן דרמטי לאחר שבועיים של גדילת

הפרוטונמה, כאשר רק גמטופורים צעירים בודדים נראו בתרבית. מכך ניתן להסיק כי Ppt-miR534 הינו ספציפי לפרוטונמה בלתי ממוינת, המורכבת בעיקרה מתאי כלורונמה. לעומתו Ppt-miR533a ו-Ppt-miR537 נמצאו מבוטאים בעיקר בגמטופורים בוגרים, והרבה פחות בפרוטונמה בלתי ממוינת בת 7 ימים. בהתאמה לתצפיות אלה, שכחותם של Ppt-miR533a ו-Ppt-miR537 עלתה עם הזמן, ככל שנוכחות גמטופורים בוגרים עלתה בתרבית, וזו הגיעה לשיא בתרבית בת 28 יום. Ppt-miR536 זוהה כמספר בנדים. על אף אי זיהוי רצפים הדומים לו בספרייה, יתכן שהוא בן למשפחת miRNAs, שעדיין לא זוהתה.

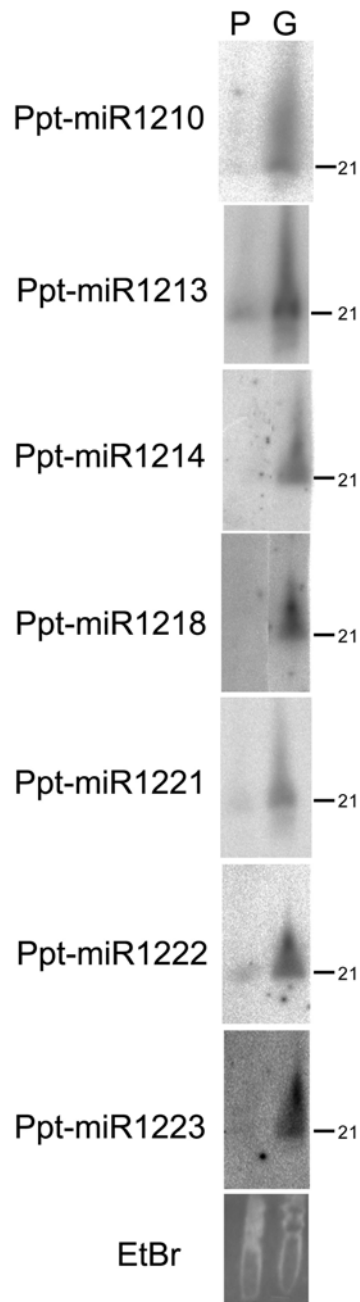
ה-sRNAs הבאים: Ppt-miR1210, Ppt-miR1213, Ppt-miR1214, Ppt-miR1218, Ppt-miR1221, Ppt-miR1222, Ppt-miR1223 ו-Ppt-miR1224 (b). לעומתם, Ppt-miR1211, Ppt-miR1212, Ppt-miR1215, Ppt-miR1216, Ppt-miR1217, Ppt-miR1219a, Ppt-miR1220 ו-Ppt-miR1221 (c). הדבר מעיד על רמת ה-steady state המשקל המולקולארי הנמוך, שהופקו מ-500µg RNA. הנמוכה שלהם בגמטופיט. יתכן שהם מתבטאים ברמה גבוהה יותר רק תחת תנאים מסוימים, בתאים מסוימים או בשלב ההתפתחותי של הספורופיט, אשר לא נבדק בניסוי. סיגנלים של בנדים רבים, שגודלם גבוה מ-21 נוקלאוטידים נראו עבור גלאים המשלימים ל-Pp_26 ו-Pp_44 (איור 14). ממצא זה מחליש את סבירות היותם miRNAs.

16 miRNAs מתוך ה-28 שהתגלו היו שכיחים יחסית בספרייתנו, כאשר Ppt-miR319b היה הנפוץ ביותר והווה 10.3% ממנה (טבלה 1). הדבר עולה בקנה אחד עם ממצאים קודמים מארבידופסיס, בהם הופיעו miRNAs בד"כ יותר מפעם אחת בספריות sRNAs. זאת לעומת סוגים אחרים של sRNAs, אשר הופיעו בד"כ פעם אחת (Sunkar and Bartel and Bartel, 2003; Zhu, 2004).

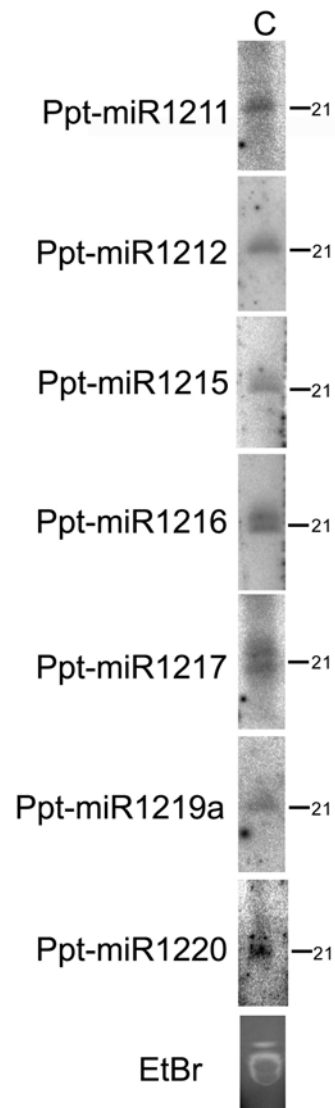
(a)



(b)

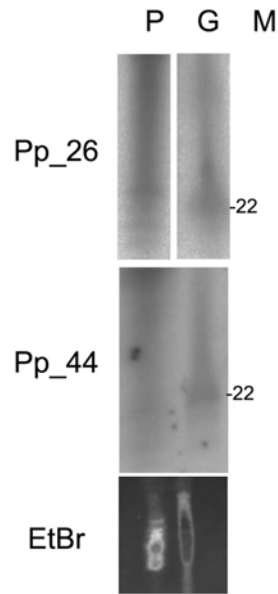


(c)



איור מס' 13 : RNA gel blot של sRNAs בגמטופיט *P. patens*

לאחר זריעת פרוטונמה קצוצה והומוגנית על מצע מינימאלי, RNA כללי של הטחב *P. patens* הופק מפרוטונמה מבודדת בת 8-10 ימים (P); מגמטופורים מבודדים בני 30-45 יום (G); ומתרבית, לפי הימים המצוינים מזריעת הפרוטונמה (a). כל דוגמא נקצרה מלפחות חמש צלחות פטרי שונות. בנוסף, RNA כללי מפרוטונמה בת 8-10 יום נלקח גם להכנת פרקציית RNA בעלת משקל מולקולארי נמוך (C). דוגמאות ה-RNA: (a) 30 μg עבור (a), 100 μg עבור (b) ופרקציה השווה ל-500 μg עבור (c), הופרדו על גיל פוליאקרילאמיד דנטורטיבי, הוספגו בממברנה, ונחשפו לגלאים של אוליגוןוקלאוטידים, המשלימים לרצפי ה-sRNA הנבחנים. הממברנות עברו stripping והברידיזציות נוספות עם ה-sRNAs המצויינים. הֶבְנָדִים המצויינים tRNA ו-5S rRNA נראים עיני צביעה באתידיום ברומיד של גיל הפוליאקרילאמיד, ומשמשים כבקרי הטענה. סמן גודל נוקלאוטידים (M).

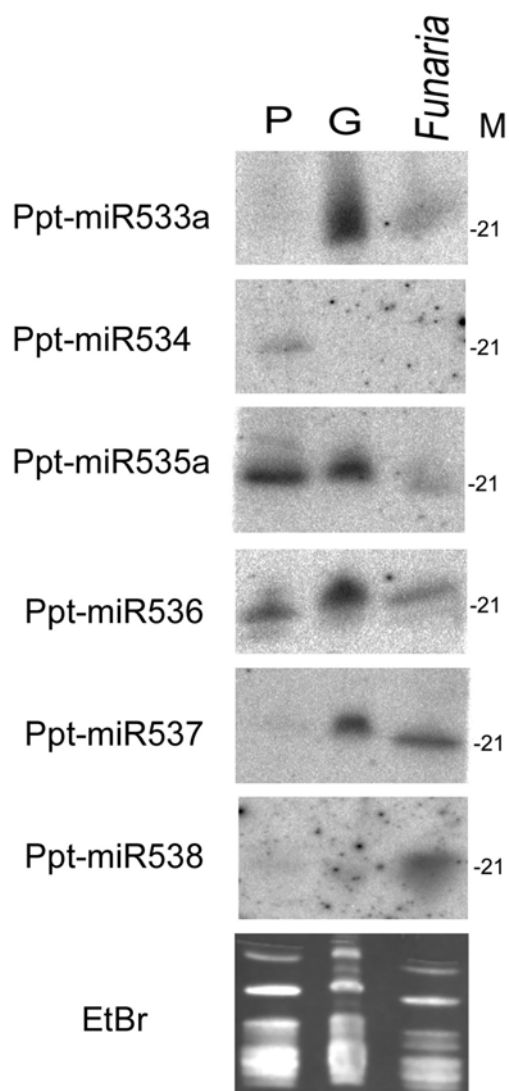


איור מס' 14: RNA gel blot של sRNAs, שביטויים לא זוהה בברור בגמטופיט *P. patens*
 RNA כללי הופק מפרוטונמה מבודדת בת 8 ימים של הטחב *P. patens* (P), ומגמטופורים מבודדים בני 49 יום של *P. patens* (G). דוגמאות ה-RNA (80 µg) נקצרו, הופקו והורצו באופן זהה לאיור מס' 13. הבנדים המציינים tRNA ו-5S rRNA נראים ע"י צביעה באתידיום ברומיד של גיל הפוליאקרילאמיד, ומשמשים כבקרי הטענה. סמן גודל נוקלאוטידים (M).

3.3 בדיקת שימור miRNAs בין טחבים

בשל גילוי sRNAs שמורים בין טחבים בפרק 3.1.3, היה עניין לבדוק שימור ביטוי miRNAs בין טחבים. לשם כך נערכה הברידיזציית Northern בטחבים *Funaria hygrometrica*² ו-*P. patens* עם גלאים המשלימים ל-6 miRNAs הנפוצים ב-*P. patens* (איור 15). ניתן לראות (איור 15) סיגנל חיובי בגודל הצפוי, המאשש את ביטוי ההומולוגיים ל-Ppt-miR534, miRNAs533a,536-538 ב-*F. hygrometrica*. לעומתם, לא זוהה סיגנל עבור Ppt-miR534 בגמטופורים של *F. hygrometrica*, אך זאת בהתאמה ל-*P. patens*, שכן גם בו לא זוהה Ppt-miR534 בגמטופורים, אלא בפרוטונמה בלבד.

² מין קרוב של טחב, השייך, בדומה ל-*P. patens*, למשפחת ה-*Funariaceae*.

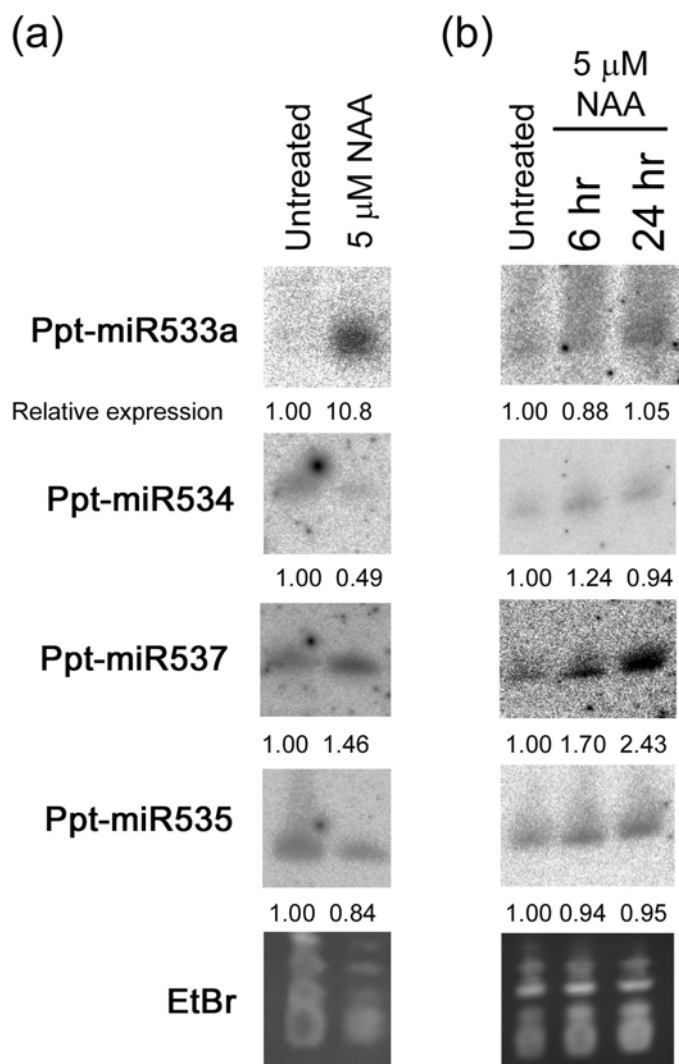


איור מס' 15 : RNA gel blot של miRNAs בגמטופיט *P. patens* ו-*F. hygrometrica*
 RNA כללי הופק מפרוטונמה מבודדת בת 7 ימים של הטחב *P. patens* (P); מגמטופורים מבודדים בני 30 יום של *P. patens* (G); מגמטופורים של הטחב *Funaria hygrometrica*, שגדלו בצורה חופשית בטבע (באתר מכון וולקני, בית דגן). עבור דוגמאות P,G: לאחר זריעת פרוטונמה קצוצה והומוגנית על מצע מינימאלי, דוגמאות ה-RNA (30 µg) נקצרו, הופקו והורצו באופן זהה לאיור מס' 13. הפגנדים המציינים tRNA ו-5S rRNA נראים ע"י צביעה באתידיום ברומיד של גיל הפוליאקרילאמיד, ומשמשים כבקרי הטענה. סמן גודל נוקלאוטידים (M).

