

**Autoreferat**

**Role rozwojowe i mechanizmy regulacyjne  
rybonukleazy XRN2**

**Takashi Miki, Ph. D.**

**Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk**

## 1. Imię i nazwisko:

Takashi Miki

## 2. Wykształcenie

### 2006 Doktorat w dziedzinie nauk medycznych

Wydział biologii komórki i neurologii, Medyczne Studium Podyplomowe, Uniwersytet w Osace, Osaka, Japonia

“Functional analysis of the RNA-binding protein Staufen2” (Analiza czynnościowa białka wiążącego RNA Staufen2)

Promotor: Prof. Yoshihiro Yoneda

### 2002 Magisterium inżynierskie

Wydział inżynierii mechanicznej, Uzupełniające studia magisterskie w dziedzinie inżynierii, Uniwersytet w Kyoto, Kyoto, Japonia

“Single molecule imaging of DNA polymerase  $\beta$  sliding along DNA” (Obrazowanie pojedynczej cząsteczki polimerazy DNA beta przesuwałcej się po nici DNA)

Promotor: Prof. Masao Washizu

## 3. Zatrudnienie naukowe

### styczeń 2018 r.- do chwili obecnej

Adiunkt w pracowni doktora Rafała Cioska, w Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań, Polska

### kwiecień 2011 r.- grudzień 2017 r.

Pracownik naukowy ze stopniem doktora w pracowni doktor Helge Großhans w Instytucie badań biomedycznych im. Friedricha Mieschera w Bazylei, Szwajcaria

### grudzień 2006 r.- marzec 2010 r.

Pracownik naukowy ze stopniem doktora w pracowni prof. Shuh Narumiya na Uniwersytecie w Kyoto, Kyoto, Japonia

### kwiecień - listopad 2006 r.

Pracownik naukowy ze stopniem doktora w pracowni prof. Yoshihiro Yonedy na Uniwersytecie w Osace, Osaka, Japonia

## 4. Osiągnięcie naukowe

### 4.1. Tytuł

Role rozwojowe i mechanizmy regulacyjne rybonukleazy XRN2

### 4.2. Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe

1. **Miki TS\***, Großhans H\* (2013) The multifunctional RNase XRN2. *Biochem Soc Trans* 41: 825-830.

\*Autorzy korespondujący

**IF<sub>2013</sub> = 3.238, MNiSW = 30**

*Jestem współautorem tej pracy przeglądowej. Mój wkład: 50%.*

2. **Miki TS\***, Rüegger S\*, Gaidatzis D, Stadler MB, Großhans H (2014) Engineering of a conditional allele reveals multiple roles of XRN2 in *Caenorhabditis elegans* development and substrate specificity in microRNA turnover. *Nucleic Acids Res* 42: 4056-4067.

\* Wspólnie autorzy główni

**IF<sub>2014</sub> = 9.112, MNiSW = 40**

*Jestem twórcą warunkowego allelu *xrn-2*, zbadałem rolę odgrywaną przez XRN2 w rozwoju *C. elegans* i stabilności miRNA, oraz jestem współautorem pracy. Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 4 i 5, oraz uzupełniającej ryc. S1-4. Mój wkład: 50%.*

3. **Miki TS**, Richter H, Rüegger S, Großhans H (2014) PAXT-1 promotes XRN2 activity by stabilizing it through a conserved domain. *Mol Cell* 53: 351-360.

**IF<sub>2014</sub> = 14.018, MNiSW = 50**

*Zaplanowałem i przeprowadziłem wszystkie doświadczenia genetyczne i część biochemicznych oraz jestem współautorem pracy. Moje wyniki przedstawione są na ryc. 1E, 2, 3B-C, 4 i 5(A, B, D-F) oraz na dodatkowych ryc. S1B-C, S2, S3B, S4 i S5. Mój wkład: 70%.*

4. **Miki TS**, Carl SH, Stadler MB, Großhans H (2016) XRN2 autoregulation and control of polycistronic gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 12: e1006313.

