

Podsumowanie osiągnięć zawodowych

Dr Rajani Kanth Gudipati
Adiunkt, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Dr Rajani Kanth Gudipati
Centrum Zaawansowanych Technologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza Uniwersytetu Poznańskiego 10,
61-614 Poznań.

Poznań, 18.11.2025

1. Imię

Rajani Kanth Gudipati

2. Dyplomy, stopnie naukowe uzyskane w określonych dziedzinach nauk ścisłych lub humanistycznych, w tym nazwa instytucji, która nadała stopień naukowy, rok uzyskania stopnia naukowego, tytuł pracy doktorskiej.

2009 – stopień doktora nauk biologicznych, Uniwersytet Paryski XI, Paryż, Francja.

Tytuł pracy: “Transcription termination and RNA degradation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*”.

W trakcie studiów doktoranckich badałem, w jaki sposób fosforylacja domeny C-terminalnej (CTD) polimerazy RNA II reguluje zakończenie transkrypcji, wykorzystując jako modelowy system drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Wykazałem, że stan fosforylacji reszt serynowych w powtórzeniach heptadowych CTD determinuje rekrutację różnych czynników zakończenia. W szczególności fosforylacja seryny 2 sprzyja rekrutacji czynników rozszczepiania i poliadenylacji, promując kanoniczne zakończenie zależne od poli(A), podczas gdy fosforylacja seryny 5 sprzyja powiązaniu ze szlakiem Nrd1-Nab3-Sen1 (NNS), który pośredniczy w zakończeniu niekodujących RNA. Mutacje zmieniające fosforylację CTD zaburzają równowagę między tymi mechanizmami zakończenia, prowadząc do powszechnych defektów w ekspresji genów. Moje badania wykazały, że wzorce fosforylacji CTD działają jako kod molekularny kierujący wyborem ścieżki terminacji. Ten mechanizm regulacyjny zapewnia prawidłowe zakończenie i przetwarzanie transkryptów kodujących i niekodujących. Ogólnie rzecz biorąc, nasze prace dostarczają fundamentalnych informacji na temat tego, w jaki sposób modyfikacje CTD koordynują transkrypcję polimerazy RNA II z dojrzewaniem RNA i regulacją genów w całym genomie.

W ramach drugiego projektu badałem rolę egzosomów jądrowych w regulacji poziomów prekursorów RNA. Wykorzystując sekwencjonowanie RNA całego genomu, odkryłem, że egzosomy w znacznym stopniu degradowują dużą część prekursorów RNA nawet w komórkach typu dzikiego. Odkryłem, że wiele transkryptów, w tym pre-mRNA i niekodujące RNA, ulega znacznemu obrotowi jądrowemu, co wskazuje, że degradacja jest normalnym i powszechnym etapem ekspresji genów. Moje badania wykazały, że

egzom szczególnie atakuje ukryte niestabilne transkrypty (CUT) i inne niekodujące RNA, ale również prekursorzy mRNA kodujących białka ulegają znacznej degradacji. Odkrycia te pokazują, że egzom zapewnia gromadzenie się wyłącznie prawidłowo przetworzonych i dojrzałych transkryptów, utrzymując jakość RNA i zapobiegając nieprawidłowemu gromadzeniu się RNA. Co ważne, wykazałem, że degradacja RNA nie jest tylko mechanizmem kontrolnym jakości wadliwych RNA, ale integralną częścią normalnego metabolizmu RNA. Ogólnie rzecz biorąc, moje badania zmieniły rozumienie homeostazy RNA, wykazując, że rozległa degradacja prekursorów jest powszechną i regulowaną cechą ekspresji genów w komórkach typu dzikiego.

2005 – Magister nauk stosowanych (biotechnologia), University of Western Sydney, Sydney, Australia.

Tytuł pracy magisterskiej: “Development of a reporter system to be used for xenotransplantation”

Narządy do przeszczepów są niezwykle rzadkie, a biorcy często czekają na nie kilka lat. Jednym z możliwych sposobów obejścia tego problemu jest pobieranie narządów od świń do przeszczepów u ludzi. Jednak świnie są zarażone dużą liczbą wirusów, co stanowi poważne wyzwanie dla tego podejścia. Moje badania koncentrowały się na opracowaniu systemu reporterowego ułatwiającego badanie świń pod kątem infekcji wirusowych, zapewniającego narzędzie zwiększające bezpieczeństwo i wykonalność ksenotransplantacji.

3. Informacje o zatrudnieniu w instytutach badawczych lub na wydziałach/katedrach lub w szkołach artystycznych.

Sierpień 2022 r. – do chwili obecnej: adiunkt, Centrum Technologii Zaawansowanych, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Marzec 2014 – luty 2022: stypendysta podoktorancki w laboratorium dr Helge Grosshansa, Instytut Friedricha Mieschera, Bazylea, Szwajcaria.

Luty 2012 – luty 2014: pracownik naukowy w laboratorium prof. Kevina Struhla, Harvard Medical School, Boston, USA.

Luty 2010 – styczeń 2012: stypendysta podoktorancki w laboratorium dr. Alaina Jacquiera, Instytut Pasteura, Paryż, Francja.

4. Opis osiągnięć, określonych w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy.*a) Tytuł osiągnięcia**Regulacja funkcji Argonaute i specyficzności substratu w szlakach małych RNA*

Osiągnięcie naukowe, które stanowi podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, zatytułowane **„Regulacja funkcji Argonaute i specyficzności substratu w szlakach małych RNA przez proteazy”**, składa się z czterech oryginalnych artykułów naukowych. Wszystkie te artykuły są pracami wspólnymi. Jestem autorem korespondencyjnym jednego z tych artykułów, pierwszym i współautorem korespondencyjnym jednego z nich, pierwszym autorem jednego z nich oraz współautorem drugiego jednego z nich. Artykuły te opisują po raz pierwszy funkcję proteazy DPF-3 u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Wykazałem, że aktywność katalityczna DPF-3 jest niezbędna do przetwarzania określonych białek wiążących RNA, zapewniając w ten sposób wyciszenie transpozonów i elementów powtarzalnych – procesów kluczowych dla utrzymania integralności genomu i płodności zwierząt. Ponadto zidentyfikowaliśmy miejsce cięcia DPF-3 za pomocą wysokoprzepustowej spektrometrii masowej i wyjaśniliśmy jego rolę w regulacji ekspresji genów. Artykuły stanowiące to osiągnięcie naukowe zostały opublikowane w latach 2021–2025, a ich łączny współczynnik wpływu wynosi **40,7**. Prace składające się na powyższe osiągnięcie to:

b. Publikacje zawarte we wniosku habilitacyjnym.

1. Protease-mediated processing of Argonaute proteins controls small RNA association.

Gudipati RK*, Braun K, Gypas F, Hess D, Schreier J, Carl S, Ketting RF and Großhans H*.

*Corresponding author

Mol. Cell, 2021 Jun 3;81(11):2388-2402.

Impact Factor: 14.5

MNiSW points: 200

2. Deep quantification of substrate turnover defines protease subsite cooperativity.

Gudipati RK, Gaidatzis D, Seebacher J, Muehlhaeuser S, Kempf G, Cavadini S, Hess

D, Sonesson C, and Großhans H.

Molecular Systems Biology, 2024 Dec;20(12):1303-1328.