3.4 השפעת אוקסין (NAA) על רמת ביטוי של miRNAs

באנליזת הביטוי התגלו miRNAs בעלי ביטוי משתנה בין פרוטונמה לגמטופור. ידוע שאוקסין משרה את המעבר מתאי כלורונמה לתאי קאולונמה שלאחר מכן מתמיינים לגמטופור (Ashton et al., 1979; Johri and Desai, 1973). לכן, היה עניין לבחון האם אוקסין משפיע על רמת הביטוי של miRNAs Northern של RNA כללי מפרוטונמה בת שבוע בהעדר או בהוספת 5µM NAA חיצוני לטווחי זמן משתנים, נערכה עם גלאים המשלימים ל-Ppt-miR533a, Ppt-miR534, Ppt-miR537, miR535a, כביקורת נבחר גלאי המשלים ל-Ppt-miR535a, בעל ביטוי ברמה דומה (קונסטיטוטיבי) בגמטופיט צעיר ובבוגר (איור 13a).

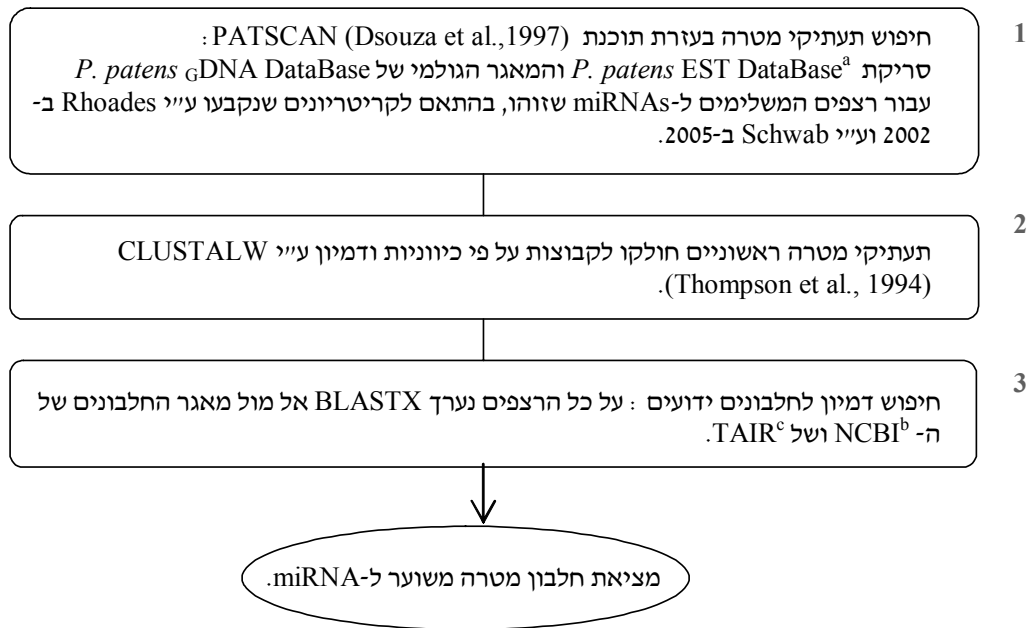
ניתן לראות (איור 16a) שעקב הוספת ה-NAA במשך שבוע, דבר שהעלה את היחס קאולונמה/כלורונמה (לא מוצג), ביטוי של Ppt-miR533a השכיח בגמטופור, הושפע בצורה דרמטית: רמתו עלתה פי 10. רמתו של Ppt-miR537 השכיח גם הוא בגמטופור, עלתה אף היא, אך זו בכ-50% בלבד. לעומתם, רמתו של Ppt-miR534 השכיח בפרוטונמה עשירה בכלורונמה, ירדה בכ-50%. רמתו Ppt-miR535 הקונסטיטטיבי לא השתנתה במידה ניכרת בעקבות הטיפול. בכדי לבדוק האם השינוי בביטוי ה-miRNAs מבוקרים באופן ישיר ע"י NAA, נבחנה רמת ביטויים בהעדר או בהוספת 5 μ M NAA חיצוני למשך פרק זמן של 6 או 24 שעות לפני הפקת ה-RNA מהם (איור 16b); לא ניתן היה להבחין בהסתכלות תחת בינוקולר בשינוי כלשהו בשלבי התפתחות הפרוטונמה). לאחר חשיפה של 6 שעות ל-5 μ M NAA, חלה עלייה של 70% ברמת Ppt-miR533a, Ppt-miR537, ולאחר חשיפה של 24 שעות חלה עלייה של למעלה מ-140%. עבור Ppt-miR533a, Ppt-miR534 לא נתגלו שינויים משמעותיים עקב הטיפולים, כמו גם עבור Ppt-miR535 הקונסטיטטיבי.



איור מס' 16: השפעות ארוכות וקצרות טווח של NAA היצוני על רמת ביטוי של Ppt-miRNAs
 30 μ g (a) או 45 μ g (b) של RNA כללי, שהופק מפרוטונמה, שגודלה במשך 7 ימים על מצע PPNH₄ בתוספת 5 μ M NAA אקסוגני (a) או שנחשפה ל-5 μ M NAA למשך 6 או 24 שעות לפני הקצירה, כמצוין (b). דוגמאות ה-RNA נקצרו, הופקו והורצו באופן זהה לאיור מס' 13. הבנדים המציניים tRNA ו-5S rRNA נראים ע"י צביעה באתידיום ברומיד של גיל הפוליאקרילאמיד, ומשמשים כבקרי הטענה. רמות ההתבטאות ביחס לרקמה ללא טיפול נקבעו בעזרת תוכנת ImageJ 1.33u (NIH), לאחר נורמליזציה המבוססת על הצביעה באתידיום ברומיד, והן מצוינות תחת כל דוגמא.

3.5 חיזוי תעתיקי מטרה של miRNAs שזוהו

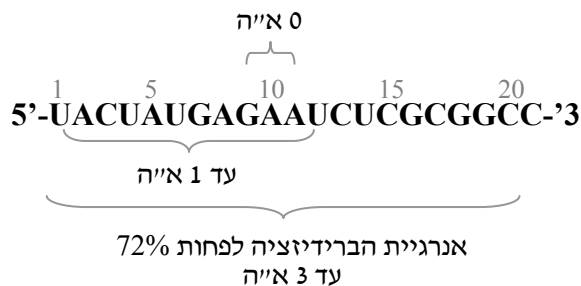
לאחר זיהוי ואפיון ביטוי ה-miRNAs, היה מעניין לבחון איזה גנים הם מבקרים. שלבי החיפוש הביואינפורמטי אחר תעתיקי המטרה, והחלבונים להם הם מקודדים מופיעים באיור 17.



איור מס' 17: שלבי החיפוש הביואינפורמטי אחר תעתיקי מטרות ל-miRNAs שזוהו, והחלבונים להם הם מקודדים
 כל חלון מייצג שלב, המסנן את רצפי הספריה. רצפים שלא עמדו בקריטריון לא עברו לשלב הניתוח הבא. שלב מס' 1:
 סריקה לחיפוש תעתיקי מטרות במאגרי הנתונים של הטחב. שלב מס' 2: רצפי המטרות הראשוניות, מוינו ליצירת
 רשימה ייחודית. שלב מס' 3: סריקת BLASTX של רצפי המטרות הראשוניות מול מאגרי חלבונים.

- ^a- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST?>)
^b- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>)
^c- (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>)

בשל אופי הבקרה של ה-miRNAs המתבסס על השלמת בסיסים, ניתן היה לחזות ביואינפורמטית
 תעתיקי-מטרה. מאגר נתוני ה-EST והמאגר הגנומי של *P. patens* נסרקו בעזרת תוכנת
 PATSCAN (Dsouza et al., 1997) (איור 17, שלב 1) כדי למצוא מקטעים המשלימים לרצפי ה-
 miRNAs, בעלי עד 3 אי התאמות (Rhoades et al., 2002), ובהתאם לקריטריונים, שנקבעו ע"י
 Rhoades ב-2002, ועודכנו ע"י Schwab ב-2005, המתוארים כדלקמן, ומומחשים באיור 18:
 (1) חובת התאמה מוחלטת של ה-miRNA בעמדות 10-11 לתעתיק-המטרה.
 (2) לא יותר מאי-התאמה אחת עבור עמדות 2-12.
 (3) האנרגיה החופשית של צימוד ה-miRNA עם תעתיק-המטרה תהיה לפחות 72% מהאנרגיה של
 צימוד מושלם.



איור מס' 18: קריטריונים לחיזוי תעתיק-מטרה של miRNA
 א"ה - אי-התאמה. המספרים באפור מציינים את עמדות הנוקלאוטידים של ה-miRNA מקצה 5'.

בעבר, גנים מסוג SPL הוכחו בארבידופסיס כמבוקרים ע"י miRNAs (Riechmann et al., 2000), שניים מהם ע"י miR156 (Boutet et al., 2003; Chen et al., 2004; Kasschau et al., 2003). בנוסף לסריקת המאגרים, במעבדה שובט התעתיק Ppt-SBP3 (Arazi et al., 2005), המתאים להיות תעתיק-מטרה של Ppt-miR156. היותו בעל SQUAMOSA promoter binding protein-box (SBP-box) מרמז על מקורו מגן SQUAMOSA-promoter binding Protein-Like (SPL).

תעתיק-מטרה של miRNA אמור לקודד לחלבון, אשר תרגומו נמנע בעקבות הבקרה. בשל היות מאגרי המידע ללא כיווניות, וודאה כיווניות רצף המטרה יחסית ל-miRNA על ידי השוואתו לחלבונים ידועים. במטרה לחפש תעתיקי-מטרה מקודדים הרצפים חולקו לקבוצות דמיון ליצירת רשימה ייחודית בעזרת CLUSTALW (איור 17, שלב 2). בהמשך נערכה לרשימה זו סריקת BLASTX במאגרי החלבונים ב- NCBI, TAIR (איור 17, שלב 3). התוצאות מופיעות בטבלה 2. הוצע שתוצרי ביניים בתהליך עיבוד מרובה שלבים, יכולים לתפקד גם כ-miRNAs (Kurihara and Watanabe, 2004). כדי לבחון אפשרות זאת בטחב, סריקת תעתיקי-מטרה עבור תוצרי הביניים המשוערים: Pp_82, Pp_112 ו-Pp_115 (איור 11) נערכה, כמתואר בתרשים 17. בסריקה זו עלה רצף פוטנציאלי בעל אנוטציה עבור Pp_115 (טבלה 2).

טבלה מס' 2 : מטרות חזויות ומאושרות של *P. patens* miRNAs חזויים, מאושרים ותוצר ביניים

miRNA	מטרה חזויה ^נ	מיקום ברצף המטרה החזויה	אתר הבקרה	החלבון החזוי להיות מקודד מתעתיק-המטרה ²
Ppt-miR156	Pp-SBP3	1394-1383	ORF	Squamosa promoter binding protein (<i>P. patens</i>)
Ppt-miR534	762528681 (2/1)	778-757	ORF	BLADE-ON-PETIOLE2 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
Ppt-miR535a	7486 (3/0)	843-824	5'UTR	DUF822 domain protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
Ppt-miR538	831683602 (2/0)	396-375	ORF/3'UTR	MADS-domain protein (<i>P. patens</i>)
Ppt-miR1210	862817171(4/1)	698-719	ORF	F-box protein-like (<i>Oryza sativa</i>)
Ppt-miR1212	755676308(4/0)	744-724	3'UTR	B-box zinc finger protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
Ppt-miR1215	756726571 (4/2) 830632667(4/2)	530-510 194-174	ORF ORF	Putative protein kinase/ATN1-like protein kinase (<i>Arabidopsis thaliana</i>) photoreceptor (<i>Ceratodon purpureus</i>)
Ppt-miR1216	755698191(4/1)	632-612	ORF	Retrotransposon nucleocapsid protein
Ppt-miR1217	692445811 (2/0) 816301061(1/0) 815676221(3/1)	626-646 559-539 587-567	ORF ORF ORF	disease resistance-like protein (<i>P. patens</i>) phytochrome/light sensor protein kinase (<i>Ceratodon purpureus</i>) photoreceptor (<i>Ceratodon purpureus</i>)
Ppt-miR1218	pphf2k14 (3/0)	561-541	ORF	NAM/ATAF/CUC3 (NAC3) protein (<i>Glycine max</i>)
Ppt-miR1219a	863137111(3/1)	160-140	5'UTR	ABC transporter family protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
Ppt-miR1221	824685933 (4/1)	498-478	ORF	CRE1/WOL/AHK4 histidine kinase cytokinin receptor (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
Ppt-miR1223	859476845 (3/0)	336-316	5'UTR	NAC domain protein NAC2 (<i>Glycine max</i>)
Pp_115	755803697(4/0)	325-305	ORF	DUF647 domain protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