**IF<sub>2016</sub> = 6.100, MNiSW = 45**

*Zaplanowałem i przeprowadziłem wszystkie doświadczenia i jestem współautorem pracy. Moje wyniki przedstawione są na wszystkich rycinach, podczas gdy analizy obliczeniowe i uzupełniająca ryc. S5 zostały przygotowane przez współautora. Mój wkład: 85%.*

5. **Miki TS\*<sup>#</sup>**, Carl SH\*, Großhans H<sup>#</sup> (2017) Two distinct transcription termination modes dictated by promoters. *Genes Dev* 31: 1870-1879.

\* Wspólnie autorzy główni; # Autorzy korespondujący

**IF<sub>2017</sub> = 9.462, MNiSW = 45**

*Zaplanowałem i przeprowadziłem wszystkie doświadczenia i jestem współautorem pracy. Moje wyniki przedstawione są na wszystkich rycinach, podczas gdy analizy obliczeniowe na ryc. 1-3 i uzupełniające ryc. 1, 2 i 5 zostały przygotowane przez współautora. Mój wkład: 50%.*

### 4.3. Streszczenie osiągnięcia naukowego

Rozwój organizmu zwierzęcia to dynamiczny proces, w którym poszczególne komórki dzielą się i różnicują w odpowiednich momentach i odpowiednich miejscach, tworząc funkcjonalne tkanki. U podstaw tego procesu leży precyzyjna przestrzenno-czasowa kontrola ekspresji genów. Różnorodne typy RNA odgrywają zasadnicze role we wszystkich aspektach ekspresji genów. Ich ilość stanowi wynik równowagi pomiędzy biogenezą a rozkładem. Podczas gdy biogeneza RNA, a w szczególności kontrola transkrypcyjna, została dobrze przebadana, regulacja rozkładu RNA i wpływ tego procesu na rozwój zwierzęcia, jest procesem słabo poznanym. Rybonukleazy (RNazy) odgrywają ważną rolę w rozkładzie RNA. XRN2 jest jądrową 5'-do-3' egzorybonukleazą rozkładającą jednoniciowe RNA z 5' monofosforanem do mononukleotydów. Jej celem są różne cząsteczki RNA, takie jak pre-mRNA, pre-rRNA i mikroRNA (miRNA). Enzym ten uczestniczy w procesach dojrzewania, kontroli, a także sterowaniu ilością i aktywnością tych kwasów poprzez dokonywanie rozkładu lub skracanie (Miki et al., 2013, *Biochem Soc Trans*). XRN2 odgrywa także rolę w terminacji transkrypcji polimerazy RNA II (Pol II) dokonując rozkładu fragmentów powstałych w wyniku rozszczepienia końca 3' transkryptu pierwotnego (piśmiennictwo 1, 2). Ze względu na to, że te funkcje XRN2 były badane głównie w prostych systemach komórkowych, takich jak drożdże i ssacze linie komórkowe, ich znaczenie w organizmach wielokomórkowych pozostawało niejasne. Dokonałem wyboru nicienia *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) jako modelu zwierzęcego, na którym badałem role ewolucyjnie konserwatywnej RNazy XRN2 w procesach rozwojowych.

Dzięki opracowaniu warunkowego allelu, który umożliwił ostrą dezaktywację XRN2 drogą zmiany temperatury, stwierdziliśmy, że XRN2 odgrywa zasadniczą rolę w embriogenezie, rozwoju larwalnym i rozrodzie *C. elegans* (Miki et al., 2014, *Nucleic Acids Res*). Badanie wpływu dezaktywacji XRN2 na stabilność miRNA wykazało, że XRN2 rozkłada swoistą podgrupę cząsteczek miRNA (Miki et al., 2014, *Nucleic Acids Res*). Ponieważ XRN2 nie jest swoisty wobec określonych sekwencji docelowych cząsteczek RNA w warunkach *in vitro*, odkrycie to oznacza konieczność istnienia uczestniczących w interakcji cząsteczek partnerskich, które wskazują swoiste cząsteczki RNA przeznaczone do rozkładu. I rzeczywiście, zidentyfikowaliśmy nowe białka wiążące RNA oraz inne typy białek, będące partnerami enzymu XRN2 u różnych gatunków, w tym u *C. elegans* i u człowieka. Białka te posiadają ewolucyjnie konserwatywny motyw, określony przez nas jako nowa domena wiązania XRN2. Scharakteryzowaliśmy jedno z

tych białek, PAXT-1, i stwierdziliśmy, że stabilizuje ono XRN2 trwale zachowując RNazową aktywność tego enzymu, przez co wspiera przeżywalność zwierząt w trudnych warunkach środowiska, np. w podwyższonej temperaturze (Miki *et al.*, 2014, *Mol Cell*).