Impact Factor: 8.5

MNiSW points: 200

3. Dipeptidyl peptidase DPF-3 is a gatekeeper of microRNA Argonaute compensation in animals.

Louis-Mathieu H, Pierre-Marc, **Gudipati RK**, Michaud P, Houle F, Young D, Desbiens C, Ladouceur S, Dufour A, Großhans H, Simard MJ.

Nature Communications, 2025 Mar 20;16(1):2738.

Impact Factor: 14.7

MNiSW points: 200

4. The *Caenorhabditis elegans* DPF-3 and human DPP4 has tripeptidyl peptidase activity.

Aditya Trivedi and Rajani Kanth Gudipati.

FEBS Letters, Accepted.

Impact Factor: 3

MNiSW points: 100

- c. *Opis celów naukowych i uzyskanych wyników, które doprowadziły do powstania wyżej wymienionych publikacji*

Wprowadzenie:

Moje badania dotyczą powiązań między małymi niekodującymi RNA regulacyjnymi, białkami wiążącymi RNA i proteazami. Na początku przedstawię te różne zagadnienia.

Małe RNA i białka Argonaute:

Małe RNA to krótkie niekodujące RNA, które odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów u eukariontów. Częsteczki te, w tym mikroRNA (miRNA), małe interferujące RNA (siRNA) i RNA oddziałujące z Piwi (piRNA), pośredniczą w różnych procesach biologicznych, takich jak rozwój, stabilność genomu oraz obrona przed wirusami i elementami transpozycyjnymi (Bartel 2004; Ghildiyal i Zamore 2009). Efekty wyciszania genów przez małe RNA są realizowane poprzez ich powiązanie z ewolucyjnie zachowanymi białkami wiążącymi RNA, białkami Argonaute (AGO). Dodatkowo białka AGO wiążą się z białkami GW182, tworząc w ten sposób skuteczny kompleks

rybonukleoproteinowy znany jako kompleksy wyciszające indukowane przez RNA (RISC). RISC są kierowane do komplementarnych RNA docelowych przez związane małe RNA. Białka AGO z RISC indukują wyciszanie genów po transkrypcji poprzez mechanizmy takie jak rozszczepianie mRNA, represja translacyjna i destabilizacja mRNA (Meister 2013).

Nicień *Caenorhabditis elegans* stanowi potężny model do badania szlaków małych RNA i biologii białek AGO ze względu na dobrze opisany genom, podatność na manipulacje genetyczne oraz zachowany mechanizm wyciszania RNA. Co ciekawe, pierwsze mikroRNA odkryto właśnie w *C. elegans* (Lee, Feinbaum i Ambros 1993; Wightman, Ha i Ruvkun 1993) za co w 2024 r. prof. Ruvkun i prof. Ambros otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny. W porównaniu z innymi organizmami *C. elegans* posiada dużą i zróżnicowaną rodzinę białek AGO, składającą się z około 27 członków zorganizowanych w odrębne kłady o wyspecjalizowanych funkcjach (Yigit et al. 2006). Rozwój ten odzwierciedla złożony krajobraz małych RNA u robaków, w tym wiele klas endogennych siRNA (takich jak RNA 22G, RNA 26G), miRNA i piRNA, które wspólnie koordynują regulację ekspresji genów i utrzymują integralność genomu.

Białka AGO *C. elegans* można ogólnie podzielić na trzy kategorie funkcjonalne: kład AGO, kład Piwi i kład WAGO specyficzny dla robaków. Kład AGO zawiera kanoniczne białka AGO, takie jak ALG-1 i ALG-2, które głównie wiążą miRNA i pośredniczą w represji translacyjnej lub rozkładzie mRNA (Grishok et al. 2001). PRG-1 jest głównym białkiem PiWi, które wiąże się z 21U-RNA (piRNA), odgrywając kluczową rolę w wyciszaniu transpozonów i utrzymaniu linii germinacyjnej (Batista et al. 2008). Kład WAGO stanowi unikalną innowację ewolucyjną u nicieni. Argonauty WAGO oddziałują z drugorzędowymi siRNA znanymi jako 22G-RNA, które są wytwarzane przez polimerazy RNA zależne od RNA (RdRP) i wzmacniają sygnały wyciszające (Gu et al. 2009; Yigit et al. 2006). Ten system wzmacniania wzmacnia wyciszanie genów przeciwko elementom powtarzalnym, takim jak transpozony i elementy transpozycyjne, obce kwasy nukleinowe i endogenne transkrypty. WAGO funkcjonują głównie w linii germinacyjnej i tkankach somatycznych, aby utrzymać międzypokoleniowe wyciszanie epigenetyczne i stabilność genomu (Buckley et al. 2012). Podczas gdy WAGO Argonautes załadowane RNA 22G wyciszają transpozony, CSR-1 Argonaute załadowane RNA 22G zezwalają na ekspresję genów linii germinacyjnej (Claycomb et al.

2009; Wedeles, Wu i Claycomb 2013) . Dlatego też niezwykle ważne jest, aby różne białka AGO były załadowane prawidłowym zestawem RNA 22G, ponieważ nieprawidłowe załadowanie może mieć katastrofalne konsekwencje dla organizmu.

Proteazy:

Proteazy, znane również jako peptydazy lub proteazy, to zróżnicowana grupa enzymów, które katalizują hydrolizę wiązań peptydowych w białkach i peptydach. Ta podstawowa aktywność biochemiczna leży u podstaw wielu procesów fizjologicznych i patologicznych, w tym trawienia pokarmu, dojrzewania białek, transdukcji sygnałów, przebiegu cyklu komórkowego, apoptozy i odpowiedzi immunologicznej (Lopez-Otin i Bond 2008; Rawlings i Barrett 1993) . Proteazy dzieli się na kilka kategorii w oparciu o ich mechanizmy katalityczne, w tym proteazy serynowe, cysteinowe, asparaginowe, metalowe i treoninowe. Każda klasa wykorzystuje odrębne reszty aktywne i kofaktory do rozszczepiania wiązań peptydowych, umożliwiając precyzyjną regulację specyficzności substratowej i aktywności (Turk 2006) . Rozszczepianie proteolityczne przeprowadzane przez proteazy może być ograniczone, na przykład przetwarzanie białek prekursorowych do ich aktywnych form, lub degradacyjne, takie jak całkowity rozkład uszkodzonych lub nieprawidłowo sfałdowanych białek (Puente et al. 2003) . Ta regulowana proteoliza jest niezbędna dla homeostazy komórkowej i adaptacji do bodźców środowiskowych. Zaburzenia regulacji aktywności proteaz mają wpływ na wiele chorób, w tym nowotwory, neurodegenerację, stany zapalne i choroby zakaźne, co podkreśla ich znaczenie jako celów terapeutycznych (Apoorva et al. 2024) .