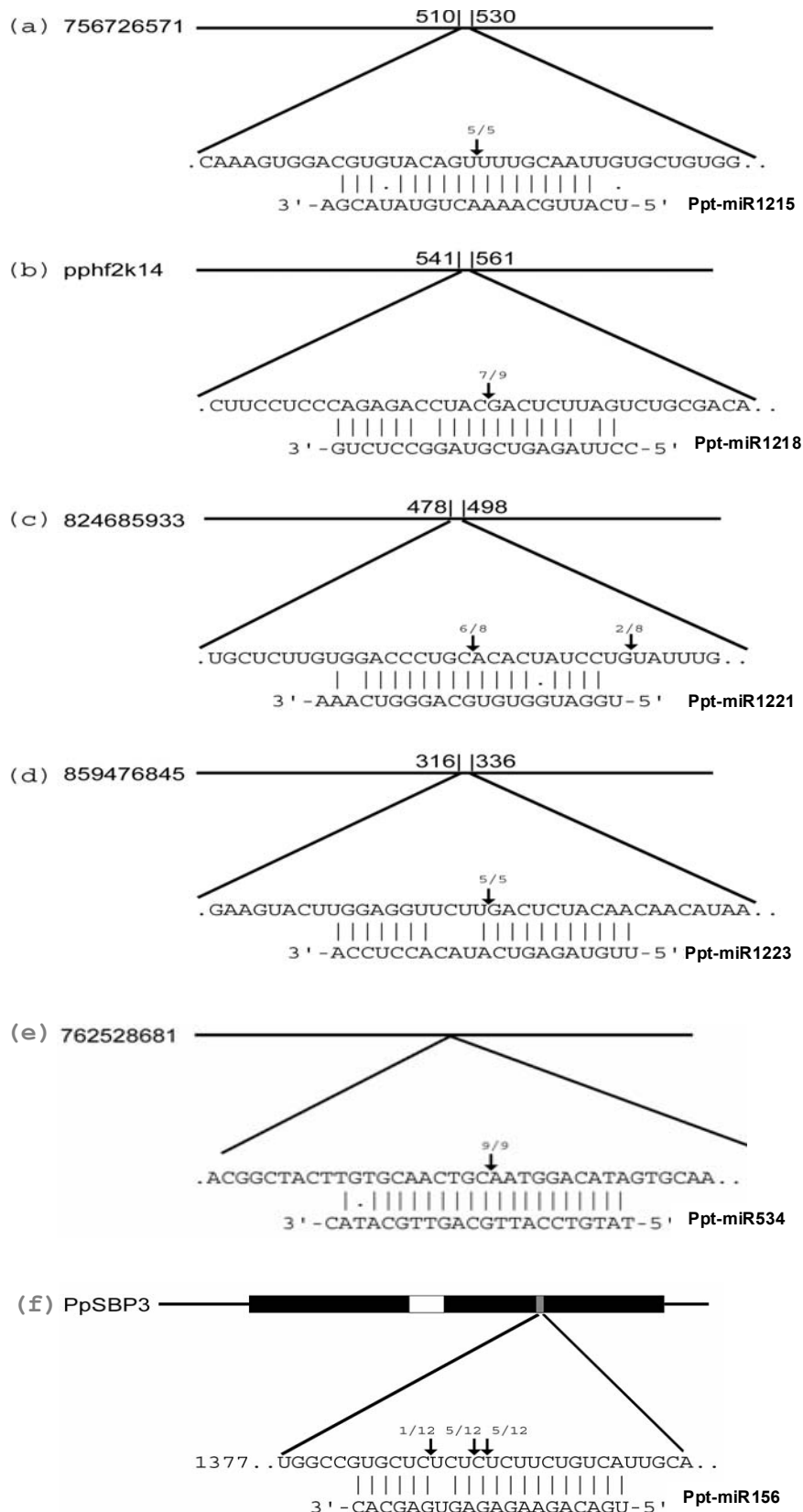
^נ- קונטיגים מה- EST DataBase או trace numbers מהמאגר הגנומי הגולמי של *P. Patens*.
² בסוגריים : מספר אי ההתאמות/מספר ה-G:U wobbles. מטרות שעברו ולידציה מודגשות.
³- סריקת ה-BLASTX נערכה מול מאגרי הנתונים : NCBI, TAIR.

3.6 ווידוא ניסויי של תעתיקי מטרה חזויים

לאחר החיזוי הביואינפורמטי של תעתיקי-מטרה מקודדים, היה צורך לוודא אותם ניסויית. רב ה-miRNAs בצמחים עילאיים מבקרים ביטוי גנים לאחר השיעתוק ע"י הנחיית קומפלקס ה-RISC לחיתוכם (Llave et al., 2002a; Palatnik et al., 2003; Tang et al., 2003). כדי לבחון האם ב-*P. patens* מתבצע חיתוך תעתיקי-המטרה המשוערים *in vivo*, נערך על mRNA מפרוטונמה בת 10 יום וגמטופור בן 45 יום 5'-RACE RNA-ligase mediated (Llave et al., 2002a). לניסוי נבחרו 9 גנים החזויים להיות מבוקרים ע"י miRNAs שונים (טבלה 2): 4 חזויים להיות מבוקרים ע"י miRNAs בעלי ביטוי נמוך (756726571 ו-830632667, ע"י Ppt-miR1215 ; 692445811 ו-816301061, ע"י Ppt-miR1217), 3 ע"י miRNAs בעלי ביטוי גבוה וספציפיים לגמטופור (pphf2k14, ע"י Ppt-miR1218 ; 824685933, ע"י Ppt-miR1221 ; 859476845, ע"י Ppt-miR1223), 1 ע"י miRNA בעל ביטוי גבוה וספציפי לפרוטונמה מועשרת בכלורונמה (762527681)

ע"י Ppt-miR534), ו-1 ע"י miRNA בעל ביטוי גבוה הן בפרוטונמה והן בגמטופור (PpSBP ע"י Ppt-miR156).

תוצרי ה-5' RACE שהוגברו בהצלחה (איור 19a-f) הינם תעתיקים המבוקרים ע"י miRNAs בעלי ביטוי גבוה ונמוך, בפרוטונמה ובגמטופור. עם זאת, מתעתיקים המבוקרים ע"י miRNAs בעלי ביטוי נמוך, ימצאו מעט תוצרי חיתוך, וזו יכולה להיות אחת הסיבות לאי הצלחת הגברה. רב העותקים שרוצפו עבור כל תעתיקי-מטרה מוגבר, נמצאו בעלי אתר חיתוך הסמוך לנוקלאוטידים המשלימים לעמדות 10 ו-11 מקצה 5' של ה-miRNA, כמקובל (Llave et al., 2002a).



איור מס' 19: וידוא תעתיקי-מטרה חזויים של miRNAs בשיטת 5'-RACE

(a)-(f) מייצגים תעתיקי-מטרה, שאתרי החיתוך שלהם נקבעו ע"י RNA ligase-mediated RACE 5'. עמדת הנוקלאוטיד בתוך ה ORF או ה UTR החזויים מצוינים באיור. רצפי ה-miRNAs והרצפים החלקיים של תעתיקי-מטרה מוצגים. החצים מורים על עמדות של אתרי החיתוך העולים מהניסוי, והמספר מעליהם מורה על החלק של תוצרי ה PCR המשובטים, המסתיימים בעמדות המסוימות מסך התוצרים שרוצפו מגן זה. עבור (f) המקטע הלבן והאפור מציינים את מיקום ה-SBP box, ואתר השלמת הבסיסים עם Ppt-miRNA156 בהתאמה.

3.7 sRNAs יחודיים מהספרייה, שאינם miRNAs

חלק מרצפי הספרייה לא נשאו סממנים של miRNAs, אלא דמו ל-siRNA אנדוגני. אחד עשר מהם תאמו למקטע cDNA פרוטונמלי, שאינו מקודד לחלבון, ומשולב ב-contig 13502: siR1(366-344), siR2(363-383), siR3(424-445), siR4(431-452), siR5(458-438), siR6(446-466), siR7(487-467), siRs8/9(509-488), siR10(530-511), siR11(550-531). כמו כן נמצא בקצה הקונטיג אתר קישור ל-Ppt-miR390a (איור 17b). מבחינה ארגונית תעתיק זה דומה לתעתיקים יוצרי ta-siRNAs בארבידופסיס *TASI-3* (Allen et al., 2005). לכן, ה-siRNAs התואמים לו מועמדים להיות ta-siRNAs.

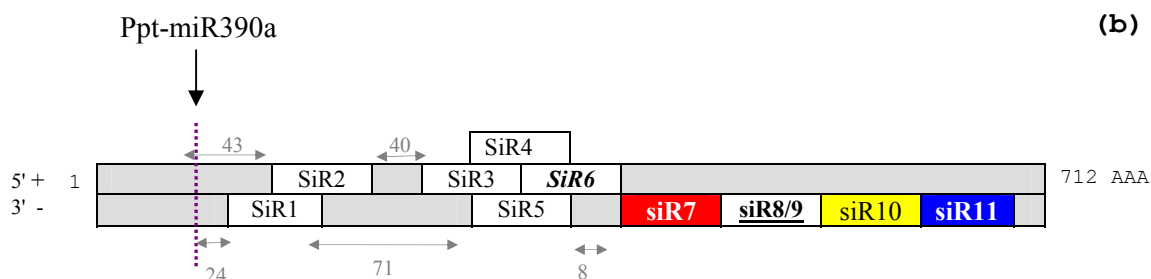
(a)

```

5' +  UTUCAUCCGGUGUCUCUUCUACUGCCUUGCCCACCUACCCUUGUGAUUAUGGGCCGCGCGUG 521
3' -  AAGUAGGCCACGAGAAGAUGACGGAACGGGUGGAUGGGAACACUAUACCGGCCGCGCAC

5' +  UCUCGUGUGUCUCCUGUAUCGGUUGUAUAUCACUCCUGAGCUACGGGUGUGCAAUCCCA 580
3' -  AGACGCACAGAGGACAUAAGCCAACAUAUAUGAGAGGACUCGAUGCCCACACGUUAAGGGU
    
```

(b)

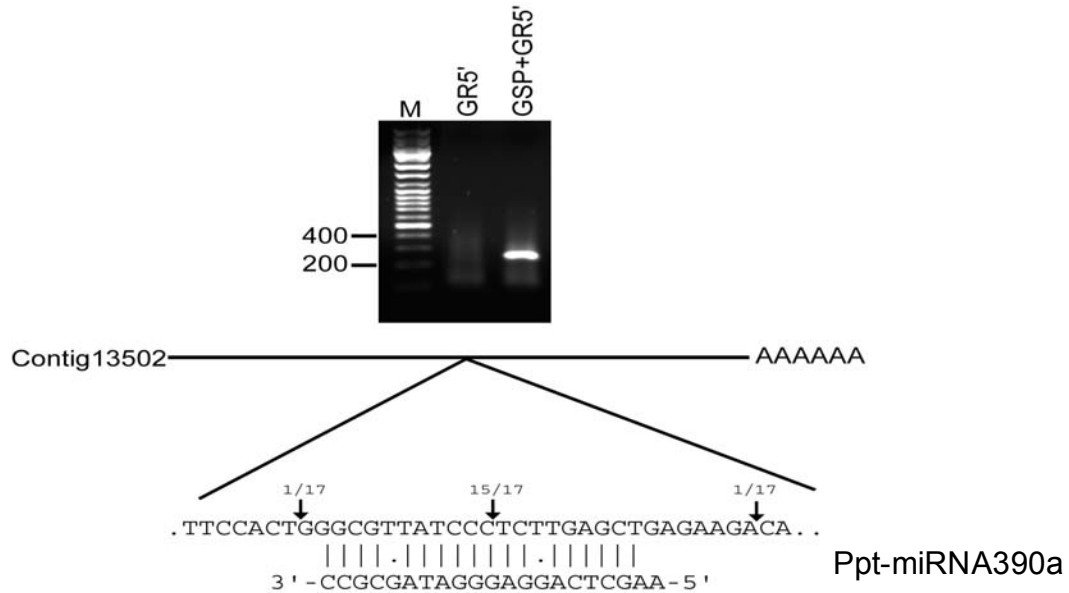


איור מס' 20: ארגון ה-ta-siRNAs המועמדים והאתר החיתוך הראשוני החזוי ב-Contig 13502 (Ppt-TAS4). Ppt-miR390a משמש כתעתיק מטרה של sRNAs אנדוגניים, וחזוי לשמש כתעתיק מטרה של Ppt-miR390a. (a) siR11 מסומן בכחול; siR10 מודגש בצהוב; siR8 מסומן בקן תחתון; siR9 מסומן בהדגשה; siR7 מסומן באדום; siR6 מסומן בכתב נטוי. (b) קו אנכי סגול מקווקו מסמן אתר, החזוי להיות מונחה-חיתוך ע"י Ppt-miR390a. מספרים אפורים מעל חצים אופקיים מציינים את אורך המקטע בנוקלאוטידים. "++" מציינים את הגדיל המרוצף, ו-"--" מציינים את המשלים לו. מספרים בצד השורה מציינים עמדה ביחס לקצה 5'.

קיימת פאזה משותפת ל-siRs7-11 (איור 20a): חפיפה של נוקלאוטיד אחד בין siR10 ל-siR11, ותחום של 23 נוקלאוטידים בין siR7 ל-siR10, בו מסודרים בחפיפה siRs8/9. כמו כן, המרחקים בין האתר החזוי להיות מונחה-חיתוך ע"י Ppt-miR390 לבין siR1 ו-siR2 הוא 24 ו-43 נוקלאוטידים בהתאמה, ובין siR2 ל-siR3 הוא 40 נוקלאוטידים. למרות שמאזורים אילו לא הצלחנו לשבט sRNAs, ניתן לשער כי נמצאים בהם sRNAs היפותטיים בשל גודלם התואם לכפולות של כ-21 נוקלאוטידים.

3.8 ווידוא חיתוך קונטיג 13502 ע"י Ppt-miR390a

בכדי להוכיח שקונטיג 13502 עובר חיתוך בקצה 5' בהנחיית Ppt-miR390a, נערך ניסוי בשיטת RACE. כמוצג באיור 21, 88.2% מרצפי קונטיג 13502 (15/17), נמצאו חתוכים בעמדה המשלימה לנוקלאוטיד העשירי מקצה 5' של Ppt-miR390a. שאר התעתיקים נמצאו חתוכים בסמוך.