Nasze wysiłki zmierzające do wyjaśnienia wpływu XRN2 na ekspresję genów w całym genomie doprowadziły nas do dwóch głównych odkryć. Po pierwsze, że XRN2 hamuje ekspresję swoistej podgrupy genów, rozkładając ich pierwotne transkrypty. Jedną z cząsteczek docelowych jest sama XRN2. Ten samo-regulacyjny obwód służy zachowaniu prawidłowej ilości i aktywności XRN2 pomimo zmian warunków środowiska (Miki *et al.*, 2016, *PLoS Genet*). Po drugie, choć sądzono, że XRN2 jest ogólnym terminatorem transkrypcji, nasze analizy ilościowe dotyczące całego genomu wskazały, że obecność XRN2 jest konieczna wyłącznie w odniesieniu do swoistej podgrupy genów *C. elegans*. Co intrygujące, o tej swoistości decydują promotory, a nie końcówki genów, przy których zachodzi terminacja (Miki *et al.*, 2017, *Genes Dev*).

Podsumowując, seria badań dotyczących ewolucyjnie konserwatywnej RNazy XRN2 wskazała, że:

- Obecność XRN2 jest konieczna dla różnych aspektów rozwoju *C. elegans*, włącznie z embriogenezą, rozwojem larwalnym i płodnością.
- XRN2 reguluje ekspresję genów poprzez rozkład swoistej podgrupy cząsteczek miRNA oraz pre-mRNA.
- Ekspresja i aktywność XRN2 są trwale podtrzymywane pomimo zmiennych warunków środowiska, dzięki obecności cząsteczki wiążącej PAXT-1 na poziomie białka i poprzez samoregulację na poziomie transkryptu.
- Różne białka tworzą kompleksy z XRN2 za pośrednictwem ewolucyjnie konserwatywnej domeny wiążącej XRN2, którą nazwaliśmy XTBD (XRN-Two-binding domain).
- XRN2 odgrywa zasadniczą rolę w terminacji transkrypcji swoistej podgrupy genów. Swoistość ta jest determinowana przez cząsteczki promotorowe.

Odkrycia te wskazują na istotną rolę rozkładu RNA przez XRN2 w prawidłowej ekspresji genów i rozwoju zwierzęcia. Metodologia badawcza opracowana dla tej RNazy, np. opracowanie allelu warunkowego metodą inżynierii genetycznej oraz platform analitycznych dla oceny ekspresji/obrotu RNA, może znaleźć zastosowanie w badaniu innych RNaz. Sądzimy także, że ułatwi prowadzenie badań mających na celu zrozumienie znaczenia metabolizmu RNA w rozwoju zwierząt.

## 4.4. Opis poszczególnych publikacji

### 4.4.1.

**Miki TS\***, Großhans H\* (2013) The multifunctional RNase XRN2. *Biochem Soc Trans* 41: 825-830.

W tym artykule opisano funkcje XRN2 w procesach dojrzewania, kontroli oraz sterowania aktywnością różnych typów RNA u drożdży, orzęsków, roślin i ssaków. Zauważono także brakujące połączenie pomiędzy czynnościami komórkowymi a fizjologicznymi rolami spełnianymi przez XRN2. Połączenie to stało się przedmiotem późniejszych badań.