Wśród proteaz rodzina proteaz serynowych jest jedną z największych i najlepiej scharakteryzowanych grup. Wykorzystują one resztę serynową w swoim miejscu aktywnym do przeprowadzania nukleofilowego ataku na wiązanie peptydowe. Rodzina ta obejmuje wiele dobrze znanych enzymów, takich jak tripsyna, chymotrypsyna i subtilizyna, a także wyspecjalizowane proteazy biorące udział w krzepnięciu krwi i obronie immunologicznej (Rawlings et al. 2018) . Dipeptydylopeptydazy (DPP) stanowią unikalną podgrupę proteaz serynowych, charakteryzującą się zdolnością do odcinania dipeptydów od N-końca polipeptydów. DPP odgrywają ważną rolę w regulacji hormonów peptydowych, funkcji odpornościowej i sygnalizacji komórkowej (Klemann et al. 2016) . Wśród DPP, rodzina dipeptydylopeptydaz IV (DPPIV) cieszy się dużym zainteresowaniem ze względu na swoje różnorodne funkcje fizjologiczne i wpływ na

choroby człowieka. Rodzina DPPIV obejmuje zestaw proteaz serynowych, które specyficznie usuwają dipeptydy z N-końca polipeptydów, gdzie przedostatnią resztą jest prolina lub alanina (Aertgeerts et al. 2004). Enzymy te są zazwyczaj białkami transbłonowymi typu II, ale mogą również występować w postaci rozpuszczalnej, powstałej w wyniku proteolitycznego odcinania. Prototypowy członek rodziny, DPPIV (znany również jako CD26), jest szeroko wyrażany w tkankach i pełni wielofunkcyjne role w metabolizmie, regulacji immunologicznej i adhezji komórkowej (Klemann et al. 2016; Yu et al. 2010). Ludzki DPPIV, dobrze zbadany członek tej rodziny, ma kluczowe znaczenie dla regulacji hormonów inkretynowych, takich jak GLP-1 i GIP, które modulują wydzielanie insuliny i homeostazę glukozy. To sprawia, że DPPIV jest ważnym celem terapeutycznym w cukrzycy typu 2, co prowadzi do opracowania inhibitorów DPPIV jako leków przeciwcukrzycowych (Deacon 2019; Mentlein 1999). Oprócz DPPIV, rodzina ta obejmuje kilka blisko spokrewnionych proteaz, takich jak DPP8, DPP9 i białko aktywujące fibroblasty (FAP), z których każda wykazuje odmienne rozmieszczenie w tkankach i funkcje biologiczne. Rodzina DPPIV *C. elegans* składa się z siedmiu członków: *dpp-1* do *dpp-6*, które są potencjalnie aktywne katalitycznie, oraz *dpp-7*, które nie posiada triady katalitycznej, co sugeruje, że jest białkiem нефункциональным. Podczas charakteryzowania kompleksów białkowych złożonych z białek AGO ALG-1 i ALG-2 zidentyfikowałem nową interakcję między ALG-1 a DPP-3, ortologiem DPP8/9 proteazy ssaków u *C. elegans*. Odkrycie to zapoczątkowało moje badania nad skomplikowaną siecią regulacyjną na styku białek wiążących RNA i proteaz.

Kluczowe pytanie: W dziedzinie małych regulacyjnych niekodujących RNA i białek Argonaute centralnym nierozwiązanym pytaniem pozostaje: *co decyduje o prawidłowym sortowaniu RNA 22G do odpowiednich białek AGO?* Jak wyjaśniono wcześniej, nieprawidłowe ładowanie RNA 22G może mieć poważne konsekwencje, w tym zniesienie wyciszenia elementów transpozycyjnych i transpozonów, a także nieprawidłowe wyciszenie genów specyficznych dla linii germinacyjnej, co ostatecznie zagraża integralności genomu i płodności.

Mój wkład: Moje badania ujawniły nieznana wcześniej rolę proteazy DPP-3 z rodziny DPPIV w kierowaniu prawidłowym sortowaniem RNA 22G do odpowiednich białek AGO w *C. elegans*. To przełomowe odkrycie doprowadziło do opublikowania trzech

artykułów, które łącznie definiują nowy mechanizm regulacyjny łączący aktywność proteazy z wiernością szlaku małych RNA. Był to pierwszy przypadek opisanie funkcji którejkolwiek z proteaz z rodziny DPPIV w tym organizmie. Poniżej krótko podsumowuję kluczowe wyniki każdego z tych badań.

Wyniki:

1. DPF-3 u *C. elegans* odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów za pośrednictwem małych RNA poprzez modulowanie białek AGO (*publikacja 1*).

Białka Argonaute (AGO) są głównymi cząsteczkami efektorowymi szlaków wyciszania RNA, które obejmują mikroRNA (miRNA) i małe interferujące RNA (siRNA). Te małe RNA kierują białka AGO do komplementarnych RNA docelowych, prowadząc do wyciszania genów po transkrypcji poprzez rozszczepianie mRNA, represję translacyjną lub deadenylację. Chociaż mechanizmy biogenezy małych RNA i rozpoznawania celów zostały dokładnie zbadane, zdałem sobie sprawę, że znacznie mniej wiadomo na temat tego, w jaki sposób białka AGO są regulowane potranslacyjnie, aby zapewnić ich funkcjonalną kompetencję

W naszym badaniu z 2021 r. pt. „, odkryłem nieznany wcześniej mechanizm, dzięki któremu przetwarzanie za pośrednictwem proteazy kontroluje funkcję białek AGO i ich powiązania z małymi RNA. W *C. elegans* członkowie podrodziny WAGO białek AGO, tacy jak WAGO-1 i WAGO-3, odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu integralności genomu poprzez wyciszanie transpozonów i elementów powtarzalnych za pomocą siRNA 22G (Reed et al. 2020) . Jednak mechanizmy regulacyjne kontrolujące aktywność i specyfikę tych białek AGO nie były w pełni zrozumiałe. Moje badania rzuciły światło na to, w jaki sposób proteolityczne przetwarzanie białek AGO wpływa na ich zdolność do łączenia się z określonymi populacjami małych RNA i wykonywania funkcji wyciszania genów.

Dzięki edycji genomu za pomocą CRISPR/Cas9 wyhodowałem transgeniczne zwierzęta zawierające epitopy (FLAG) w genach *wago-1* i *wago-3*. Po immunoprecypitacji, a następnie spektrometrii masowej (IP-MS) w celu zmapowania N-końców WAGO-1 i WAGO-3, zaobserwowano, że te dwa białka są początkowo syntetyzowane jako

nieaktywne pro-białka charakteryzujące się długimi, bogatymi w prolinę przedłużeniami N-końca. Te ogony N-końca zapobiegają przedwczesnej lub nieodpowiedniej interakcji z małymi RNA. Ponadto wykazałem, że aby białka AGO stały się w pełni funkcjonalne, ich N-końce muszą zostać rozszczepione proteolitycznie. Wykazałem, że ten etap przetwarzania jest przeprowadzany przez DPF-3, ortolog *C. elegans* ssaków DPP8 i DPP9. Zaobserwowałem również, że DPF-3 jest zlokalizowany w ziarnistościach P, strukturach cytoplazmatycznych specyficznych dla linii germinalnej, związanych z metabolizmem małych RNA.