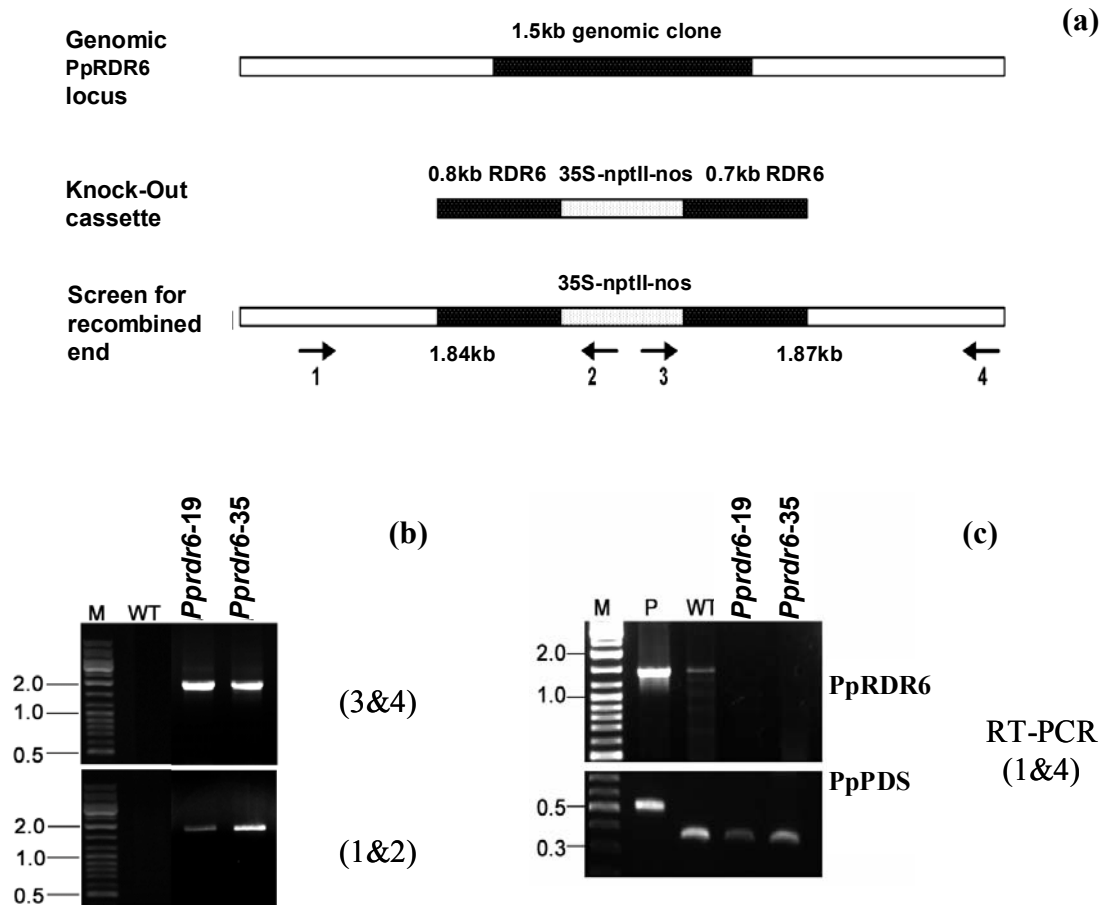
איור מס' 21: ווידוא חיתוך קונטיג 13502 ע"י Ppt-miRNA390a בשיטת 5'-RACE
אתר החיתוך של קונטיג 13502 נקבע בשיטת 5' RNA ligase-mediated RACE. רצף ה-miRNA, ורצף הקונטיג החלקי מוצגים. החצים מורים על עמדות של אתרי החיתוך העולים מהניסוי, והמספר מעליהם מורה על החלק של תוצרי ה-PCR המשובטים, המסתיימים בעמדות המסוימות מסך התוצרים שרוצפו מגן זה. מעל התרשים תמונת גיל אגרוז 1.5% של תוצרי ראקציית ה-RACE עבור תחל של 5' RACE בלבד לעומת 5' RACE primer+Gene specific primer, המחזקים את מהימנות ספציפיות התוצר.

3.9 בדיקת הקשר בין המועמדים ל-ta-siRNAs לבין RdRp בטחב

אחת מדרכי הוכחת ה-siRNAs כ-ta-siRNAs היא ע"י הוכחת תלותם ב-RdRp, בשל מעורבותו בביוגנזה של ta-siRNAs ולא בזו של miRNAs (Allen et al., 2005).

3.9.1 יצירת קווי טחב בעלי מוטציית איבוד תפקוד של RdRp

מבין 6 ההומולוגים של RdRp הידועים כיום בארבידופסיס, שובט במעבדתנו ההומולוג הטחבי של RDR6 בארבידופסיס (PpRDR6), שאינו מוכר עדיין בטחב. בתחילת המחקר היו נתונים בידי קווי *P. patens*, שבוצע בהם PpRdR6 knock-out (*Pprdr6*) ע"י רקומבינציה הומולוגית בשלב הפרוטופלסט. הקווים נוצרו ע"י החדרת קסטה, הכוללת את הגן PpRdR6, ובמרכזו הגן לסלקציה neomycinphosphotransferaseII (nptII), המקנה עמידות לאנטיביוטיקה G418 (איור 22a). הצמחים גודלו לסרוגין על G418 לסלקציית הטרנסגניים. אם PpRDR6 הינו העותק היחיד המתפקד ב-*P. patens*, אזי מוטציית אי תפקוד בו מאפשרת לבחון את תפקידו בטחב.



איור מס' 22: יצירה ווידוא קווי *Ppdr6*

(a) יצירת קסטט cDNA הומולוגי לגן PpRDR6, המכילה במרכזה את הפרומוטור הצמחי CaMV 35S promoter, הרצף nptII ו-nopaline synthase terminator (nos). המספרים מציינים את אורך המיקטע ב-Kb. החצים הממוספרים מציינים תחלים בהם נעשה שימוש ב-(b), (c) – מסומנים בסוגריים מימין לאיורים.

(b) PCR לבדיקת שחלוף כל צד של המחדר נערך על הקווים *Ppdr6-19*, *Ppdr6-35* ו-WT.

(c) בתמונה העליונה: RT-PCR לבדיקת גודל הגן PpRDR6 בקווים *Ppdr6-19*, *Ppdr6-35* ו-WT ובפלסמיד (P), בו שובט רצף ה-cDNA של הגן המקורי RDR6.

בתמונה התחתונה: RT-PCR על גן הביקורת PpPDS המכיל אינטרון בקווים *Ppdr6-19*, *Ppdr6-35* ו-WT מול פלסמיד בו שובט הרצף הגנומי של הגן PpPDS (P).

3.9.2 ברירת הקווים הטרינסגניים

הקווים העמידים ל-G418 נבדקו בעזרת PCR לתקינות החדרת הקסטה ע"י בדיקת השיחלוף בשני צידיה. חשיבת הבדיקה בכך ששחלוף יחיד יוכל להקנות לצמח עמידות ללא ניטרול הגן PpRDR6. בקווים *PpRDR6-19*, *PpRDR6-35* התקבלו בנדים בגודל הצפוי לפי איור 22a, המראים על קיום קשר רציף מאמצע מקטע העמידות ל-nptII לשני קצוות הגן PpRDR6 החובקים אותו. בנדים דומים לא התקבלו, כצפוי, בקו הביקורת WT, שאינו נושא את המחדר (איור 22b).

לאחר בדיקת השיחלוף בכל צד בנפרד, היה צורך לבחון את שניהם יחד: ראקציית RT-PCR עם התחלים 1 ו-4 על קווים בעלי שיחלוף כפול במקום המתאים צפויה לתת תוצר יחיד באורך 3.71Kb (איור 22a). מיקטע זה בקווים *PpRDR6-19*, *PpRDR6-35* היה כפי הנראה ארוך מדי לסינתזה ע"י Taq. Polymerase סטנדרטי בו נעשה שימוש, ולכן לא ניתן להבחין בנגד ברור (איור

22c). לעומת זאת, ריאקציה זהה בגן המקורי צפויה לתת תוצר קצר יותר באורך 1.4Kb (איור 22a), ואכן עבור WT ופלסמיד (P), בו שובט רצף ה-cDNA של הגן המקורי RDR6, התקבל תוצר בגודל הצפוי המתאים ל-Taq Polymerase הסטנדרטי.

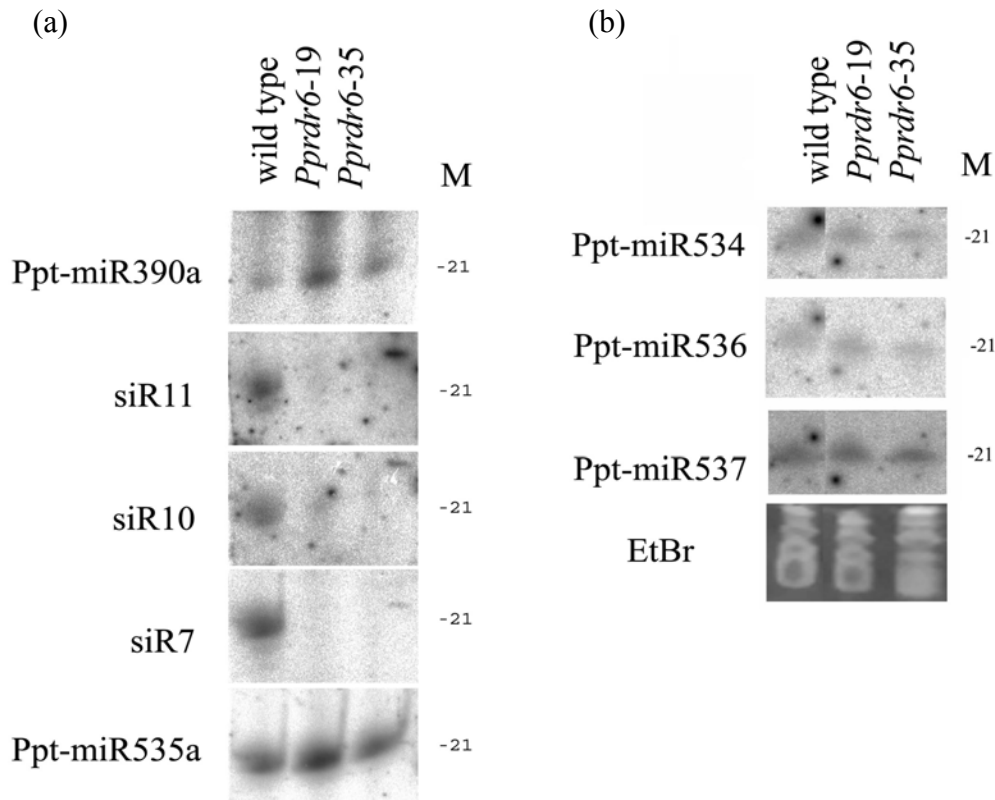
כביקורת נערכה ראקצית RT-PCR עם תחלי גן הביקורת (PpPDS) Phytoene Desaturase (PpPDS) בטחב (איור 22c). לא נראה הבדל בגודל הבנד בין הקווים הנבדקים לטרנסגניות ל-WT. בשל קיום אינטרון באורך של כ-100bp ב-PpPDS נראה הפרש גדלים בין תוצר הפלסמיד לשאר הדוגמאות, שמקורם ב-cDNA. מכך ניתן לעמוד על רמת נקיון הגבוהה של דוגמאות ה-RNA. ניסויים אלה הוכיחו כי ב-PpRDR6-19, PpRDR6-35 קיים מחדר באתר הגן PpRDR6, הכולל במרכזו גן לעמידות G418. מעתה ייקראו קווים אלה : RDR6 knock-outs.

3.9.3 בדיקה ביטוי המועמדים ל-ta-siRNAs בקווי ה-RdRp knock out

בהמשך להוכחת ה-siRs כ-ta-siRNAs ע"י הוכחת תלותם ב-RdRp, נבדק ביטוי siRs7, 10, 11 בקווי ה-RDR6 knock-outs מול ה-WT. שלושת המועמדים ל-ta-siRNAs מתבטאים ב-WT אך לא ב-RDR6 knock-outs. לעומת זאת, Ppt-miR390 האמור לעורר את יצירתם ע"י הנחיית-חיתוך (איור 21), מתבטא הן ב-WT והן ב-RDR6 knock-outs. הוכחת אי הפגיעה בביטוי miRNAs מתחזקת בעקבות ביטויים של Ppt-miR534, Ppt-miR535a, Ppt-miR536, Ppt-miR537 ב-RDR6 knock-outs וב-WT (איור 23).

siRs7,10,11 עומדים בקריטריונים המגדירים ta-siRNAs בארבידופסיס (Allen et al., 2004b; Peragine et al., 2004; Vazquez et al., 2004; 2005): המצאותם, לפחות חלקית, באותה פאזה (איור 20); התעתיק המכיל אותם אושר כמונחה-חיתוך ע"י miRNA (איור 21); והיות ביטויים תלוי ב-RdRp.