### 4.4.2.

**Miki TS**, Rüegger S, Gaidatzis D, Stadler MB, Großhans H (2014) Engineering of a conditional allele reveals multiple roles of XRN2 in *Caenorhabditis elegans* development and substrate specificity in microRNA turnover. *Nucleic Acids Res* 42: 4056-4067,2

### Określanie ról XRN2 w procesach rozwoju

Aby zbadać role spełniane przez XRN2 w rozwoju *C. elegans*, postanowiliśmy scharakteryzować mutant z delecją *xrn-2*. Robaki ginęły we wczesnym stadium larwalnym. Procesowi temu zapobiegało białko XRN2 dzikiego typu, lecz efekt taki nie był obserwowany w odniesieniu do katalitycznie martwego XRN2, co sugerowało, że rozkład RNA pod wpływem XRN2 jest konieczny dla rozwoju larwalnego *C. elegans*. Role spełniane przez XRN2 na innych etapach rozwoju były maskowane śmiercią zwierząt we wczesnym stadium larwalnym. Aby pokonać tę przeszkodę, opracowaliśmy allel warunkowy genu *xrn-2*, umożliwiający ostrą dezaktywację XRN2 poprzez zmianę temperatury na dowolnym etapie rozwoju zwierzęcia. Przy użyciu tego allelu stwierdziliśmy, że poza wolą w rozwoju larwalnym, XRN2 odgrywa zasadniczą rolę w embriogenezie i rozrodzie. To, które docelowe cząsteczki RNA są rozkładane przez XRN2 w każdym z procesów rozwojowych, pozostaje do wyjaśnienia.

Mutant warunkowy służył jako główne narzędzie w moich badaniach nad XRN2, które zaowocowały jeszcze trzema publikacjami, opisanymi poniżej. Zastosowana przez nas metoda stworzenia mutantu warunkowego opierała się na wrażliwych na temperaturę allelach homologów XRN2 u drożdży. Mając na względzie to, że allele wrażliwe na temperaturę opisano dla wielu genów drożdży, opracowana przez nas metoda może stanowić cenne narzędzie dla innych badaczy chcących opracować mutacje warunkowe innych, interesujących ich genów *C. elegans*.

### Globalna ocena ilościowa stabilności mikroRNA oraz identyfikacja cząsteczek docelowych dla XRN2

Cząsteczki miRNA regulują ekspresję genów głównie działając na mRNA w celu zahamowania inicjacji translacji i/lub rozkładając je. W procesie rozkładu miRNA stanowią składnik nakierowujący dla kompleksu wyciszającego indukowanego przez RNA (miRISC). Choć wiadomo było, że XRN2 rozkłada miRNA (piśmiennictwo 3), nie znana była swoistość wyboru

cząsteczek docelowych. Używając warunkowego mutantu *xrn-2*, przeprowadziliśmy globalną ocenę ilościową czasów półtrwania miRNA u larw *C. elegans* i stwierdziliśmy, że po ich dojrzeniu XRN2 reguluje swoistą podgrupę cząsteczek miRNA. Co określa tę swoistość, i w jaki sposób mediowana przez XRN2 regulacja miRNA wpływa na rozwój zwierzęcia, pozostawało do wyjaśnienia. To pionierskie badanie stabilności miRNA na skalę całego genomu, w całym organizmie wielokomórkowym, ujawniło, że nici pasażerskie miRNA (miR\*s) są znacząco mniej stabilne niż nici wiodące (miRs). Zdaje się to potwierdzać przekonanie, że te pierwsze są głównie produktami ubocznymi biogenezy miRNA, a występującymi w mniejszej ilości cząsteczkami funkcjonalnymi.

#### 4.4.3.

**Miki TS**, Richter H, Rügger S, Großhans H (2014) PAXT-1 promotes XRN2 activity by stabilizing it through a conserved domain. *Mol Cell* 53: 351-360.

#### Identyfikacja PAXT-1, nowej podjednostki kompleksu XRN2

XRN2 rozkłada jednoniciowe RNA z 5' monofosforanem, nie wykazując *in vitro* swoistości wobec sekwencji, podczas gdy wykazuje swoistość wobec miRNA (Miki et al., 2014, *Nucleic Acids Res*) oraz innych typów RNA (Miki et al., 2013, *Biochem Soc Trans*) *in vivo*, co sugeruje, że XRN2 jest rekrutowana przez swoiste cząsteczki RNA za pośrednictwem partnerów wiązania. Przeprowadziliśmy immunoprecypitację XRN2 i zidentyfikowaliśmy nowe białko PAXT-1 (Partner of Xrn-Two) będące partnerem wiążącym XRN2 u *C. elegans*. Badania biochemiczne i genetyczne wskazały, że PAXT-1 wiąże się bezpośrednio z XRN2 i stabilizuje ją. Powstanie takiego kompleksu jest konieczne dla prawidłowego rozwoju i przeżycia zwierząt w podwyższonej temperaturze.