Kiedy zakłóciłem funkcję *dpf-3*, zauważyłem, że poziomy równowagowe WAGO-3 uległy znacznemu obniżeniu. Co ciekawe, działanie DPF-3 na jego substrat wydawało się raczej stabilizować go niż sprzyjać degradacji, co sugeruje, że WAGO-3 może zawierać sygnał degronowy N-końca, który jest usuwany lub zmieniany przez DPF-3. Co ciekawe, nie zaobserwowano żadnych zmian w poziomach równowagi WAGO-1 u zwierząt z mutacją powodującą utratę funkcji *dpf-3*. Zastanawiałem się wtedy, jakie są konsekwencje aktywności proteazy DPF-3 lub jej braku dla WAGO-1. Biorąc pod uwagę, że WAGO-1 wiąże się z siRNA, zastanawiałem się, czy ładowanie siRNA jest zaburzone u zwierząt z mutacją powodującą utratę funkcji *dpf-3*. Aby zbadać tę potencjalną możliwość, przeprowadziłem immunoprecypitację WAGO-1 z całkowitych lizatów robaków o różnym podłożu genetycznym, w tym z mutacjami *dpf-3*, i zsekwencjonowałem związane z nim małe RNA. Zaobserwowałem, że bez odpowiedniego przetworzenia N-końca WAGO-1 nie mógł prawidłowo połączyć się z normalnym zestawem siRNA 22G, które są skierowane przeciwko elementom powtarzalnym i transpozonom. Zamiast tego wiązał się z nieprawidłowym repertuarem 22G siRNA, z których wiele pochodziło z genów endogennych. To nieprawidłowe ładowanie zatarło różnicę między własnymi i obcymi celami RNA, prowadząc do nieprawidłowego wyciszenia genów endogennych, zakłócenia mechanizmów nadzoru genomu i ostatecznie do wyciszenia transpozonów. Konsekwencje tej deregulacji były poważne: doszło do nagromadzenia uszkodzeń DNA, a robaki wykazywały pełną penetrację bezpłodności z powodu wadliwej spermatogenezy.

W ramach tej pracy wykazałem, że potranslacyjna modyfikacja białek AGO poprzez rozszczepienie proteazy służy jako krytyczny punkt kontrolny jakości. Przetwarzając N-końcowy ogon białek WAGO, DPF-3 zapewnia, że AGO selektywnie wiążą się z

prawidłową pulą małych RNA niezbędnych do utrzymania stabilności genomu. Ta regulacja za pośrednictwem proteazy dodaje dodatkową, wcześniej niedocenianą warstwę specyficzności i wierności szlakom wyciszania RNA, pokazując, że biogeneza i aktywność białek AGO zależą nie tylko od ich poziomu ekspresji lub dostępności małych RNA, ale także od precyzyjnego dojrzewania proteolitycznego.

Uważam, że praca ta przyczyniła się do rozwoju tej dziedziny, łącząc aktywność proteazy z mechanizmem wyciszania RNA i ujawniając mechanizm, dzięki któremu tożsamość i funkcja kompleksów AGO - małych RNA są precyzyjnie dostrajane na poziomie potranslacyjnym. Wzajemne oddziaływanie między przetwarzaniem proteolitycznym apowiazaniem małych RNA zapewnia prawidłowe wyciszenie genów, chroni przed szkodliwą ekspresją elementów transpozycyjnych oraz zabezpiecza płodność i integralność genomu w linii germinacyjnej. Te spostrzeżenia wzbogacają nasze rozumienie złożoności sieci regulacji genów i wskazują potencjalne cele interwencji terapeutycznej w chorobach spowodowanych dysfunkcją szlaku małych RNA lub niestabilnością genomową.

2. Identyfikacja miejsc rozszczepiania substratu poprzez dogłębną kwantyfikację obrotu substratu (*publikacja 2*)

Proteazy osiągają specyficzność substratową poprzez rozpoznawanie reszt aminokwasowych otaczających wiązanie rozszczepialne, powszechnie opisywanych przy użyciu nomenklatury Schechtera i Bergera dla podmiejsk P4 do P4' (Schechter i Berger 1967) . Podczas gdy tradycyjne testy biochemiczne wyjaśniły preferencje poszczególnych podmiejsk dla wielu proteaz, znacznie mniej wiadomo na temat współdziałania między wieloma pozycjami substratu. Ta luka ogranicza możliwość dokładnego przewidywania substratów proteaz i projektowania proteaz o pożądanej specyficzności.

W naszym badaniu z 2024 r. (Gudipati et al. 2024) opracowałem kompleksowe ramy eksperymentalne i obliczeniowe do ilościowego określenia obrotu substratów proteazy z niespotykaną dotąd rozdzielczością, co pozwoliło nam systematycznie rozwikłać efekty współpracy podstron. Metodę tę nazwaliśmy qPISA (quantitative Protease Induced Substrate Analysis), która pozwala na dogłębną kwantyfikację obrotu substratów za pośrednictwem proteazy. Podejście qPISA łączy natywne lizaty wstępnie znakowane

znacznikami izotopowymi w celu zablokowania wolnych N-końców, a następnie dodaje rekombinowaną proteazę. W miarę jak proteaza rozszczepia substraty, powstają nowe peptydy N-końcowe, które są kwantyfikowane w czasie za pomocą spektrometrii masowej. Pojawienie się tych nowych N-końców może być wykorzystane do wnioskowania o wydajności rozszczepiania i właściwościach kinetycznych obrotu substratów. Co ważne, qPISA dostarcza dane dynamiczne, a nie końcowe, i robi to w skali proteomu puli substratów, dając znacznie bogatszy obraz preferencji substratów niż tradycyjne małe biblioteki peptydów. W tym przypadku jako źródło peptydów wejściowych wykorzystałem trawienie trypsynowe lizatu komórek HeLa (zawierającego zazwyczaj około 53 000 unikalnych peptydów). Zazwyczaj produkty są mierzone i kwantyfikowane. Skupiliśmy się jednak na obrocie substratów, który zapewnia nam lepszą kwantyfikację, co umożliwiło nam wygenerowanie kompleksowych danych kinetycznych dla tysięcy substratów (peptydów).

Zastosowałem qPISA do badania dwóch ewolucyjnie powiązanych proteaz serynowych, ludzkiej DPP4 i jej ortologu DPF-3 z *C. elegans*, i odkryłem kluczową zasadę rozpoznawania substratów, zwaną kooperatywnością podstępów. Zastosowanie qPISA do DPP4 ujawniło preferencje substratów zgodne z dobrze scharakteryzowaną aktywnością dipeptydylopeptydazy. DPP4 selektywnie rozszczepia dipeptydy z N-końca substratów, gdzie przedostatnia pozycja (P1) jest zazwyczaj proliną lub alaniną, odzwierciedlając sztywną architekturę miejsca aktywnego zoptymalizowaną pod kątem ścisłej specyficzności. Rozszczepienie następuje między P1 a P1', gdzie sekwencja peptydowa może być przedstawiona jako NH(2) -P2-P1-P1'-P2'-P3'-Pn'-COOH.

Zastosowanie qPISA do DPF-3 ujawniło kilka cech pokrywających się z hDPP4, a także pewne dodatkowe cechy. Podczas gdy hDPP4 preferuje prolinę lub alaninę na przedostatniej pozycji w równym stopniu, DPF-3 w znacznym stopniu preferuje prolinę nad alaniną. W przeciwieństwie do DPP4, który nie preferuje większych lub polarnych reszt w pozycji P1, DPF-3 łatwo tolerował treoninę, walinę i serynę, co sugeruje rozszerzony i bardziej liberalny profil rozpoznawania substratów. Ta szersza specyficzność podważa kanoniczne założenia dotyczące proteaz z rodziny DPPIV i rodzi możliwość, że interakcje kooperacyjne między sąsiednimi resztami substratu odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu selektywności substratu.