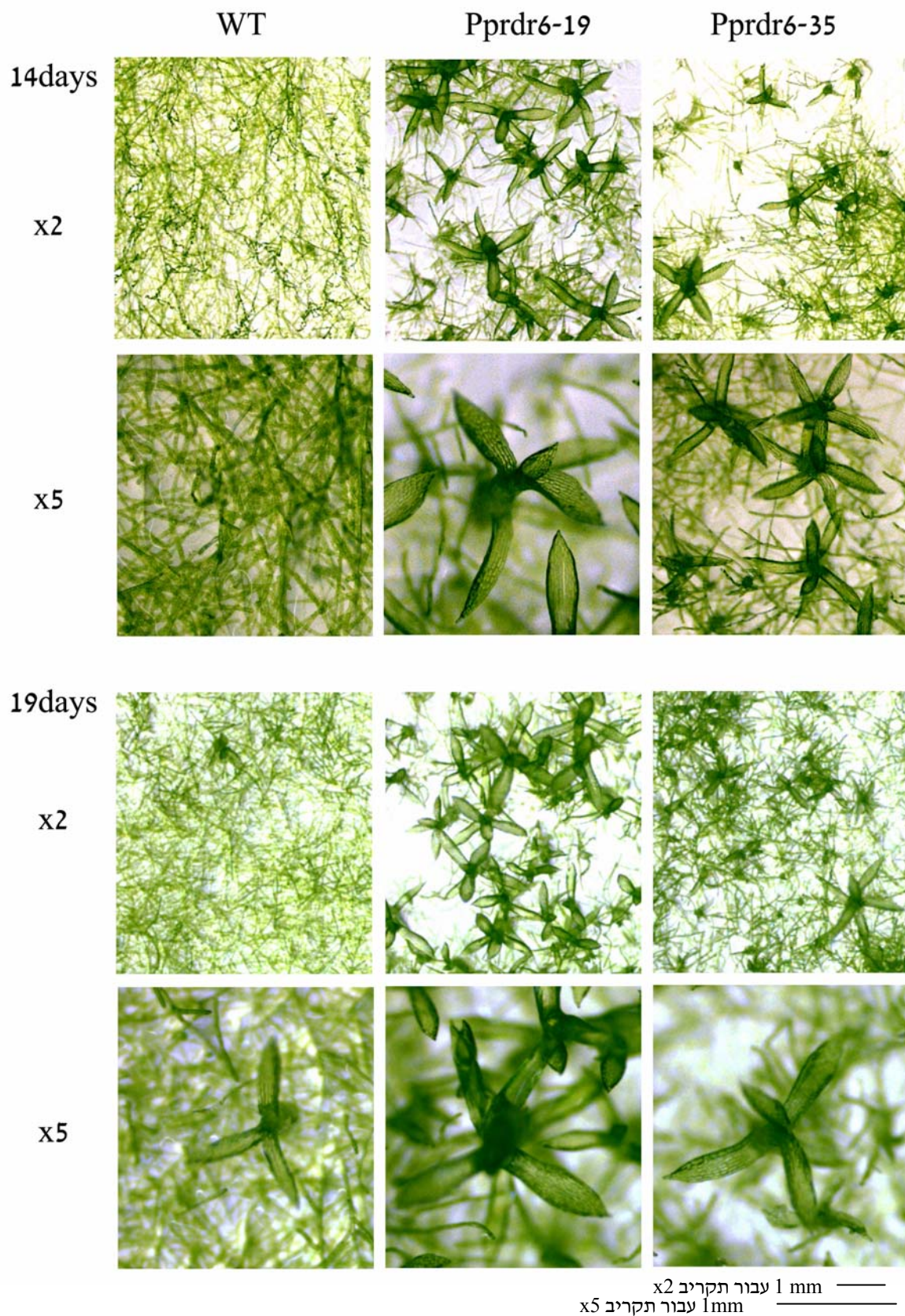
יתר על כן, מעמדם כ-ta-siRNAs מתחזק בעקבות עירור יצירתם ע"י Ppt-miR390a, בעל הומולוג שהוכח כמעורר יצירת ta-siRNAs מהתעתיק *TAS3* בארבידופסיס (Allen et al., 2005). עם זאת, לא נמצאה הומולוגיה מובהקת בין קונטיג 13502 ו-*TAS3*. בעקבות יצירת ta-siRNAs מקונטיג 13502 הוא נקרא : Trans-Acting siRNA4 (Ppt-TAS4).



איור מס' 23: RNA gel blot של המועמדים ל-ta-siRNAs ו-PpmiRNAs בקווי ה-RDR6 knock-outs ו-WT
 דוגמאות RNA בעלות משקל מולקולארי נמוך (השווה ל-500 μg RNA כללי) (a) או 100 μg RNA כללי (b) הופקו מפרוטונמה בת 8-10 יום מקווי ה-RDR6 knock-outs ו-WT. הם נקצרו, הופקו והורצו באופן זהה לאיור מס' 13. כבקרי הטענה נעשה שימוש בגלאי המשלים ל-Ppt-miR535a הקונסטטיטויבי (a), ובפגנדים המציינים tRNA ו-5S rRNA, הנראים ע"י צביעה באתידיום ברומיד של גיל הפוליאקרילאמיד (b). סמן גודל נוקלאוטידים (M).

3.9.4 בחינה מורפולוגית של קווי ה-RdRp knock out

למרות ש-RDR6 מעורב בביוגנזה של ta-siRNAs, קווי ה-RDR6 knock-outs לא נפגעים בהישרדותם בטווח הקצר בתנאי מעבדה. כדי לבדוק אם קיים שוני מורפולוגי בין קווים אילו ל-WT, נבדקה התפתחותם מדי יומיים בתצפיות בעין ותחת בינוקולר (איור 24). קווי ה-RDR6 knock-out נצפו מוציאים גמטופורים צעירים ביום התשיעי, כיומיים לפני ה-WT, שנמצא זמן ארוך יותר בשלב של פרוטונמה בלתי ממוינת. כמו כן, ב-WT יצאו גמטופורים מעטים בהתחלה, לעומת ה-RDR6 knock-out.



איור מס' 24: תצפית על קווי ה-RDR6 knock-outs מול ה-WT
 קווי ה-RDR6 knock-outs וקו ה-WT של *P. patens* נזרעו בצורה הבאה: חמש צלחות טחב בן שבוע מכל קו עברו הומוגניזציה במכשיר homogenizer. 50µl מהטחב הקצוץ הופרדו, נמהלו ב-5ml מים ונזרעו בחמש צלחות חדשות על מצע PPNO₃. הניסוי כלל 3 חזרות בלתי תלויות. הצלחות צולמו לאחר 14 ו-19 יום בבינוקולר x10, דרך עדשת 0.63, והוגדלו פי 2 (סה"כ פי 12.6) או 5 (סה"כ פי 31.5), כמצוין בצד כל שורת תמונות.

4. דיון

4.1 עתיקות הטחב מאפשרת חקר מנגנוני השתקה לאורך האבולוציה

בשולת צמחי היבשה התפצלות ה-bryophytes ממוקמת בנקודה הבסיסית ביותר. תיעודי מאובנים מראים כי טחבים עברו שינויים מורפולוגיים מעטים מאז (Cove et al., 1997; Miller, 1984), ולכן יכולים להיחשב כתצלום-בזק משלב מוקדם של אבולוציית צמחי היבשה. miRNA המופיעים בטחב ובצמחים עילאיים מתפקדים כבקרים שמורים מאז האב הקדמון המשותף האחרון של הטחבים וצמחי הזרעים. פעולתם כנראה משפיעה על המורפולוגיה של צמחים לאורך כל נקודות הפיצול שלהם. עם זאת יתכן וגני-מטרה שמורים גויסו לתפקידים שאינם הומולוגים בשולת הצמחים (Axtell and Bartel, 2005). שינויים קלים בבקרת הגנים לאורך האבולוציה יכלו להביא לשינויים פנוטיפיים רבים במורפולוגיית הצמחים (Axtell and Bartel, 2005). השוואה בין מסלולים הומולוגים ישנים וחדשים, יכולה לשפוך אור על מהות ומורכבות תפקידו הבקרתי של ה-sRNA בצמחים עילאיים. בנוסף, מחקר בטחב מאפשר גילוי miRNAs שנעלמו במהלך האבולוציה, אחרים שמהם הסתעפו משפחות, וחקר גני-מטרה - על התפתחות מסלולי בקרתם, תחת מנגנוני ההשתקה השונים.

4.2 אוכלוסיות sRNAs בצמחים

אוכלוסיות sRNAs שאינן סטרקטורלי, נותחו במקביל לעבודה זו בטחב *P. juniperinum* (Axtell and Bartel, 2005), ונמצא כי בדומה לארבידופסיס (Tang et al., 2003), רצפים רבים היו בגודל של 21 נוקלאוטידים, וביניהם Uridine היה הנוקלאוטיד הנפוץ בקצה 5'. בספריית ה-*P. patens*, הקבוצה הדומיננטית הראתה דפוס דומה (איור 5), המעיד על נוכחות של miRNAs (Arazi et al., 2005; Reinhart et al., 2002). בשני הטחבים גילוי sRNAs בגדלים שונים מצביע על העושר ב-small silencing RNAs.

עם זאת, בשונה מספריית ה-*P. patens* הקבוצה הגדולה ביותר בספריית sRNA בארבידופסיס היא של רצפים בני 24 נוקלאוטידים (Llave et al., 2002b), וביניהם אדנין הנפוץ בקצה 5' (Axtell and Bartel, 2005). סיבה לכך יכולה לנבוע משונות בגני DCL בין טחב וארבידופסיס. בהתאמה לכך חלבוני DCL שונים דווחו ביצירת סוגי sRNAs השונים בגודלם (Xie et al., 2004). בהווה סריקת מאגר ה-EST של *P. patens* עם רצפים המקודדים ל-DCLs שונים של ארבידופסיס (Schauer et al., 2002) לא מגלה התאמה מובהקת ל-RNaseIII domain. ואולם, תוצרי הבניים ששובטו בספרייה וכן ה-miRNAs* מציעים (Talmor-Neiman et al., 2006a), שאנזימים מסוג DCL קיימים ב-*P. patens* ומעורבים בביוגנזה של miRNAs.

4.3 שימור miRNAs בין טחב וצמחים עילאיים

בעבר הוכח קיום miRNAs מצמחים עילאיים בטחב: miR166/165 מבקר בארבידופסיס גנים מ-class III HD-ZIP, אשר קיימים להם הומולוגים בטחב *P. patens*, ואכן נמצא בטחב תוצר

חיתוך הומולוגי לזה שבצמחים עילאיים (Floyd and Bowman, 2004). כמו כן זוהו בטחב *P. juniperinum* הומולוג של Ath-miR160 ותוצר החיתוך שלו (Axtell and Bartel, 2005). בעבודה זו הוצגו הוכחות לקיום ארבע קבוצות נוספות של miRNAs מצמחים עילאיים בטחב: שלושה ידועים (Ppt-miR319, Ppt-miR156, Ppt-miR390), והרביעי זוהה בעבודה זו בטחב ובאורז (Ppt-miR535, Osa-miR535), אך חסר הומולוג בארבידופסיס. כמו כן, בפרקורסורים המשוערים של כל ה-miRNA הטחביים, מקודד ה-miRNA באותה זרוע של סיכת הראש בדומה להומולוג שלו מצמח עילאי (איורים 8,10), דבר המעיד על מוצאם מגן קדמון משותף (Arazi et al., 2006a; Talmor-Neiman et al., 2005). שימור מסוג זה היה ידוע בין ארבידופסיס ואורז (Reinhart et al., 2002), עתה קיומו גם בטחב מרחיב את השימור בין צמחים פורחים ובין טחבים עד למבנה ה-MIR. מקיומו של miR535 בטחב ובצמח עילאי אחד אך לא באחר, ניתן לשער כי היה קיים בטרם התפצלו הטחבים, ולאורך האבולוציה נעלם בחלק מהצמחים. פרקורסורים של Ppt-miR319b הומולוגיים בצמחים עילאיים כוללים Cytosine, שאינו מופיע ב-miRNAs הַשְּׁלִים שלהם, אך קיים ב-Ppt-miR319b בקצה 5' (איור 6). מכך, יתכן כי בצמחים עילאיים נוצר מאותו פרקורסור גם miRNA ארוך עם ציטוזין בקצה 5' כמו בטחב, אך זה אינו שובט עדיין.

4.4 חיזוי והוכחה של miRNAs ב-*P. patens*

על מנת להוכיח את זהותם של ה-sRNA הטחביים השתמשנו בשלושת הגישות הבאות (Ambros et al., 2003; Jones-Rhoades et al., 2006): חיפוש הומולוגיה בין sRNAs מספרייתנו לבין miRNA ידועים; חיפוש רצפים החובקים sRNAs מספרייתנו, אשר עומדים בקריטריונים של פרקורסור של miRNA; והברידיזציות Northern blot לקביעת ביטוי ה-sRNAs בגמטופיט. אסטרטגיה זו הביאה לזיהוי 28 רצפים קצרים בעלי כל המאפיינים של miRNAs בצמחים עילאיים ול-2 miRNAs חזויים.

בנוסף לזיהוי miRNAs חדשים וחזויים על סמך שימור, מבנה שניוני והוכחת ביטוי בלבד, כפי שהתגלה עבור Ppt-miR1211, Ppt-miR1214, Ppt-miR1216, Ppt-miR1220, מעמדם של ה-26 הנותרים מתחזק בעקבות מציאת miRNA* תואם, שימור באורז, מציאת EST המכיל אותם, ביטוי הומולוגים להם בטחב *F. hygrometrica*, מציאת הומולוגים להם ב-sRNAs משובטים בטחב *P. juniperinum*, ווידוא של תעתיק המטרה או הומולוגיה ל-Ppt-miRNAs ידועים (טבלאות 1,2).

30 ה-miRNAs שזוהו על ידנו ב-*P. patens* מתחלקים ל-23 משפחות (טבלה 1), מהן 19 אינן שמורות בצמחים עילאיים. מכך ניתן להסיק שמשפחות אלה נוצרו ספציפית בשושלת הבריופיטים או שאבדו במהלך אבולוציית הצמחים העילאיים. כיום ידועות 25 משפחות miRNAs בארבידופסיס (Xie et al., 2005), 33 באורז (Sunkar and Zhu, 2004; Wang et al., 2004b) ו-21

בצפצה (Lu et al., 2005). מכך, ששיעור הבקרה ע"י miRNAs בטחבים לפחות שווה בהיקפו לזה שבצמחים עילאיים. ממצא זה משקף את תפקידם המרכזי של miRNAs באבולוציה צמחי יבשה.