W badaniu tym opracowaliśmy mutant z delecją *paxt-1* poprzez edycję genomu mediowaną przez TALEN (Transcription activator-like effector nuclease). Stanowiło to jedno z pionierskich zastosowań nowej technologii knock-out'u genowego u *C. elegans* przed pojawieniem się metody edycji genomu CRISPR/Cas9 (piśmiennictwo 4).

#### Identyfikacja ewolucyjnie konserwatywnej domeny wiążącej XRN2 oraz nowych partnerów wiążących XRN2

Wykazaliśmy, że PAXT-1 wiąże XRN2 wykorzystując w tym celu wcześniej nie scharakteryzowaną domenę DUF3469 (domain of unknown function 3469). Ponieważ ludzkie białka posiadające tę domenę także wiążą XRN2, nazwaliśmy tę ewolucyjnie konserwatywną domenę "XRN-Two-binding domain" (XTBD: <http://pfam.xfam.org/family/xtbd>). Badanie strukturalne przeprowadzone przez nasz zespół potwierdziło, że XTBD jest uniwersalną cząsteczką wiążącą XRN2 (piśmiennictwo 5). W oparciu o to odkrycie zidentyfikowaliśmy nowe partnerskie cząsteczki wiążące XRN2 w różnych organizmach eukariotycznych. Wiele z nich ma domeny wiążące RNA, co implikuje ich rolę w rekrutacji XRN2 do swoistych docelowych cząsteczek RNA. Spodziewaliśmy się, że te nowe odkrycia będą przyczynkiem do dalszych badań dotyczących tego, w jaki sposób konserwatywna RNaza XRN2 odgrywa różnorodne role poprzez tworzenie kompleksów z białkami zawierającymi XTBD u innych gatunków. I

rzeczywiście, inne grupy badaczy (piśmiennictwo 6-10) opisały niedawno rolę ludzkich kompleksów XRN2-XTBD-białko, co wskazuje na nasz wkład w odkrycia dokonywane w tej dziedzinie.

#### 4.4.4.

**Miki TS**, Carl SH, Stadler MB, Großhans H (2016) XRN2 autoregulation and control of polycistronic gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 12: e1006313

#### Identyfikacja sieci samoregulacyjnej XRN2

*C. elegans* pozbawiony *paxt-1* (*paxt-1(0)*) nie jest w stanie przeżyć podwyższonej temperatury, ze względu na destabilizację XRN2 (Miki *et al.*, 2014, *Mol Cell*). Używając *paxt-1(0)* przeprowadziliśmy badanie przesiewowe losowej mutagenezy i zidentyfikowaliśmy allel inaktywujący w genie *bpnt-1*, który ratował zwierzęta *paxt-1(0)* od śmierci. Jako że było wiadomo, że BPNT1 jest ujemnym regulatorem inhibitora XRN2 3'(2')-fosfoadenozyno-5'-forsforanu (PAP) (piśmiennictwo 11), wynik ten był sprzeczny z intuicją, która podpowiadała, że inaktywujący allel w *bpnt-1* będzie raczej potęgował, a nie hamował letalny fenotyp *paxt-1(0)*. Nasze analizy genetyczne i biochemiczne doprowadziły do identyfikacji obwodu samoregulacyjnego i rozwiązania tej zagadki: XRN2 ujemnie reguluje swoją własną ekspresję za pośrednictwem dwóch niezależnych od siebie mechanizmów: poprzez destabilizację swojego własnego transkryptu, oraz poprzez represję kryptycznego promotora. Ze względu na tę samoregulację, inhibicja XRN2 przez mutację *bpnt-1* powoduje zwiększoną syntezę mRNA i białka XRN2, która zwiększa aktywność białek XRN2 jako grupy. Praca ta wskazuje na wysoką wartość bezstronnego skriningu genetycznego w odniesieniu do nieprzewidywalnych spostrzeżeń.