Aby zbadać tę możliwość, skonstruowaliśmy macierze punktacji specyficznej dla pozycji

(PSSM) dla każdej proteazy w oparciu o częstotliwość i wydajność rozszczepiania w każdym motywie sekwencji. Analizy te wykazały, że szybkości obrotu substratów nie można w pełni wyjaśnić preferencjami reszt w izolowanych pozycjach. Zamiast tego DPF-3 wykazywał wysoce kooperatywne zachowanie podstępów: tożsamość jednej reszty (np. P1) miała znaczący wpływ na to, jak sąsiednie reszty (np. P2 lub P1') wpływały na wydajność rozszczepiania. Na przykład obecność treoniny w pozycji P1 mogła albo sprzyjać, albo utrudniać rozszczepianie, w zależności od składu otaczającej sekwencji. Podobnie, korzystna reszta P1 mogła stać się obojętna w obecności nieoptymalnej reszty P1'. Co ważne, wykorzystaliśmy te nowe odkrycia do zaprojektowania lepszych i długotrwałych peptydów przypominających analogi GLP-1, które są stosowane w leczeniu cukrzycy typu II. Ta nowa właściwość współpracy podstępów podważa tradycyjny model addytywnych preferencji substratów i sugeruje bardziej złożony, zależny od kontekstu obraz interakcji proteaza-substrat.

Aby lepiej zrozumieć różnice w preferencjach substratowych tych dwóch proteaz, ustaliliśmy strukturę DPF-3 za pomocą kriogenicznej mikroskopii elektronowej (Cryo-EM) z rozdzielczością 2,6 Å. Wyprodukowanie rekombinowanego DPF-3 okazało się poważnym wyzwaniem. Przetestowałem kilka znaczników epitopowych, warunków solnych i zakresów pH, aby zoptymalizować jego ekspresję i oczyszczanie. Sama ekspresja DPF-3 nie stanowiła większej przeszkody. Ekspresja za pośrednictwem bakulowirusa w komórkach owadów dała duże ilości DPF-3 po wstępnej optymalizacji. Prawdziwa trudność polegała na rozpuszczalności białka. Niezależnie od zastosowanego podejścia, DPF-3 konsekwentnie agregowało się i eluowało w frakcji pustkowej.

Przełom nastąpił dzięki prostej, ale nowatorskiej zmianie: komórki owadów zazwyczaj nie są hodowane w temperaturze poniżej 20°C, ale ja hodowałem je w temperaturze 16°C. Zmiana ta całkowicie rozwiązała problem rozpuszczalności i pozwoliła mi uzyskać wystarczającą ilość rozpuszczalnego DPF-3 zarówno do określenia struktury, jak i do testów enzymatycznych *in vitro*.

Na podstawie analizy strukturalnej ustaliłem, że różnice w aktywności enzymatycznej między tymi dwoma proteazami wynikają głównie z różnic w ich podmiejskach S2 i S1'. W przeciwieństwie do DPP4, DPF-3 posiada kwasową resztę (E309) i nie ma wybrzuszonej pętli, która wprowadza resztę hydrofobową lub aromatyczną (F357 w

DPP4) do podmiejsca S2, znacząco zmieniając jego kształt i środowisko chemiczne. Reszta E309 w DPF-3 jest strukturalnie wyrównana z seryną (S209) w DPP4 i znajduje się obok motywu podwójnego glutaminianu odpowiedzialnego za pozycjonowanie końcowej grupy $\text{NH}_3^{(+)}$. Ta różnica strukturalna odpowiada silniejszemu negatywnemu wpływowi reszt kwasowych, takich jak asparaginian i glutaminian w pozycji P2 w DPF-3 w porównaniu z DPP4. Zmniejszona tolerancja na niektóre aminokwasy w podmiejscu S2 prawdopodobnie wymaga zwiększonego udziału innych podmiejszc, aby osiągnąć skuteczne rozszczepienie. Może to wyjaśniać wyraźną preferencję DPF-3 dla proliny w pozycji P1, popartą optymalnym wiązaniem w podmiejscu S1 i sztywną konformacją szkieletu substratu.

Podsumowując, nasze badanie stanowi przekonujący dowód na to, jak można połączyć proteomikę ilościową i kinetykę enzymów w celu analizy specyficzności proteaz z niespotykaną dotąd rozdzielczością. Opracowując metodę qPISA i stosując ją do DPP4 i DPF-3, ujawniliśmy współdziałanie podregionów, które reguluje sposób, w jaki proteazy wiążą się ze swoimi substratami. Praca ta na nowo definiuje nasze rozumienie selektywności proteaz, ujawnia nieoczekiwaną elastyczność w obrębie rodziny DPPIV i oferuje nowe ramy zarówno dla badań podstawowych, jak i stosowanych badań nad proteazami (projektowanie lepszych analogów GLP-1). Stanowi to znaczący postęp w tej dziedzinie i otwiera nowe możliwości badania różnorodnych ról proteaz w zdrowiu i chorobach.

3. Dipeptydylopeptydaza DPF-3 jest strażnikiem mikroRNA (*publikacja 3*)

W naszej publikacji z 2025 r. pt. „, zidentyfikowaliśmy DPF-3, konserwatywną dipeptydylopeptydazę homologiczną do DPP8/9 ssaków, jako kluczowy regulator szlaku miRNA w *C. elegans*. Wykazałem, że DPF-3 fizycznie i genetycznie oddziałuje z specyficznym dla miRNA Argonaute ALG-1, działając jako strażnik, który moduluje kompensacyjną aktywność ALG-2 w przypadku braku *alg-1*.

Białka Argonaute są od kilkadziesiąt lat przedmiotem intensywnych badań na różnych organizmach modelowych. Wiele laboratoriów podjęło próby zidentyfikowania białek oddziałujących z Argonautami. Powszechną strategią było wprowadzenie białek Argonaute oznaczonych epitopem do wybranego systemu modelowego, przygotowanie lizatów, immunoprecypitacja oznaczonego Argonaute, a następnie identyfikacja białek

oddziałujących za pomocą spektrometrii masowej. Jednak jedną z głównych wad tego podejścia jest to, że nadekspresja Argonaute oznaczonego epitopem często zaburza naturalną stechiometrię kompleksu białkowego Argonaute. Aby uniknąć tego problemu, wykorzystałem technologię edycji genomu za pomocą CRISPR/Cas9 do oznaczenia epitopowego endogennego *alg-1* na jego N-końcu i potwierdziłem, że oznaczone białko ALG-1 jest funkcjonalne. Immunoprecypitacja ALG-1, a następnie spektrometria masowa (IP-MS) doprowadziły do identyfikacji DPF-3 jako nowego partnera oddziałującego. Analiza genetyczna wykazała, że knockout *dpf-3(xe68)* hamuje defekty rozwojowe i strukturalne związane z utratą funkcji *alg-1(gk214)* u zmutowanych zwierząt, takie jak nadmierna proliferacja komórek szwów, tworzenie się szczelin skrzydełkowych i pęknięcie sromu w temperaturze 25 °C. Te fenotypowe ratunki sugerują, że DPF-3 normalnie ogranicza kompensację przez ALG-2, a jego utrata umożliwia ALG-2 skuteczne zastąpienie ALG-1.