4.5 בחינת תבנית הביטוי ותעתיקי המטרה של ה-miRNAs החדשים למען הבנת

תפקידם

הביטוי הספציפי של miRNAs בריקמה או בשלב התפתחותי, יכול לספק רמז בדבר תפקידם הביולוגי. (Reinhart et al., 2002; Sunkar and Zhu, 2004; Wang et al., 2004b). בטחב ניתן להבחין בכמה תבניות ביטוי שונות של miRNA בגמטופיט (איורים 13,16):

א. ביטוי miRNA ברמה דומה בגמטופיט הצעיר והבוגר גם יחד (קונסטיטוטבי)

הרצפים Ppt-miR536, Ppt-miR535, miR156, miR390a, Ppt-miRNA319b, miR538 וזהו ברמה דומה בגמטופיט צעיר ובוגר (איור 13a). ישנו קושי להבין את הסיבה לעיכוב תרגום תמידי של תעתיקים מסויימים, במקום האפשרות לעיכוב מוקדם יותר, בשלב השיעתוק. יתכן כי ה-miRNAs מתבטאים בתאים שונים לאורך התפתחות הגמטופיט, ואילו הפרדה בין סוגי התאים השונים במהלך הפקת ה-RNA תגלה תבנית ביטוי משתנה. כמו כן, יתכן שתבנית ביטוי זו נבעה כתוצאה מבדיקת ביטוי ה-miRNAs בגמטופיט בלבד או בתנאי סביבה ספציפיים, ואילו בדיקה נוספת בספורופיט או תחת תנאים נוספים תגלה שינויים בביטויים. בנוסף, סביר להניח כי במיקרים מסויימים קיים איזון כמותי עדין או ביטוי משתנה בין בני משפחה, שגילויים דורש בדיקה רגישה יותר.

תעתיק המטרה המאושר של Ppt-miR156 (איור 19) מקודד להומולוג של SPL, בן למשפחת פקטור שיעתוק, המעורבים כנראה בהתפתחות הצמח (The Arabidopsis Functional Genomics Network: <http://www.bio.uni-frankfurt.de/botanik/mcb/afgn/Huijser.htm>). מתוך 16 גנים מסוג SPL בארבידופסיס (Riechmann et al., 2000), 10 צפויים להיות בעלי אתרים המשלימים ל-miR156 (Rhoades et al., 2002). יתר על כן, תוצרי חיתוך של SPL2 (Boutet et al., 2003) ו-SPL3 (Chen et al., 2004) התואמים חיתוך המונחה ע"י בני משפחת miR156, זהו בארבידופסיס.

בארבידופסיס miR319 יכול לבקר מספר גנים מסוג TCP (Palatnik et al., 2003). גנים אלה מייצגים הומולוגים של גן *snardragon CINCINNATA*, המעורב בבקרה על התפתחות ומורפולוגיה של עלים (Nath et al., 2003). הן *MIR319* והן מוטיב בגנים מסוג TCP נמצאים בטווח רחב של צמחים פורחים, מכך ניתן לשער כי ל-miR319 תפקיד שמור בבקרת מורפוגנזה של עלים (Palatnik et al., 2003). למרות ביטוי הקונסטיטוטבי בגמטופיט, מסקרן לבחון אם Ppt-miR319 מעורב במורפוגנזה של הגמטופור בטחב, המהווה מערכת אטרקטיבית ללמידת היווצרות מבנה העלה מלוח שטוח (Cove et al., 1997).

תעתיק המטרה החזוי של Ppt-miR535 המקודד לחלבון בעל DUF822 domain. חלבונים אלה הם דכאני שיעתוק, הנקשרים ישירות ל-DNA, ומעכבים ביטוי גנים המעורבים ביצירת brassinosteroids, הורמונים צמחיים המעורבים בגדילה והתפתחות (He et al., 2005).

ב. ביטוי ברמה נמוכה בפרוטונמה וברמה גבוהה בגמטופור

הרצפים Ppt-miR533a, Ppt-miR537, Ppt-miR1210, Ppt-miR1213, Ppt-miR1214, Ppt-miR1223, Ppt-miR1221, Ppt-miR1222, Ppt-miR1223, miR1218, התבטאו באופן כמעט בלעדי בגמטופורים בוגרים (איור 13a,b). miRNAs אלה מתפקדים בעיקר בשלבי הגמטופיט הבוגר. בדיקת השלב המדויק בו עולה בצורה חדה כל miRNA תביא להבנה טובה יותר של תפקידו: החל מסילוק תעתיקים המשמרים שלב טרום-התמיינותי בפרוטונמה, מעורבות בהופעת ניצנים או מורפוגנזה העלים וכדומה.

תעתיק המטרה **המאוסר** של Ppt-miR1221 (איור 19), מקודד להומולוג של CRE1/WOL/AHK4 histidine kinase cytokinin receptor בארבידופסיס (Inoue et al., 2001). ב-*P. patens* ציטוקינין משרה הסתעפות כלורונמה (Thelander et al., 2005), והתמיינות של קאולונמה לניצן (Gorton, 1957). מכך, שהרקמה המגיבה לציטוקינין היא הפרוטונמה, ובה יש צורך בביטוי קולטני ציטוקינין. בהתאמה לכך, ניתן לשער שנדירותו של Ppt-miR1221, בפרוטונמה בלתי ממוינת מאפשרת את ביטוי קולטני הציטוקינין. בהמשך, עיי סילוק ה-mRNA המקודד לקולטני ציטוקינין, Ppt-miR1221 יכול להפחית את תגובת הגמטופור לציטוקינין.

תעתיקי המטרה **המאוסרים** של Ppt-miR1218, Ppt-miR1223 (איור 19), מקודדים לחלבונים בעלי NAC domain (NAM בפטוניה, ATAF1, ATAF2, CUC2 בארבידופסיס: NAM/ATAF/CUC). בארבידופסיס פקטורי שיעתוק בעלי NAC-domain, הקושרים DNA (Duval et al., 2002; Xie et al., 2000) הוצגו כמבוקרים עיי miR164 (Mallory et al., 2004a), לשם הפרדת אברים תקינה (Laufs et al., 2004; Mallory et al., 2004a), בקרה הורמונלית, מריסטמה אפיקלית והגנה (Guo et al., 2005). יש להניח כי Ppt-miR1218, Ppt-miR1223 המתבטאים בגמטופור, מעכבים פקטורי שיעתוק מסוג NAC, שמביאים בפרוטונמה לשיעתוק של קבוצות גנים, הקשורות במסלולים מטאבוליים, הפועלים בגמטופיט הצעיר והמתפתח.

תעתיק המטרה החזוי של Ppt-miR538 מקודד לחלבון טחבי בעל MADS-domain. חלבונים אלה שייכים למשפחה של פקטורי שיעתוק, אשר מתפקדים בצמחים עילאיים כבקרים של התפתחות הפרח (Riechmann and Meyerowitz, 1997). חלבון בעל MADS-domain נמצא קשור לתקופה העוברית, בה הוא מבקר גן הקשור במטבוליזם של גיברלין (Wang et al., 2004a). בהתאמה לכך, Ppt-miR538 אמנם נמצא מתבטא בארבעת השבועות הראשונים של התפתחות הטחב, אך ברמה גבוהה יותר בגמטופורים בוגרים (איור 13). יתכן כי ביטוי החלבון בארבעת השבועות הראשונים מעכב חלקית את חלבון המטרה בשלב התפתחותי מוקדם, ושיא ביטוי בגמטופור הבוגר, מביא לחיסולו כליל. למרות שתעתיק המטרה של הגן עדיין לא אושר ניסויית, ישנה סבירות טובה להיותו מבוקר עיי miRNA בטחב, שכן גן בעל MADS-domain נמצא מבוקר

ע"י miR444 באורז, ואף שמור בחיטה, תירס, שעורה וקנה סוכר, אך לא בארבידופסיס (Sunkar et al., 2005).

תעתיק המטרה החזוי של Ppt-miR1210 מקודד לחלבון בעל מוטב דמוי F-box. גנים מקבוצה זו, המעורבים בדגרדציה של חלבונים, אושרו כמטרות של miR393 ו-miR394 בארבידופסיס (Jones-Rhoades and Bartel, 2004).

Ppt-miR537 ו-Ppt-miR533a שכיחים בעיקר בגמטופור, אך נוכחים גם בתאים מתמיינים של קאולונמה: ביטוי מוגבר של Ppt-miR533a, וברמה מעט נמוכה יותר, גם של Ppt-miR537 זוהה בפרוטונמה בתוספת NAA חיצוני (איור 16), אשר מזרז היווצרות תאי קאולונמה (Ashton et al., 1979; Johri and Desai, 1979). המעבר מתאי כלורונמה לקאולונמה ידוע כאורך כ- 24 שעות (Reski, 1998). מכך שהעלייה הספציפית של Ppt-miR537 לאחר מתן של NAA למשך 6 שעות (איור 16b), מרמזת על היותו מבוקר ע"י אוקסין. יתכן ועלייה זו ברמתו נדרשת על מנת לסלק תעתיקים, אשר משמרים את המצב הבלתי ממוין של הפרוטונמה. כמו כן יתכן שהיא אחת מאירועים תוך תאיים רבים, המבוקרים ע"י אוקסין, ומובילים להתמיינות הכלורונמה. בארבידופסיס miR164 הוצג לאחרונה כמושרה ע"י אוקסין (Guo et al., 2005).

ג. ביטוי ברמה גבוהה בפרוטונמה וברמה נמוכה בגמטופור

הרצפים Ppt-miR534, Ppt-miR1211, Ppt-miR1212, Ppt-miR1215, Ppt-miR1216, Ppt-miR1217, Ppt-miR1219a, Ppt-miR1220 זהו בעיקר בפרוטונמה בלתי ממוינת בת שבוע (איור 13a,c). miRNAs אלה מתפקדים בעיקר בשלבי הגמטופיט הצעיר. בדיקת סוג התאים בהם ה-miRNAs שכיחים, תביא להבנה טובה יותר של תפקידם: מסילוק תעתיקים, המקדמים שלב התמיינותי בין כלורונמה לקאולונמה או בהמשך לניצנים ולעלים.

תעתיק המטרה **המאוסר** של Ppt-miR534 (איור 19) מקודד לחלבון הומולוגי ל-BLADE-ON-PETIOLE2 (BOP) בארבידופסיס (טבלה 2). פעילות של מריסטמה אקטופית (בשלב טרום-התמיינותי) נשלטת בארבידופסיס ע"י גנים כדוגמת JAGGED, המבקרים חלוקת תאים (Norberg et al., 2005), וכדוגמת משפחת KNOX, המכילה גנים של Homeobox. בשלב התפתחותי מתקדם יותר, כאשר התאים המייסדים נדחקים הצידה, גנים כאלה, האחראים לתפקוד תאי גזע חייבים לעבור אינאקטיבציה לשם התפתחות עלים סימטרית ותקינה (Barton, 2001). בשלב זה BOP מעכב שיעתוק גנים מסוג KNOX/JAGGED (Norberg et al., 2005), ובכך מסייע להתפתחות העלים. עיכוב BOP ע"י ביטוי Ppt-miR534, בשלב הכלורונמה, מתחזק שלב הקודם להתמיינות. יש לשער כי הירידה בביטוי Ppt-miR534, בשלהי ההתמיינות (הוספת NAA לטווח ארוך), ובטבח הבוגר, מאפשרת את ביטוי BOP, ובכך את תחילת ההתמיינות לגמטופורים. מזהויו של Ppt-miR534 בתחילת המעבר מכלורונמה לקאולונמה (הוספת NAA לטווח קצר) ניתן להסיק שאינו מושפע ישירות ע"י אוקסין, אלא ע"י פקטורים המושפעים בעצמם על ידיו.

שלושת תעתיקי המטרה החזויים של Ppt-miR1215, Ppt-miR1217, המקודדים להומולוגים של phytochrome like kinase/photoreceptors, ותעתיק המטרה **המאוסר** של Ppt-miR1215,

המקודד ל-protein kinase, מכילים kinase domain משוער, הקרוי TyrKc, ומספרו cd00192. מכך ניתן לשער כי miRNAs אלה מבקרים משפחות גנים בעלי TyrKc domain. קטליטי זה מאפיין קינאזות של serin/threonine/tyrosin, המבוקרות ע"י זרחון שייר החומצה האמינית. ארבע מטרות אלה דמויות פיטוכרום, ופוטורצפטורים, מכילות את ה-TyrKc domain בקצה ה-C טרמינלי. פיטוכרום הומולוגי (CpPHY1) אופיין בעבר בטחב *Ceratodon purpureus* (Pasentsis et al., 1998; Thummler et al., 1992). בעל C-termini domain CpPHY1. רקומביננטי הוצג כמזרחן שאריות סרין ותראונין (Thummler et al., 1995). על בסיס מבנהו החזוי, הועלתה השערה כי הפיטוכרום יכול לייצג soluble light sensor protein kinase, המתפקד במפל זירחון תאי (Thummler et al., 1992). מכך, ישנה אפשרות שארבעת המטרות הני"ל signal transduction. דבר דומה הוצג בארבידופסיס עבור miR395, שנמצא מבקר שלושה גנים שונים המעורבים במסלול הטמעת גופרית (Bonnet et al., 2004; Jones-Rhoades and Bartel, 2004). תעתיק מטרה חזוי נוסף של Ppt-miR1217 מקודד ל-disease resistance-like protein, המכיל S_TKc domain, שמספרו cd00180. אתר זה, בן משפחתו של TyrKc הני"ל, פועל בדומה לו על serin/threonine. בקרה זו יכולה להצביע על אפשרות להיות מעורב במסלול הגנתי בטחב. בצפצה מספר גנים של disease resistance אושרו כמטרות של miR482 (Lu et al., 2005). בדומה לו, גם Ppt-miR1216, המתבטא אף הוא בעיקר בפרוטונמה, חזוי לבקר Retrotransposon nucleocapsid protein, העשוי לשמש כחלק מהמערך ההגנתי של הצמח כנגד פולשים. תעתיק המטרה החזוי של Ppt-miR1212 נמצא מקודד לחלבון בעל B-box zinc finger. זהו מוטיב הקושר DNA, ונמצאים בחלבונים המתפקדים, בין היתר, כ transcription factors. תעתיק המטרה החזוי של Ppt-miR1219a מקודד למשפחת החלבונים ATP-Binding Cassette (ABC) transporter. אלו חלבונים טרנסממברנליים שבעזרת ATP מעורבים בהעברת מולקולות, ביניהן אוקסין (Lin and Wang, 2005), דרך קרום התא (Higgins, 1992). נכון לתחילת עבודה זו רק תעתיק המטרה של miR166 וודא ב- *P. patens* (Floyd and Bowman, 2004). המידע המוצג בעבודה זו העלה את מספר תעתיקי המטרה המאושרים ניסויית ב- *P. patens* ל-7. אישור זה מעלה את ההצעה, כי בדומה לצמחים עילאיים (Zhang et al., 2006), *P. Patens'* miRNAs מעורבים בבקרה של מגוון משפחות גנים, חלקן אף אושרו כמטרות של miRNAs בצמחים עילאיים. עובדה זו מדגישה את חשיבות בקרת הגנים הללו בצמחים.