#### Określenie nowej roli XRN2 w regulacji mRNA

Po stwierdzeniu, że XRN2 reguluje swój własny transkrypt, przystąpiliśmy do poszukiwania innych cząsteczek docelowych. Przeprowadziliśmy analizę ekspresji mRNA w całym genomie i zidentyfikowaliśmy swoistą podgrupę genów regulowanych przez XRN2, w których funkcjonują mechanizmy analogiczne do samoregulacji XRN2. Geny te znaleziono w policistronowych jednostkach ulegających transkrypcji z zastosowaniem pojedynczych promotorów, określanych jako operony (piśmiennictwo 12). Zidentyfikowaliśmy intercistronowe regiony łączące geny w operonach jako odpowiedzialne za wyznaczenie swoistości wobec XRN2. Odkrycie to spowodowało dodanie mRNA do repertuaru różnorodnych cząsteczek docelowych XRN2 i podkreśliło wielofunkcyjność tej RNazy.

#### 4.4.5.

**Miki TS**, Carl SH, Großhans H (2017) Two distinct transcription termination modes dictated by promoters. *Genes Dev* 31: 1870-1879

## Poszukiwanie związku pomiędzy promotorami a trybami terminacji transkrypcji

Transkrypcja genu obejmuje trzy główne etapy: inicjację (rozpoczynanie), elongację (wydłużanie) i terminację (kończenie). Terminacja transkrypcji wyznacza koniec jednostki transkrypcyjnej przez odłączenie kompleksu wydłużającego (transcription elongation complex - TEC), co powoduje uwolnienie polimeraz RNA oraz pierwotnego transkryptu od matrycy DNA (piśmiennictwo 13). Nieprawidłowa terminacja prowadzi do powstania zbędnych, a nawet potencjalnie szkodliwych transkryptów międzygenowych. Może także zakłócić ekspresję kolejnych genów, gdy nie odłączony TEC zmiecie kompleksy inicjujące transkrypcję z ich promotorów lub zderzy się z polimerazami RNA, dokonującymi transkrypcji nici przeciwstawnej. XRN2 promuje terminację transkrypcji Pol II, dokonując rozkładu fragmentów powstałych w wyniku rozszczepienia końca 3' transkryptu pierwotnego (piśmiennictwo 1, 2). Jednakże, nie było jasnym, w jakim stopniu mechanizm ten jest wykorzystywany w nienaruszonych organizmach wielokomórkowych. Zbadaliśmy wpływ dezaktywacji XRN2 na globalną terminację transkrypcji używając w tym celu sekwencjonowania RNA oraz immunoprecypitacji chromatyny Pol II z sekwencjonowaniem (ChIP-seq) u *C. elegans*. Dezaktywacja XRN2 powodowała przedłużenie transkrypcji Pol II o dziesiątki kilobaz, oraz zakłócała ekspresję dalszych genów, co wskazuje na ważną rolę spełnianą przez XRN2 w prawidłowej ekspresji genów.

Podejście zintegrowane, obejmujące analizy genetyczne, biochemiczne, obrazowe i obliczeniowe, wskazało, że określona podgrupa genów używa XRN2 do terminacji transkrypcji, podczas gdy inne geny polegają w tym zakresie na sekwencji elementów w dalszych regionach międzygenowych. Nieoczekiwanie stwierdziliśmy, że to promotory, a nie końce 3' genów, określają tryb terminacji. Sugeruje to, że funkcjonują dwa mechanizmy terminacji dla różnych konfiguracji maszynery powstałych przy różnych promotorach. Odkrycia te doprowadziły do postawienia nowych pytań dotyczących badanej dziedziny: jak działa terminacja transkrypcji niezależna od XRN2, w jaki sposób promotory determinują tryb terminacji, dlaczego natura doprowadziła do ewolucji wielokrotnych mechanizmów terminacji i w jaki sposób zostały one optymalnie przydzielone różnym genom? Znaczenie i oddziaływanie tych badań zostały podkreślone w Nature Reviews Genetics (piśmiennictwo 14) oraz na platformie badawczej F1000 (piśmiennictwo 15).