Na poziomie molekularnym sekwencjonowanie małych RNA wykazało, że zwierzęta z mutacją *alg-1(gk214)* wykazują powszechne zaburzenia regulacji poziomów miRNA w stanie równowagi, przy czym prawie połowa wykrytych miRNA jest nieprawidłowo regulowana co najmniej dwukrotnie. Co ciekawe, zwierzęta z podwójną mutacją *dpf-3(xe68);alg-1(gk214)* wykazują dramatyczne przywrócenie profilu obfitości i represji miRNA typu dzikiego, co wskazuje na silną kompensację. RT-qPCR potwierdziło, że miRNA z rodziny *let-7* i ich docelowe geny, takie jak *daf-12*, *hbl-1*, są znormalizowane u podwójnych mutantów *dpf-3(xe68);alg-1(gk214)* w porównaniu z pojedynczymi mutantami *alg-1(gk214)*.

Dalsza analiza wykazała, że poziomy białka ALG-2 są znacznie podwyższone w przypadku braku zarówno *dpf-3*, jak i *alg-1*, czego nie zaobserwowano u samych zwierząt zmutowanych *dpf-3(xe68)*. Odpowiednio, oczyszczanie kompleksów miRISC przy użyciu sond specyficznych dla miRNA (*let-7* i *miR-77*) wykazuje zwiększone włączenie ALG-2 w *dpf-3(xe68);alg-1(gk214)* w porównaniu z samym *alg-1(gk214)*. Odkrycia te wskazują, że przy braku *dpf-3* ALG-2 nie tylko zwiększa swoją liczebność, ale także aktywnie uczestniczy w tworzeniu miRISC i wyciszaniu celów. Co ważne, chociaż DPF-3 może oddzielać peptyd N-końcowy od ALG-2 *in vitro*, nie znaleziono dowodów na to, że DPF-3 wykorzystuje tę aktywność katalityczną do regulacji ALG-2 *in vivo*. Badania koimmunoprecypitacji nie wykazały stabilnej interakcji między DPF-3 a

ALG-2, nawet w przypadku *alg-1(gk214)*. Mutacje zakłócające funkcję katalityczną DPF-3 lub modyfikujące region N-końcowy ALG-2 nie wpływały na zdolność do przywrócenia fenotypu utraty funkcji *alg-1*, co dodatkowo potwierdza nieenzymatyczny mechanizm regulacji z udziałem DPF-3. Ponadto odkryliśmy, że DPF-3 wpływa na biogenezę mRNA *alg-2*. Testy RT-qPCR mierzące dojrzałe mRNA *alg-2* wykazują ponad 1,5-krotny wzrost w podwójnym mutancie w porównaniu z typem dzikim, podczas gdy poziomy pre-mRNA są w przybliżeniu dwukrotnie wyższe, co sugeruje zwiększoną transkrypcję i/lub ulepszone przetwarzanie mRNA przy braku *dpr-3*. Zwierzęta z pojedynczym mutacją *alg-1(gk214)* również wykazują wahania w pre-mRNA, ale nie wykazują odpowiedniego wzrostu dojrzałych transkryptów. Sugeruje to, że DPF-3 hamuje proces dojrzewania transkryptów *alg-2* w warunkach niedoboru *alg-1*. Porównywalne pomiary dla genów kontrolnych nie wykazały równoważnego wzrostu poziomów dojrzałych transkryptów, co wskazuje na względną specyfikę regulacji *alg-2*.

Na podstawie tych wyników zaproponowaliśmy następujący model regulacyjny: u zwierząt typu dzikiego DPF-3 wiąże się z ALG-1 i utrzymuje zrównoważoną ekspresję *alg-2*, umożliwiając ALG-1 sterowanie większością wyciszania miRNA. Kiedy poziom ALG-1 spada (np. *alg-1(gk214)*), DPF-3 nadal hamuje ekspresję i przetwarzanie *alg-2*, uniemożliwiając skuteczną kompensację i powodując nieprawidłowe tłumienie za pośrednictwem miRNA. Usunięcie *dpr-3* łagodzi tę supresję: transkrypty *alg-2* są podwyższone, białko ALG-2 gromadzi się i tworzy aktywne kompleksy miRISC, kompensując w ten sposób utratę *alg-1* i ratując sprawność rozwojową. Praca ta znacznie poszerza naszą wiedzę na temat wzajemnego oddziaływania paralogów AGO specyficznych dla miRNA *in vivo* i wprowadza DPF-3 jako molekularnego strażnika, który moduluje szlaki kompensacyjne na poziomie biogenezy mRNA, a nie bezpośredniej proteolizy. Odkrycia sugerują, że ewolucyjna konserwacja funkcji DPF-3 może rozciągać się na systemy ssaków, w których występuje wiele białek AGO i homologów DPP8/9. Odkrywając niekatalityczną, zależną od kontekstu oś regulacyjną kontrolującą obfitość efektorów miRNA, badanie otwiera nowe możliwości eksploracji odporności regulacji genów i homeostazy potranskrypcyjnej.

4. *Caenorhabditis elegans* DPF-3 i ludzki DPP4 wykazują aktywność tripeptydylopeptydazy (publikacja 4)

Rodzina dipeptydylopeptydaz IV (DPPIV) obejmuje grupę ewolucyjnie zachowanych

proteaz serynowych, które odgrywają istotną rolę w regulacji fizjologicznej poprzez przetwarzanie bioaktywnych peptydów i białek. Ludzki DPP4, znany również jako CD26, stanowi przykład klinicznego znaczenia tej rodziny, służąc jako cel terapeutyczny w cukrzycy typu 2 poprzez regulację hormonów inkretynowych, takich jak peptyd glukagonopodobny 1 (GLP-1) i peptyd insulinotropowy zależny od glukozy (GIP). Poza homeostazą glukozy, hDPP4 bierze udział w funkcjonowaniu układu odpornościowego, reakcjach zapalnych i biologii nowotworów. Inne członki tej rodziny, w tym hDPP8, hDPP9 i białko aktywujące fibroblasty (FAP), mają podobną budowę i substraty, ale różnią się lokalizacją komórkową, mechanizmami regulacyjnymi i rolami fizjologicznymi.

W *Caenorhabditis elegans* występuje sześć katalitycznie aktywnych enzymów DPPIV, przy czym DPF-3 stanowi ortolog DPP8/9 ssaków. DPF-3 lokalizuje się w ziarnistościach P, wyspecjalizowanych kompleksach rybonukleoproteinowych, które mają kluczowe znaczenie dla rozwoju linii germinalnej i wyciszania genów za pośrednictwem małych RNA. W poprzednich pracach zidentyfikowano WAGO-1, białko Argonaute bogate w prolinę, jako substrat DPF-3, gdzie przetwarzanie N-końca jest niezbędne do prawidłowego sortowania RNA 22G i wyciszania elementów transpozycyjnych.

