

Streszczenie w języku polskim rozprawy doktorskiej pt. „Analiza roli wybranych egzorybonukleaz i polimeraz poli(A) u myszy domowej”

Rozwój zwierząt charakteryzuje się szybkim i dynamicznym różnicowaniem nowych typów komórek i tkanek. Wymaga to precyzyjnej regulacji ekspresji genów w celu kontrolowania losu komórek, często na poziomie transkryptomu. Z tego powodu od dłuższego czasu różne etapy rozwoju zwierząt są uważane za użyteczne modele do badania poliadenylacji RNA i selektywnej degradacji transkryptów, bowiem te dwa mechanizmy mogą być decydującymi czynnikami w ścieżce różnicowania komórki.

W większości komórek somatycznych ogon poli(A) decyduje o losie transkryptu – dłuższy ogon umożliwia wydajną translację, podczas gdy jego skracanie stanowi sygnał do degradacji transkryptu. Jednak w oogenezie utrzymywanie krótkiego ogona oligo(A) stabilizuje transkrypty nagromadzone w cytoplazmie do momentu inicjacji dojrzewania, kiedy to selektywna poliadenylacja umożliwia ich translację, co jest kluczowym procesem w rozwoju oocytu. Jednak myszy pozbawione GLD2, jedynej znanej cytoplazmatycznej polimerazy poli(A) w oocycie, pozostają płodne, czyniąc niezbędną aktywność innych, nieznanych polimeraz poli(A) w oogenezie.

Z drugiej strony wiadomo, że mechanizmy kontroli jakości i degradacji RNA mogą regulować pluripotencję i różnicowanie komórek poprzez selektywną degradację mRNA. Zarówno deadenylacja, jak i usuwanie czapeczki (z dodatkową urydylacją pomiędzy tymi etapami) mogą wywoływać egzorybonukleolityczną degradację odpowiednio przez kompleks egzosomu i Xrn1. Co istotne, do dzisiaj wykazano, że tylko te egzorybonukleazy związane z egzosomem, EXOSC10 i DIS3, są niezbędne dla rozwoju zarodkowego myszy.

Oba te aspekty regulacji transkryptomu w rozwoju były przedmiotem mojego projektu doktorskiego. Badałem rolę nowej rodziny polimeraz poli(A) - TENT5 - w oogenezie oraz ostatniej podjednostki katalitycznej cytoplazmatycznego kompleksu egzosomu o nieokreślonej roli - egzorybonukleazy DIS3L w embriogenezie myszy.

Niekanoniczne polimerazy poli(A) TENT5B i TENT5C odgrywają niezbędną, ale redundantną rolę w prawidłowej folikulogenezie i rozwoju oocytów. Mutacja typu knock-out w obu genach prowadzi do degeneracji oocytów, podczas gdy wprowadzenie sekwencji kodującej białko GFP do genu *Tent5b* prowadzi do zaburzeń w organizacji chromatyny w oocycie, co również prowadzi do bezpłodności. Bezpośrednie sekwencjonowanie RNA

ujawniło, że białka TENT5 poliadenylują szereg niezbędnych, specyficznych dla oocytów transkryptów kodujących wydzielane białka, w szczególności ZP3 i GDF9. Test z użyciem reporterów RNA wykazał, że sekwencja kierująca do siateczki śródplazmatycznej może być czynnikiem determinującym poliadenylację transkryptu przez białka TENT5. Dodatkowo, badanie kompozycji ogona poli(A) u zwierząt typu dzikiego ujawniło specyficzną nadreprezentację urydyny blisko końca 3' w podgrupie transkryptów niezbędnych do spermatogenezy.

Tymczasem białko DIS3L jest niezbędne do rozwoju zarodka. Z zarodków pozbawionych DIS3L wyprowadzić można zdrowe zarodkowe komórki macierzyste, ale same zarodki przestają rozwijać się po 6,5 dniach od zapłodnienia. Sekwencjonowanie RNA z blastocyst z mutacją typu knock-out w genie *Dis3l* wykazało akumulację kilkunastu transkryptów. Co ciekawe jednak, poziom białek kodowanych przez te transkrypty był obniżony, co spowodowane było globalnym obniżeniem produkcji białek w zarodkach z mutacją genu *Dis3l*.