## **Piśmiennictwo**

1. Kim M, Krogan NJ, Vasiljeva L, Rando OJ, Nedeja E, Greenblatt JF, Buratowski S (2004) The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432: 517-522
2. West S, Gromak N, Proudfoot NJ (2004) Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* 432: 522-525
3. Chatterjee S, Grosshans H (2009) Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 461: 546-549

4. Sugi T (2016) Genome Editing in *C. elegans* and Other Nematode Species. ***Int J Mol Sci.*** 17: 295
5. Richter H, Katic I, Gut H, Großhans H (2016) Structural basis and function of XRN2 binding by XTB domains. ***Nat Struct Mol Biol.*** 23: 164-171
6. Sato S, Ishikawa H, Yoshikawa H, Izumikawa K, Simpson RJ, Takahashi N (2015) Collaborator of alternative reading frame protein (CARF) regulates early processing of pre-ribosomal RNA by retaining XRN2 (5'-3' exoribonuclease) in the nucleoplasm. ***Nucleic Acids Res.*** 43: 10397-10410
7. Rother S, Bartels M, Schweda AT, Resch K, Pallua N, Nourbakhsh M (2016) NF-kappaB-repressing factor phosphorylation regulates transcription elongation via its interactions with 5'-->3' exoribonuclease 2 and negative elongation factor. ***FASEB J.*** 30: 174-185
8. Coccia M, Rossi A, Riccio A, Trotta E, Santoro MG (2017) Human NF-kappaB repressing factor acts as a stress-regulated switch for ribosomal RNA processing and nucleolar homeostasis surveillance. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 114:1045-1050
9. Memet I, Doebele C, Sloan KE, Bohnsack MT (2017) The G-patch protein NF-kappaB-repressing factor mediates the recruitment of the exonuclease XRN2 and activation of the RNA helicase DHX15 in human ribosome biogenesis. ***Nucleic Acids Res.*** 45:5359-5374
10. Wadhwa R, Kalra RS, Kaul SC (2017) CARF is a multi-module regulator of cell proliferation and a molecular bridge between cellular senescence and carcinogenesis. ***Mech Ageing Dev.*** 166: 64-68
11. Dichtl B, Stevens A, Tollervey D (1997) Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. ***EMBO J.*** 16: 7184-7195
12. Spieth J, Brooke G, Kuersten S, Lea K, Blumenthal T (1993) Operons in *C. elegans*: polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions. ***Cell*** 73: 521-532
13. Proudfoot NJ (2016) Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut. ***Science*** 352: aad9926
14. Otto D (2017) Transcription: Promoters dictate termination mode. ***Nat Rev Genet.*** 18: 704
15. Reines D: F1000Prime Recommendation of [Miki TS et al., *Genes Dev* 2017 31(18):1870-1879]. In ***F1000Prime***, 18 Dec 2017; 10.3410/f.731980027.793540272

## 5. Inne osiągnięcia naukowe

Streszczam tu trzy publikacje, w których odgrywałem wiodącą rolę.

### 5.1.

**Miki T**, Yoneda Y (2004) Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J Biol Chem* 279: 47473-47479

#### Identyfikacja dwóch jądrowych szlaków eksportowych dla wiążącego RNA białka Staufen2

W okresie studiów doktoranckich badałem posttranskrypcyjną regulację RNA, skupiając się na wiążącym RNA białku Staufen2. Opisywano rolę białka Staufen2 w lokalizacji mRNA w dendrytach komórek nerwowych (piśmiennictwo 1), jednak jego funkcja w komórkach innych typów pozostawała nieznana. Dzięki obserwacji mikroskopowej stwierdziliśmy, że białko Staufen2 kursuje pomiędzy jądrem a cytoplazmą zarówno w komórkach nerwowych, jak i nie neuronalnych liniach ludzkich komórek. Co interesujące, odkryliśmy, że białko Staufen2 korzysta z dwóch różnych szlaków eksportu jądrowego. Pierwszy z nich poprzez sygnał eksportu jądrowego rozpoznawany przez Exportin1/Crm1 i drugi, zależny od domeny wiążącej dwuniciowe RNA w białku Staufen2. Odkrycie to implikowało możliwość, że białko Staufen2, o którym sądzono, że działa jedynie w cytoplazmie, rozpoznaje docelowe cząsteczki mRNA w jądrze i jest eksportowane do cytoplazmy, gdzie lokalizuje i reguluje je.