4.6 ביוגנזה של miRNA בטחב

א. miRNA*

הוצג בעבר כי אנזימי DCL1 בארבידופסיס (Park et al., 2002; Reinhart et al., 2002) ובאורז (Liu et al., 2005) מעורבים בצבירת miRNAs. זיהוי 7 miRNAs* (טבלה 1) בעקבות ניתוח

המבנה השניוני של הפרקורסורים, סיפק את ההוכחה הראשונה למעורבות אנזים דמוי Dicer (Elbashir et al., 2001a), שעדיין לא אופיין בביוגנזה של miRNAs בטחב.

ב. תוצרי ביניים של ביוגנזת miRNA

הוצע בעבר, שפרקורסורים, שזרועותיהם ארוכות מ-42 נוקלאוטידים, יכולים לעבור שלבי חיתוך מרובים, ובסופם מתקבלים בנוסף ל-miRNA הבשל גם תוצרי ביניים באורך של 20-21 נוקלאוטידים (Chen, 2005; Kurihara and Watanabe, 2004). Pp_82 מופה לזרועות סיכת ראש באורך של כ-49 נוקלאוטידים, בסמוך ל-miRNA הבשל (איור 11a). לכן, ניתן להסיק כי הוא תוצר ביניים של עיבוד מרובה שלבים.

Pp_112 ו-Pp_115 יוצרים מבנה דמוי miRNA:miRNA* , שמופה לזרועות מבנה סיכת הראש של *Ppt-MIR319d* בין הדופלקס miRNA:miRNA* עצמו לבין הלולאה (איור 11b). זוהי הראייה הראשונה של שלב עיבוד, המתרחש באזור זה של הפרקורסור הצמחי, וככל הנראה תלוי באנזים דמוי Dicer. יש לצפות ששלבי עיבוד דומים מתרחשים בפרקורסורים אחרים בעלי מבנה דומה, משום שמבנה כזה הינו טיפוסי לסובסטרט של Dicer. שאלה מעניינת היא האם שלב זה מתבצע לפני או לאחר שחרור דופלקס ה-miRNA:miRNA*.

מעניין לציין כי (Li et al., 2005b) מצאו בארבידופסיס ובאורז pre-miRNAs ממשפחות *MIR319* ו-*MIR159* בעלי זרועות סיכה מאורכות ושמורות בצורה לא טיפוסית. זאת בנוסף לאזור ה-miRNA:miRNA* שלהם, שהינו שמור בצורה טיפוסית ברב ה-pre-miRNAs במשפחה. הם שיערו כי שימור זה של הזרועות המאורכות, מציין מקטע פונקציונלי או אפילו מקודד ל-miRNA, בְּשָׁל נוסף. בהשערתם תומכים גילוי Pp_115, Pp_112 ותעתיק המטרה החזוי של Pp_115, המקודד לחלבון הומולוגי מארבידופסיס בעל אזור שמור (26301) DUF647, שתפקידו לא ידוע. אולם, רק אישור עתידי של תעתיק המטרה יוכיח את השערתם. עם זאת, משום ש-*Ppt-MIR319d* חזוי להיות הפרקורסור של Ppt-miR319b, שהינו ה-sRNA הנפוץ ביותר בספרייטנו, לא ניתן לשלול את האפשרות ש-Pp_112 ו-Pp_115 מיצגים שיירים לא פונקציונליים מעיבוד פרקורסור נפוץ.

4.7 ta-siRNAs

הוכחת 3 ta-siRNAs הינה גילוי ראשון מסוגו בטחב, המוכיח קיום מנגנוני השתקה מגוונים, השמורים בצמחים עילאיים. ההתבגרות המואצת של צמחי ה-RDR6 knock-out לעומת צמח הבר (איור 24), תואמת ממצאים קודמים בהם קווי RDR6 knock-out בארבידופסיס מראים האצה של שלב המעבר מהצעיר (juvenile) לבוגר בלוי פגמים מורפולגיים (Allen et al., 2005; Peragine et al., 2004). הם העלו השערה לפיה RdRp הוא אחד הגנים המתחזקים את השלב הצעיר ע"י מעורבות בעיכוב ביטוי גנים המקדמים התבגרות. בהתאמה להשערתם, ה-ta-siRNAs אכן מתבטאים בטחב הבר בפרוטומה, אך ביטויים טרם נבדק בשלב ההתבגרות. בארבידופסיס הגנים

הנתונים לעיכוב נמצאו כמתבטאים ברמה גבוהה בעיקר באברים המתפתחים בשלב הצעיר (פסיגים, עלים צעירים). מעניין יהיה לבדוק את ביטויים בשלב צעיר יותר לפני ההתמיינות.

לסיכום: בעבודתי זו זוהו ב-*P. patens* 28 miRNAs שאושרו ו-2 miRNAs חזויים. ל-13 מהם נחזו תעתיקי מטרה המקודדים לחלבונים, 6 מהם הוכחו ניסויית. בנוסף, זוהו 3 תוצרי ביניים של ביוגנזת miRNAs, אחד מהם אף חזוי לתפקד כ-miRNA. יתר על כן זוהה תעתיק היוצר לפחות 3 ta-siRNAs, וה-miRNA המעורר את יצירתם. כמו כן התגלה לראשונה קיום אנזימים מסוג RdRp ו-Dicer בטחב. בכל שלבי העבודה עלו מרכיבים שמורים בין הטחב לצמחים עילאיים, שהדגישו את עתיקות וחשיבות מנגנוני ההשתקה בצמחים. חקר קבוצות ה-sRNAs, שהתגלו במחקר זה בטחב, עשוי לספק תובנות לגבי גני-בקרה, ששיחקו תפקיד עוד משחר התבססות הצמחים ביבשה. אפשרויות למחקר עתידי:

- ❖ בזכות היכולת לבצע מוטציות ממוקדות בגנום ה-*P. patens*, ניתן לבחון את תפקידי ה-MIRs השונים ע"י יצירת קווי-חסר ספציפיים, ו/או לבצע החלפה של גן-המטרה במטרה דומה אך עמידה ל-miRNA, ולבדוק את ההשפעה על הטחב.
- ❖ Micro-array של טחב בר מול טחב עם חסר בגן MIR או מול קווי ה-RDR6 knock-out, לבדיקת גנים המועמדים לשמש גני-מטרה של ה-miRNA או ה-ta-siRNAs בהתאמה.
- ❖ הברידיוציית *in-situ* לבחינת סוג התאים והתזמון המסויימים, בהם מתבטאים miRNAs מסויימים.

כדי לבצע מחקרים אלו ואחרים, מערכות אוספים של מוטנטים מאופיינים בטחב הולכים ונהיים נגישים לציבור. זיהוי מוטנטים נוספים וגני-מטרה של miRNAs מתקדם בקצב מהיר, ומסלולי ביוגנזה ובקרה של sRNAs הולכים ומתבהרים. האנוטציה של גנום הטחב תאפשר בקרוב גילוי של מטרות נוספות, שאף יתכן כי מקודדות לחלבונים חדשים בטחב. מידע כזה יעשיר את הידע על התפקידים השונים של miRNAs בצמחים עילאיים.

Bibliography

- Achard, P., A. Herr, D.C. Baulcombe, and N.P. Harberd. 2004. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131:3357-65.
- Adai, A., C. Johnson, S. Mlotshwa, S. Archer-Evans, V. Manocha, V. Vance, and V. Sundaresan. 2005. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 15:78-91.
- Allen, E., Z. Xie, A.M. Gustafson, and J.C. Carrington. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121:207-21.
- Allen, E., Z. Xie, A.M. Gustafson, G.H. Sung, J.W. Spatafora, and J.C. Carrington. 2004. Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 36:1282-90.
- Ambros, V., B. Bartel, D.P. Bartel, C.B. Burge, J.C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun, and T. Tuschl. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9:277-9.
- Arazi, T., M. Talmor-Neiman, R. Stav, M. Riese, P. Huijser, and D.C. Baulcombe. 2005. Cloning and characterization of micro-RNAs from moss. *Plant J* 43:837-48.
- Ashton, N.W., N.H. Grimsley, and et al. 1979. Analysis of Gametophytic Development in the Moss, *Physcomitrella-Patens*, Using Auxin and Cytokinin Resistant Mutants. *Planta* 144:427-435.
- Axtell, M.J., and D.P. Bartel. 2005. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell* 17:1658-73.
- Bartel, B., and D.P. Bartel. 2003. MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol* 132:709-17.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-97.
- Barton, M. 2001. Leaving the meristem behind: regulation of KNOX genes. *Genome Biol* 2 (1):reviews 1002.1-reviews 1002.3.
- Baumberger, N., and D.C. Baulcombe. 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11928-33.
- Bonnet, E., J. Wuyts, P. Rouze, and Y. Van de Peer. 2004. Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11511-6.
- Bopp, M. 1979. *The Hormonal Regulation of Morphogenesis in Mosses*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980.

- Boutet, S., F. Vazquez, J. Liu, C. Beclin, M. Fagard, A. Gratias, J.B. Morel, P. Crete, X. Chen, and H. Vaucheret. 2003. Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr Biol* 13:843-8.
- Carmell, M.A., and G.J. Hannon. 2004. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11:214-8.
- Chen, J., W.X. Li, D. Xie, J.R. Peng, and S.W. Ding. 2004. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* 16:1302-13.
- Chen, X. 2005. MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Lett* 579:5923-31.
- Collins, R.E., and X. Cheng. 2005. Structural domains in RNAi. *FEBS Lett* 579:5841-9.
- Cove, D. 2000. The moss *Physcomitrella patens*. *J. Plant Growth Regul* 19:275-283.
- Cove, D. 2005. The moss *Physcomitrella patens*. *Annu Rev Genet* 39:339-58.
- Cove, D.J., C.D. Knight, and T. Lamparter. 1997. Mosses as model systems. *Trends in Plant Science* 2:99-105.
- Dezulian, T., J. Palatnik, D. Huson, and D. Weigel. 2005. Conservation and divergence of microRNA families in plants [Online] <http://genomebiology.com/2005/6/11/p13>.
- Dsouza, M., N. Larsen, and R. Overbeek. 1997. Searching for patterns in genomic data. *Trends Genet* 13:497-8.
- Duval, M., T.F. Hsieh, S.Y. Kim, and T.L. Thomas. 2002. Molecular characterization of AtNAM: a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily. *Plant Mol Biol* 50:237-48.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001a. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Elbashir, S.M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001b. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20:6877-88.
- Floyd, S.K., and J.L. Bowman. 2004. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants. *Nature* 428:485-6.
- Frey, W. 1981. Morphologie und Anatomie der Laubmoose. *Adv Bryol* 1:399-449.
- Goldberg, R.B. 1988. Plants: novel developmental processes. *Science* 240:1460-7.
- Gorton, B.a.E., RE. 1957. Development of the gametophyte in the moss *tortella caespitosa*. *Bot Gaz* 119:31-8.

- Guo, H.S., Q. Xie, J.F. Fei, and N.H. Chua. 2005. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for arabidopsis lateral root development. *Plant Cell* 17:1376-86.
- Gustafson, A.M., E. Allen, S. Givan, D. Smith, J.C. Carrington, and K.D. Kasschau. 2005. ASRP: the Arabidopsis Small RNA Project Database. *Nucleic Acids Res* 33:D637-40.
- Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell, and D. Baulcombe. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J* 21:4671-9.
- Hamilton, A.J., and D.C. Baulcombe. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-2.
- Han, M.H., S. Goud, L. Song, and N. Fedoroff. 2004. The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1093-8.
- He, J.X., J.M. Gendron, Y. Sun, S.S. Gampala, N. Gendron, C.Q. Sun, and Z.Y. Wang. 2005. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307:1634-8.
- Herr, A.J. 2005. Pathways through the small RNA world of plants. *FEBS Lett* 579:5879-88.
- Herr, A.J., M.B. Jensen, T. Dalmay, and D.C. Baulcombe. 2005. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308:118-20.
- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67-113.
- Inoue, T., M. Higuchi, Y. Hashimoto, M. Seki, M. Kobayashi, T. Kato, S. Tabata, K. Shinozaki, and T. Kakimoto. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* 409:1060-3.
- Janzen, P. 1929. Die entwicklung und biologie von *Funaria hygrometrica* Vermag Max Lande, Berlin-Schoneberg.
- Jenkins, G.a.C.D. 1983. Light requierments for regeneration of protoplasts of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 157:39-45.
- Johri, M.M., and S. Desai. 1973. Auxin regulation of caulonema formation in moss protonema. *Nat New Biol* 245:223-4.
- Jones-Rhoades, M.W., and D.P. Bartel. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14:787-99.
- Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel, and B. Bartel. 2006. MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 57:19-53.

