

Mechanizmy i role rozwojowe regulacji RNA za pomocą XRN-2 w *Caenorhabditis elegans*.

Ilkin Aygün Soyalp

STRESZCZENIE

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej oferują dogłębne zrozumienie funkcji XRN-2, eksorybonukleazy 5'-3', występującej głównie w jądrzecomórkowym. Enzym ten odgrywa istotne role w procesie ekspresji genów i rozwoju nicieni *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). XRN-2 bierze udział w degradacji i cięciu różnych klas RNA, co istotnie wpływa na procesy takie jak terminacja transkrypcji i biogeneza rybosomów. Pomimo szerokiej specyficzności substratowej *in vitro*, na skutek interakcji *in vivo* z różnymi białkami XRN-2 selektywnie oddziałuje z wybranymi cząsteczkami RNA. XRN-2 jest niezbędna podczas krytycznych etapów rozwoju *C. elegans*, jednakże dokładne molekularne mechanizmy jej działania pozostają nieznane ze względu na jej rozległy wzorzec ekspresji w trakcie rozwoju organizmu.

Aby uzyskać głębsze zrozumienie roli XRN-2 w rozwoju nicieni, niniejsza praca szczegółowo opisuje dwie obrane strategie badawcze. Pierwsza strategia koncentrowała się na zidentyfikowaniu genetycznych supresorów powiązanych z XRN-2 w trakcie rozwoju, w celu odkrycia konkretnej roli, jaką w tym kontekście odgrywa XRN-2. Drugie podejście polegało na zidentyfikowaniu partnerów tzw. syntetycznej letalności XRN-2. Badanie to miało na celu odkrycie funkcjonalnej zależności między XRN-2 a jego partnerami, prowadząc do zrozumienia ról XRN-2 w określonych szlakach molekularnych podczas rozwoju nicienia.

Zastosowanie tych dwóch strategii badawczych miało na celu poznanie złożonej sieci molekularnej, w której XRN-2 funkcjonuje w trakcie rozwoju, ze szczególnym uwzględnieniem supresorów i partnerów syntetycznej letalności. Ostatecznym celem było wyjaśnienie funkcji i mechanizmów regulacyjnych XRN-2 w złożonych procesach rozwojowych. Celem badania było lepsze zrozumienie biologii rozwoju, a tym samym dostarczenie cennych informacji na temat wzajemnego oddziaływania genów i szlaków molekularnych podstawowych procesów biologicznych.

W pierwszej części badań zbadano rolę XRN-2 w linii zarodkowej *C. elegans* przy użyciu specyficznego dla linii zarodkowej mutantu warunkowego (*xrn-2ts^{germ}*) XRN-2, który został stworzony w celu identyfikacji genetycznych supresorów bezpłodności. Stwierdzono, że cztery geny, *dpy-10*, *osr-1*, *ptr-6* i C34C12.2 posiadają allele utraty funkcji i zbadano ich rolę w znoszeniu bezpłodności u mutantu. Spośród tych genów zidentyfikowano *dpy-10*, *osr-1* i *ptr-6* jako pozytywne regulatory *gpdh-1*, kluczowego enzymu w procesie produkcji glicerolu. Po wyciszeniu ekspresji tych genów zaobserwowano podwyższony poziom mRNA *gpdh-1* i przywrócenie płodności u *C. elegans*. Co więcej, zasugerowano, że białko jądrowe C34C12.2, wykazujące homologię z *S. cerevisiae* Net1, odgrywa rolę w regulacji dojrzewania rRNA. Ponadto zaobserwowano przywrócenie płodności u nicieni *xrn-2ts^{germ}* w wyniku obniżenia poziomu białka NRDE-2, które jest składnikiem maszyny jądrowego RNAi i służy jako partner oddziałujący białka C34C12.2 u *C. elegans*. Odkrycie to sugeruje kluczową rolę XRN-2 w rozwoju linii zarodkowej, szczególnie w kontekście dojrzewania rRNA.

W drugiej części badania zidentyfikowano PUF-9 jako partnera syntetycznej letalności XRN-2 u *C. elegans*. Odkrycie to podkreśla kluczową rolę PUF-9 w rozwoju tego organizmu. Kiedy poziom *puf-9* został obniżony u wrażliwego na temperaturę mutantu *xrn-2* w (*xrn-2ts*), nicienie były ospałe, wykazywały znaczny spadek witalności i zaostrenie fenotypów takich jak tworzenie pęcherzy i wady w okresie linienia. Co ważne, stwierdzono, że PUF-9 jest niezbędny do rozwoju linii zarodkowej. Zmutowane nicienie *puf-9* wykazywały zmniejszoną ilość potomstwa i znaczące defekty linii zarodkowej, w tym nieprawidłowy rozwój oocytów, upośledzoną migrację gonad i bezpłodność. Ponadto *puf-9* wykazywał syntetyczną letalność w stosunku do *puf-3* i *puf-8*, co wskazuje na potencjalną interakcję genetyczną między tymi białkami. Obniżenie poziomu ekspresji *puf-*

3 lub *puf-8* u zmutowanych nicieni *puf-9* spowodowało znaczące nieprawidłowości w rozwoju linii zarodkowej, co dodatkowo podkreśla kluczową rolę PUF-9 w tym procesie biologicznym. Oprócz tego obserwacja zmniejszonej liczby potomstwa u podwójnego mutantu *xrn-2;puf-9*, w przeciwieństwie do efektów obserwowanych u pojedynczych mutantów tych genów, implikuje wspólną funkcjonalność PUF-9 i XRN-2 w regulacji rozwoju linii zarodkowej *C. elegans*.

Na koniec, podjęto próbę identyfikacji specyficznych docelowych cząsteczek mRNA regulowanych przez XRN-2 i mechanizmów degradacji RNA. Aby to osiągnąć, wykorzystano dane uzyskane z kompleksowej analizy ekspresji RNA w czasie, przeprowadzonej u wrażliwego na temperaturę mutantu *xrn-2*. Wyodrębniono dwa zbiory cząsteczek RNA, u których zaobserwowano zwiększone i obniżone poziomy ekspresji w wyniku inaktywacji *xrn-2*. Zauważono, że na większość genów o podwyższonym poziomie ekspresji wpływały zdarzenia typu *read-through* z genów znajdujących się powyżej, podczas gdy obniżony poziom RNA wynikał z zawady przestrzennej pomiędzy cząsteczkami polimerazy RNA 2 (RNAPII). Dogłębna analiza danych z sekwencjonowania RNA mutantu *xrn-2ts* wykazała, że po inaktywacji *xrn-2* zaobserwowano wzrost ekspresji *ceh-99*, chociaż wzrostu tego nie można było przypisać transkrypcji typu *read-through* z genu znajdującego się powyżej. Ta intrygująca obserwacja wzbudziła nasze zainteresowanie, co doprowadziło do wyboru *ceh-99* jako głównego kandydata do odkrycia mechanizmów leżących u podstaw regulacji za pośrednictwem XRN-2. Wykazano, że rola XRN-2 polega na tłumieniu ekspresji *ceh-99* poprzez przedwczesną terminację RNAPII i selektywną represję izoformy *ceh-99* z dłuższym 5'UTR. Dodatkowo zidentyfikowano insercję autonomicznego transpozonu DNA TC1 w pierwszym regionie intronu genu *ceh-99*. Ponadto zaobserwowano, że poziom ekspresji TC1 wzrósł po inaktywacji *xrn-2*, co wskazuje, że XRN-2 reguluje transpozon TC1, przynajmniej częściowo, poprzez locus *ceh-99*.