### 5.2.

**Miki T**, Kamikawa Y, Kurono S, Kaneko Y, Katahira J, Yoneda Y (2011) Cell type-dependent gene regulation by Staufen2 in conjunction with Upf1. *BMC Mol Biol* 12: 48

#### Odkrycie nowej roli kompleksu Staufen2-Upf1 w regulacji mRNA

Aby uzyskać wgląd w proces regulacji mRNA przez białko Staufen2 w komórkach innych niż nerwowe, przeprowadziliśmy immunoprecypitację białka Staufen2 z komórek nerki ludzkiego płodu i zidentyfikowaliśmy helikazę RNA Upf1 pełniącą rolę bezpośredniego partnera wiązania. Zbadaliśmy funkcje kompleksów Staufen2-Upf1 w komórkach różnych typów i stwierdziliśmy, że białko Staufen2, gdy jest związane z końcem 3' UTR mRNA, potęguje translację rekrutując Upf1 w sposób zależny od typu komórki. Badanie to ujawniło nieoczekiwaną rolę czynnika rozkładu RNA Upf1 (piśmiennictwo 2) w dodatkowej regulacji translacji. Zależna od typu komórki regulacja mRNA przez kompleksy Staufen2-Upf1 wskazuje na modulację ich funkcji pod wpływem innych czynników, które oczekują na identyfikację.

### 5.3.

**Miki T**, Okawa K, Sekimoto T, Yoneda Y, Watanabe S, Ishizaki T, Narumiya S (2009) mDia2 Shuttles between the Nucleus and the Cytoplasm through the Importin- $\alpha/\beta$ - and CRM1-mediated Nuclear Transport Mechanism. *J Biol Chem* 284: 5753-5762

## Odkrycie nieoczekiwanej, jądrowej lokalizacji białka polimeryzującego aktyne mDia2

Dynamiczna reorganizacja cytoszkieletu aktynowego leży u podstaw zasadniczych procesów komórkowych, takich jak podział komórki, migracja i różnicowanie. Białko mDia2 polimeryzuje monomery w filenty, a brak tego białka prowadzi do błędów cytokinezy w komórkach niektórych typów. Dzięki obserwacji żywej komórki stwierdziliśmy, że - nieoczekiwanie - białko mDia2 może wnikać do jądra komórkowego. Odkryliśmy, że przemieszczanie się białka mDia2 pomiędzy cytoplazmą a jądrem jest mediowane przez kompleks Importin-  $\alpha/\beta$  w zakresie importu do jądra, oraz przez CRM1 w zakresie eksportu z jądra. Badanie to umożliwiło przewidzenie nowej roli białka mDia2 w tworzeniu jądrowych filamentów aktyny. W połączeniu z wynikami wcześniejszych badań, które implikowały obecność filamentów aktyny w jądrze komórkowym (piśmiennictwo 3), odkrycie to stało się punktem wyjścia do badań nad powstawaniem aktyny w jądrze komórkowym. Powstawanie filamentów aktyny w jądrze pod wpływem białka mDia2 zostało później potwierdzone przez inną grupę badaczy, których praca została opublikowana w piśmie *Science* (piśmiennictwo 4).

## Piśmiennictwo

1. Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. **J Cell Sci.** 115: 3285-3295
2. Imamachi N, Tani H, Akimitsu N (2012) Up-frameshift protein 1 (UPF1): multitasking entertainer in RNA decay. **Drug Discov Ther.** 6: 55-61
3. Schoenenberger CA, Buchmeier S, Boerries M, Sütterlin R, Aebi U, Jockusch BM (2005) Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm. **J Struct Biol.** 152: 157-168
4. Baarlink C, Wang H, Grosse R (2013) Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. **Science** 340: 864-867

Takashi Miki

Takashi Miki, Ph. D.