Tradycyjnie enzymy z rodziny DPPIV są znane z rozszczepiania dipeptydów z N-końca substratów, stąd nazwa *DiPeptidyl*. Jednak podczas mapowania N-końca immunoprecypitowanego WAGO-1 za pomocą spektrometrii masowej zaobserwowałem wiele wariantów rozszczepiania, z których niektóre są niezgodne z czystą aktywnością dipeptydylopeptydazy. Obserwacja ta sugerowała możliwość, że DPF-3 może posiadać aktywność tripeptydylopeptydazy. Alternatywnym wyjaśnieniem jest sekwencyjne rozszczepianie: DPF-3 dokonuje rozszczepienia dipeptydylowego, a następnie następuje aktywność mono-peptydazy przez nieznaną proteazę. Postanowiłem sprawdzić te dwie możliwości, przeprowadzając test *in vitro* z użyciem rekombinowanego DPF-3 i syntetycznych peptydów odpowiadających N-końcowi WAGO-1. DPF-3 typu dzikiego skutecznie usuwał tripeptydy, podczas gdy mutant DPF-3(S784A) z upośledzoną aktywnością katalityczną nie wykazywał żadnej aktywności. Równoległe eksperymenty z białkami ludzkimi wykazały, że hDPP4 może również przeprowadzać rozszczepianie tripeptydowe, podczas gdy hDPP9, mimo że wykazuje aktywność katalityczną w testach

dipeptydowych, nie wykazuje takiej aktywności. Wyniki te wskazują, że rozszerzone przetwarzanie N-końca nie jest uniwersalną właściwością wszystkich enzymów DPPIV, ale raczej specyficzną cechą niektórych członków rodziny.

Ponieważ zaobserwowana aktywność peptydazy tripeptydyłowej była całkowicie nieoczekiwana, upewniłem się co do tej dodatkowej aktywności poprzez test ortologiczny z użyciem fluorogenicznego substratu peptydowego. Substrat zawiera pojedynczą prolinę w trzeciej pozycji, po której następuje AMC, fluorofor. Uwolnienie AMC powoduje wzrost fluorescencji, który jest mierzony ilościowo. Analiza kinetyczna z użyciem fluorogenicznego substratu H-Met-Gly-Pro-AMC ujawniła wyraźne profile enzymatyczne. DPF-3 wykazał K_m wynoszący 246 μM , podczas gdy hDPP4 wykazał wyższy K_m wynoszący 462 μM , odzwierciedlając większą zdolność obrotu, ale niższe powinowactwo do substratu. DPF-3(S784A) i hDPP9 były nieaktywne w identycznych warunkach.

Aby lepiej zrozumieć, dlaczego DPF-3 i hDPP4 posiadają tę dodatkową aktywność tripeptydylopeptydazy, a hDPP9 nie, przeprowadziliśmy superpozycję strukturalną DPF-3 z hDPP4 i DPP9, która ujawniła wysoce konserwatywny rdzeń katalityczny α/β -hydrolazy i fałd β -propeller, z RMSD około 1 Å. Pomimo tej konserwatywności tylko DPF-3 i hDPP4 wykazywały silną aktywność tripeptydylopeptydazy, co sugeruje, że pętle niebędące rdzeniem lub odrębne podmiejsca wiązania substratu decydują o zdolności do przyjmowania i rozszczepiania dodatkowego aminokwasu. Te subtelne różnice strukturalne wydają się leżeć u podstaw rozbieżności w funkcji katalitycznej, podkreślając, że rozszerzone rozpoznawanie substratu jest determinowane nie tylko przez konserwatywną architekturę katalityczną.

Pod względem funkcjonalnym nasze odkrycia pokazują, że DPF-3 sekwencyjnie przycina N-końce WAGO-1 w miejscach bogatych w prolinę *in vivo*, co jest zgodne z podwójną aktywnością di- i tripeptydylopeptydazy. Chociaż zdarzenia rozszczepiania podobne do endopeptydazy są mniej częste, prawdopodobnie ze względu na wewnętrzne preferencje katalityczne lub nieoptymalne warunki testu, zdolność do rozszerzonego przetwarzania sugeruje szerszy repertuar substratów fizjologicznych niż wcześniej sądzono.

Odkrycia te poszerzają wiedzę na temat proteaz z rodziny DPPIV, podważając

tradycyjny pogląd, że są one wyłącznie dipeptydylopeptydazami. Podkreślają one funkcjonalną różnorodność w obrębie rodziny i sugerują, że inne jej członki mogą również posiadać nieznaną dotąd aktywność tripeptydylopeptydazy. Identyfikacja dodatkowych substratów fizjologicznych i określenie determinantów strukturalnych umożliwiających rozszczepianie trzeciego resztu mogłoby pomóc w projektowaniu selektywnych inhibitorów lub proteaz inżynieryjnych o dostosowanych zdolnościach przetwarzania N-końca. Takie spostrzeżenia są obiecujące dla pogłębienia naszej wiedzy na temat dojrzewania hormonów peptydowych, regulacji immunologicznej oraz rozwoju terapii opartych na peptydach o zwiększonej stabilności lub ukierunkowanej bioaktywności.

Podsumowując, poprzez połączenie analiz biochemicznych, kinetycznych i strukturalnych wykazaliśmy, że *C. elegans* DPF-3 i hDPP4 posiadają aktywność tripeptydylopeptydazy oprócz swojej kanonicznej funkcji dipeptydylopeptydowej. Ta podwójna aktywność rozszerza potencjalny repertuar substratów tych enzymów i stanowi podstawę dla przyszłych badań nad ich rolą fizjologiczną i potencjałem terapeutycznym. Nasze prace podkreślają, że subtelne różnice w regionach niebędących rdzeniem oraz w miejscach wiązania substratów mogą mieć głęboki wpływ na specyfikę proteazy, oferując nowe spojrzenie na plastyczność funkcjonalną proteaz z rodziny DPPIV.

5. Prezentacja znaczącej działalności naukowej lub artystycznej prowadzonej w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub kulturalnej, zwłaszcza w instytucjach zagranicznych.

- Po ukończeniu studiów doktoranckich dołączyłem do laboratorium prof. Alaina Jacquiera w Institut Pasteur w Paryżu we Francji jako stypendysta poddoktorancki. Moim projektem było zrozumienie, w jaki sposób można modulować zakończenie transkrypcji w celu zmiany ekspresji genów. W ramach tej pracy postanowiłem zrozumieć, w jaki sposób gen *Saccharomyces cerevisiae* RPL9B, który koduje białko rybosomalne, jest regulowany na poziomie transkrypcji. Geny białek rybosomalnych są ekspresjonowane na wysokim poziomie, ale muszą być również ściśle kontrolowane, aby utrzymać homeostazę komórkową. Chociaż zakończenie transkrypcji było tradycyjnie postrzegane jako proces statyczny, który po prostu określa koniec genu, naszym celem było zbadanie, czy może ono również służyć jako mechanizm regulacyjny. Skupiając się na RPL9B, odkryliśmy

uderzający przykład tego, jak modulacja między różnymi trybami zakończenia transkrypcji może wpływać na ekspresję genów.