- Kasschau, K.D., Z. Xie, E. Allen, C. Llave, E.J. Chapman, K.A. Krizan, and J.C. Carrington. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* 4:205-17.
- Kim, V.N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:376-85.
- Knoop, B. 1984. *Development of bryophytes* Academic press, London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo.
- Kurihara, Y., and Y. Watanabe. 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12753-8.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-8.
- Laufs, P., A. Peaucelle, H. Morin, and J. Traas. 2004. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* 131:4311-22.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-54.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, and V.N. Kim. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-9.
- Li, J., Z. Yang, B. Yu, J. Liu, and X. Chen. 2005a. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol* 15:1501-7.
- Li, Y., W. Li, and Y.X. Jin. 2005b. Computational identification of novel family members of microRNA genes in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37:75-87.
- Lim, L.P., N.C. Lau, E.G. Weinstein, A. Abdelhakim, S. Yekta, M.W. Rhoades, C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2003. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17:991-1008.
- Lim, L.P., N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley, and J.M. Johnson. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769-73.
- Lin, R., and H. Wang. 2005. Two homologous ATP-binding cassette transporter proteins, AtMDR1 and AtPGP1, regulate Arabidopsis photomorphogenesis and root development by mediating polar auxin transport. *Plant Physiol* 138:949-64.
- Liu, B., P. Li, X. Li, C. Liu, S. Cao, C. Chu, and X. Cao. 2005. Loss of function of OsDCL1 affects microRNA accumulation and causes developmental defects in rice. *Plant Physiol* 139:296-305.

- Liu, J., M.A. Carmell, F.V. Rivas, C.G. Marsden, J.M. Thomson, J.J. Song, S.M. Hammond, L. Joshua-Tor, and G.J. Hannon. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437-41.
- Llave, C., Z. Xie, K.D. Kasschau, and J.C. Carrington. 2002a. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297:2053-6.
- Llave, C., K.D. Kasschau, M.A. Rector, and J.C. Carrington. 2002b. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14:1605-19.
- Lorkovic, Z.J., D.A. Wieczorek Kirk, M.H. Lambermon, and W. Filipowicz. 2000. Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci* 5:160-7.
- Lu, S., Y.H. Sun, R. Shi, C. Clark, L. Li, and V.L. Chiang. 2005. Novel and mechanical stress-responsive MicroRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2186-203.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg, and U. Kutay. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303:95-8.
- Mallory, A.C., and H. Vaucheret. 2004. MicroRNAs: something important between the genes. *Curr Opin Plant Biol* 7:120-5.
- Mallory, A.C., D.P. Bartel, and B. Bartel. 2005. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* 17:1360-75.
- Mallory, A.C., D.V. Dugas, D.P. Bartel, and B. Bartel. 2004a. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol* 14:1035-46.
- Mallory, A.C., B.J. Reinhart, M.W. Jones-Rhoades, G. Tang, P.D. Zamore, M.K. Barton, and D.P. Bartel. 2004b. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *Embo J* 23:3356-64.
- Meins, F., Jr., A. Si-Ammour, and T. Blevins .2005 .RNA silencing systems and their relevance to plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:297-318.
- Mette, M.F., J. van der Winden, M. Matzke, and A.J. Matzke. 2002. Short RNAs can identify new candidate transposable element families in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130:6-9.
- Miller, N.D. 1984. Tertiary and quarternary fossils, p. 1194-1232, *In* R. M. Schuster, ed. *New Manual of Bryology*. Myazaki-ken, Japan: Hattori Bot. Lab.
- Nath, U., B.C. Crawford, R. Carpenter, and E. Coen. 2003. Genetic control of surface curvature. *Science* 299:1404-7.

- Nishiyama, T., T. Fujita, I.T. Shin, M. Seki, H. Nishide, I. Uchiyama, A. Kamiya, P. Carninci, Y. Hayashizaki, K. Shinozaki, Y. Kohara, and M. Hasebe. 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8007-12.
- Norberg, M., M. Holmlund, and O. Nilsson. 2005. The *BLADE ON PETIOLE* genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development* 132:2203-13.
- Novina, C.D., and P.A. Sharp. 2004. The RNAi revolution. *Nature* 430:161-64.
- Palatnik, J.F., E. Allen, X. Wu, C. Schommer, R. Schwab, J.C. Carrington, and D. Weigel. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425:257-63.
- Papp, I., M.F. Mette, W. Aufsatz, L. Daxinger, S.E. Schauer, A. Ray, J. van der Winden, M. Matzke, and A.J. Matzke. 2003. Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol* 132:1382-90.
- Parizotto, E.A., P. Dunoyer, N. Rahm, C. Himber, and O. Voinnet. 2004. In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev* 18:2237-42.
- Park, W., J. Li, R. Song, J. Messing, and X. Chen. 2002. *CARPEL FACTORY*, a Dicer homolog, and *HEN1*, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12:1484-95.
- Parker, J.S., S.M. Roe, and D. Barford. 2005. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434:663-6.
- Pasentsis, K., N. Paulo, P. Algarra, P. Dittrich, and F. Thummler. 1998. Characterization and expression of the phytochrome gene family in the moss *Ceratodon purpureus*. *Plant J* 13:51-61.
- Patikoglou, G.A., J.L. Kim, L. Sun, S.H. Yang, T. Kodadek, and S.K. Burley. 1999. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev* 13:3217-30.
- Peragine, A., M. Yoshikawa, G. Wu, H.L. Albrecht, and R.S. Poethig. 2004. *SGS3* and *SGS2/SDE1/RDR6* are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18:2368-79.
- Reinhart, B.J., E.G. Weinstein, M.W. Rhoades, B. Bartel, and D.P. Bartel. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16:1616-26.
- Rensing, S.A., S. Rombauts, Y. Van de Peer, and R. Reski. 2002. Moss transcriptome and beyond. *Trends Plant Sci* 7:535-8.

- Reski, R. 1998. Development, genetics and molecular biology of mosses. *Botanica Acta* 111:1-15.
- Reski, R. 1999. Molecular genetics of *Physcomitrella*. *planta* 205:301-309.
- Reski, R., M. Faust, X.H. Wang, M. Wehe, and W.O. Abel. 1994. Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. *Mol Gen Genet* 244:352-9.
- Reutter, K., Atzorn, R., Hadel, B., Schmulling, T., Reski, R. 1997. Expression of the bacterial *ipt* gene in *physcomitrella* rescues mutations in budding and in plastid division. submitted.
- Rhoades, M.W., B.J. Reinhart, L.P. Lim, C.B. Burge, B. Bartel, and D.P. Bartel. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513-20.
- Riechmann, J.L., and E.M. Meyerowitz. 1997. Determination of floral organ identity by Arabidopsis MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. *Mol Biol Cell* 8:1243-59.
- Riechmann, J.L., J. Heard, G. Martin, L. Reuber, C. Jiang, J. Keddie, L. Adam, O. Pineda, O.J. Ratcliffe, R.R. Samaha, R. Creelman, M. Pilgrim, P. Broun, J.Z. Zhang, D. Ghandehari, B.K. Sherman, and G. Yu. 2000. Arabidopsis transcription factors :genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290:2105-10.
- Schaefer, D. 1994. Molecular genetic approaches to the biology of the moss *Physcomitrella patens*, University of Lausanne.
- Schaefer, D.G. 2001. Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Curr Opin Plant Biol* 4:143-50.
- Schaefer, D.G., and J.P. Zryd. 1997. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 11:195-206.
- Schaefer, D.G., and J.P. Zryd. 2001. The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant Physiol* 127:14.30-8
- Schauer, S.E., S.E. Jacobsen, D.W. Meinke, and A. Ray. 2002. DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends Plant Sci* 7:487-91.
- Schoene, K. 1906. Beitrage zur Kenntnis der Keimung der Laubmoossporen und zur Biologie der Laubmoosrhiziden. *Flora* 96:276-321.
- Schulte, J., and R. Reski. 2004. High throughput cryopreservation of 140,000 *Physcomitrella patens* mutants. *Plant Biol (Stuttg)* 6:119-27.
- Schwab, R., J.F. Palatnik, M. Riester, C. Schommer, M. Schmid, and D. Weigel. 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 8:517-27.
- Schwarz, D.S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P.D. Zamore. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.

- Shahmuradov, I.A., A.J. Gammerman, J.M. Hancock, P.M. Bramley, and V.V. Solovyev. 2003. PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 31:114-7.
- Shen, B., and H.M. Goodman. 2004. Uridine addition after microRNA-directed cleavage. *Science* 306:997.
- Sijen, T., J. Fleenor, F. Simmer, K.L. Thijssen, S. Parrish, L. Timmons, R.H. Plasterk, and A. Fire. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-76.
- Song, J.J., S.K. Smith, G.J. Hannon, and L. Joshua-Tor. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305:1434-7.
- Song, J.J., J. Liu, N.H. Tolia, J. Schneiderman, S.K. Smith, R.A. Martienssen, G.J. Hannon, and L. Joshua-Tor. 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10:1026-32.
- Souret, F.F., J.P. Kastanmayer, and P.J. Green. 2004. AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* 15:173-83.
- Sugiura, C., Y. Kobayashi, S. Aoki, C. Sugita, and M. Sugita. 2003. Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of *rpoA* from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Res* 31:5324-31.
- Sunkar, R., and J.K. Zhu. 2004. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2001-19.
- Sunkar, R., T. Girke, P.K. Jain, and J.K. Zhu. 2005. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell* 17:1397-411.
- Talmor-Neiman, M., R. Stav, W. Frank, B. Voss, and T. Arazi. 2006a. Novel microRNAs and intermediates of micro-RNA biogenesis from moss. *Plant J* 47:25-37.
- Talmor-Neiman, M., R. Stav, L. Klipcan, K. Buxdorf, D.C. Baulcombe, and T. Arazi. 2006b. Identification of trans-acting siRNAs in moss and an RNA-dependent RNA polymerase required for their biogenesis. *plant J*, in press.
- Tang, G., B.J. Reinhart, D.P. Bartel, and P.D. Zamore. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17:49-63.
- Thelander, M., T. Olsson, and H. Ronne. 2005. Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*. *J Exp Bot* 56:653-62.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80.
- Thummler, F., M. Dufner, P. Kreis, and P. Dittrich. 1992. Molecular cloning of a novel phytochrome gene of the moss *Ceratodon purpureus* which encodes a putative light-regulated protein kinase. *Plant Mol Biol* 20:1003-17.
- Thummler, F., R. Herbst, P. Algarra, and A. Ullrich. 1995. Analysis of the protein kinase activity of moss phytochrome expressed in fibroblast cell culture. *Planta* 197:592-6.
- Tomari, Y., and P.D. Zamore. 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19:517-29.
- Tomari, Y., C. Matranga, B. Haley, N. Martinez, and P.D. Zamore. 2004. A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306:1377-80.
- Vaistij, F.E., L. Jones, and D.C. Baulcombe. 2002. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 14:857-67.
- Vaucheret, H., F. Vazquez, P. Crete, and D.P. Bartel. 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18:1187-97.
- Vazquez, F., V. Gascioli, P. Crete, and H. Vaucheret. 2004a. The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol* 14:346-51.
- Vazquez, F., H. Vaucheret, R. Rajagopalan, C. Lepers, V. Gascioli, A.C. Mallory, J.L. Hilbert, D.P. Bartel, and P. Crete. 2004b. Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol Cell* 16:69-79.
- Voinnet, O. 2004. Shaping small RNAs in plants by gene duplication. *Nat Genet* 36:1245-6.
- Wang, H., L.V. Caruso, A.B. Downie, and S.E. Perry. 2004a. The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell* 16:1206-19.
- Wang, J.F., H. Zhou, Y.Q. Chen, Q.J. Luo, and L.H. Qu. 2004b. Identification of 20 microRNAs from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Res* 32:1688-95.
- Wang, X.J., J.L. Reyes, N.H. Chua, and T. Gaasterland. 2004c. Prediction and identification of Arabidopsis thaliana microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol* 5:R65.
- Xie, Q., G. Frugis, D. Colgan, and N.H. Chua. 2000. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* 14:3024-36.

- Xie, Z., E. Allen, N. Fahlgren, A. Calamar, S.A. Givan, and J.C. Carrington. 2005. Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiol* 138:2145-54.
- Xie, Z., L.K. Johansen, A.M. Gustafson, K.D. Kasschau, A.D. Lellis, D. Zilberman, S.E. Jacobsen, and J.C. Carrington. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2:E104.
- Yan ,K.S., S. Yan, A. Farooq, A. Han, L. Zeng, and M.M. Zhou. 2003. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426:468-74.
- Yoo, B.C., F. Kragler, E. Varkonyi-Gasic, V. Haywood, S. Archer-Evans, Y.M. Lee, T.J. Lough, and W.J. Lucas. 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* 16:1979-2000.
- Yoshikawa, M., A. Peragine, M.Y. Park, and R.S. Poethig. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* 19:2164-75.
- Zhang, B., X. Pan, G.P. Cobb ,and T.A. Anderson. 2006. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol* 289:3-16.
- Zhang, H., F.A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, and W. Filipowicz. 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118:57-68.