W wyniku moich eksperymentów odkryliśmy, że transkrypcja RPL9B przebiega na przemian dwoma różnymi ścieżkami terminacji. Jedna ścieżka prowadzi do prawidłowej terminacji i produkcji funkcjonalnego mRNA, zapewniając syntezę białka rybosomalnego. Druga ścieżka prowadzi do terminacji, w wyniku której powstają niekodujące RNA, które nie przyczyniają się do produkcji białek. Ta dynamiczna zmiana między trybami terminacji skutecznie kontroluje poziom ekspresji RPL9B. Co ważne, wykazałem, że ten mechanizm regulacyjny nie jest przypadkowy, ale jest precyzyjnie dostrojonym procesem, który odpowiada na potrzeby komórki w zakresie syntezy białek rybosomalnych. Praca ta podkreśla znaczenie zakończenia transkrypcji jako aktywnego uczestnika regulacji genów, poszerzając naszą wiedzę na temat złożoności kontroli potranskrypcyjnej i transkrypcyjnej. Ostatecznie nasze badania ustanawiają RPL9B jako modelowy system do badania szerszej roli wyboru zakończenia w precyzyjnym dostrajaniu programów ekspresji genów.

W drugim projekcie, który rozpocząłem jako doktorant, badałem funkcję rybonukleazy dis-3p. W ramach tych badań analizowałem mechanizm regulujący przetwarzanie prekursorów RNA i ich degradację w normalnych warunkach. Chociaż wiadomo było już, że egzosom jądrowy odgrywa kluczową rolę w nadzorowaniu i degradacji RNA, zakres jego aktywności w komórkach typu dzikiego pozostawał niejasny. Chciałem ustalić, czy egzosom działa głównie w zakresie kontroli jakości, usuwając nieprawidłowe transkrypty, czy też, czy również w znacznym stopniu przetwarza normalne prekursory RNA w ramach regularnej ekspresji genów. Naszym celem było zmapowanie udziału egzosomu w metabolizmie RNA z rozdzielczością obejmującą cały genom.

Stosując metody transkryptomiczne o wysokiej wydajności, odkryliśmy, że egzosom nie ogranicza się do degradacji wadliwych RNA, ale jest również głęboko zaangażowany w kształtowanie transkryptomu komórek typu dzikiego. Zaobserwowaliśmy powszechną degradację prekursorów RNA, w tym niesplicowanych pre-mRNA, przedłużonych transkryptów 3'-końcowych i innych produktów ubocznych transkrypcji. Ta rozległa aktywność egzosomu zapewnia, że gromadzą się tylko prawidłowo przetworzone i funkcjonalne RNA, podczas gdy nadmiar lub niepożądane produkty pośrednie są szybko

eliminowane. Nasze wyniki wykazały, że dojrzewanie RNA i rozpad RNA są ściśle powiązanymi procesami, skoordynowanymi w celu utrzymania integralności transkryptomu. Odkrycia te na nowo definiują nasze rozumienie nadzoru RNA, podkreślając, że degradacja nie jest jedynie procesem korygującym, ale integralną częścią regulacji genów.

- Odwiedziłem laboratorium Torbena Heicka Jensena na Uniwersytecie w Aarhus w Danii, aby przeprowadzić eksperymenty dotyczące lokalizacji RNA w jądrze komórkowym drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Moja praca w laboratorium prof. Aarhusa i dalsza współpraca z jego zespołem zaowocowały dwoma publikacjami. Jeden z projektów dotyczył nadzoru nad mRNA w jądrze komórkowym u mutantów kompleksu THO/sub2 *Saccharomyces cerevisiae*. Defekty w kompleksie THO/sub2 zakłócają prawidłowy montaż mRNP, prowadząc do zatrzymania w jądrze komórkowym i degradacji nieprawidłowych transkryptów. Zaobserwowaliśmy, że egzosom i jego kofaktory odgrywają kluczową rolę w eliminacji tych wadliwych mRNA. Nieprawidłowo zmontowane mRNP są rozpoznawane przez czynniki nadzorujące, co uniemożliwia ich eksport.

W kolejnym badaniu zbadaliśmy rolę kompleksu THO/Sub2p w koordynowaniu transkrypcji z eksportem mRNA. Odkryliśmy, że THO/Sub2p łączy przetwarzanie końca 3' mRNA z ich powiązaniem z kompleksem porów jądrowych. Utrata funkcji THO/Sub2p powoduje zaburzenia w tworzeniu końca 3' i zakłócenia w interakcjach między genami a porami jądrowymi, co prowadzi do wad eksportu. Nasze wyniki wykazały, że sprzężenie to jest niezbędne do skutecznego dojrzewania i eksportu transkryptów. Dzięki tej pracy odkryliśmy, że THO/Sub2p integruje transkrypcję, przetwarzanie RNA i eksport w jednolity szlak.

- Byłem gościnnym studentem w laboratorium Sabine Brantl na Uniwersytecie Friedricha Schillera w Jenie w Niemczech i realizowałem projekt mający na celu zrozumienie funkcji małych niekodujących RNA w oporności na antybiotyki. Stwierdzono, że CodY, globalny regulator transkrypcji w *Bacillus subtilis*, aktywuje transkrypcję małego regulacyjnego RNA (sRNA). To sRNA odgrywa rolę w precyzyjnym dostrajaniu ekspresji genów w warunkach bogatych w składniki odżywcze. Nasze badania wykazały, że CodY wiąże się bezpośrednio z regionem promotora genu sRNA, a utrata CodY znacznie zmniejsza ekspresję sRNA, potwierdzając jego rolę regulacyjną.

- Przez sześć miesięcy byłem studentem wizytującym w laboratorium Olivera Muhlemanna na Uniwersytecie w Bernie w Szwajcarii, gdzie badałem rolę rozkładu mRNA za pośrednictwem nonsensownych mutacji (NMD) w hodowli komórkowej. Poznałem różne techniki biologii molekularnej oraz koncepcję kontroli jakości RNA. Podczas tego krótkiego pobytu nie udało mi się opublikować żadnych prac.
- 6. Prezentacja osiągnięć dydaktycznych i organizacyjnych, a także osiągnięć w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki.**

a. Dydaktyka

Od 2022 roku byłem zatrudniony jako adiunkt w Centrum Technologii Zaawansowanych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Zostałem zwolniony z obowiązków dydaktycznych dzięki grantowi SONATA BIS przyznanemu przez Narodowe Centrum Nauki. W związku z tym nie miałem okazji prowadzić zajęć dydaktycznych. W roku akademickim 2024-2025 prowadziłem wykłady dla studentów studiów magisterskich z biotechnologii na temat transgeniki zwierząt. Dodatkowo opracowałem praktyczny kurs z zakresu transgeniki zwierząt z wykorzystaniem *C. elegans* jako systemu modelowego.

b. Opiekunostwo nad studentami/badaczami

Obecnie jestem współpromotorem trzech doktorantów w moim laboratorium, którzy są zapisani do szkoły doktorskiej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza.

1. Ankit Roy: 01.02.2023 do 31.01.2027.

Tytuł: Mechanistyczne zrozumienie *picd-1* w wyciszaniu transpozonów i utrzymaniu genomu

2. Afzal Amanullah: 01.05.2023 do 30.04.2027.

Tytuł: Regulacja aktywności ALG-1 przez proteazę DPF-3, niezależnie od jej aktywności katalitycznej.

3. Damini Saha: 01.08.2023 do 30.07.2027.

Tytuł: Rola proteaz DPPIV w zwalczaniu agregatów białkowych spowodowanych powtarzającymi się ekspansjami.

Obecnie w moim laboratorium pracuje trzech doktorantów pod moim nadzorem.

1. Ilkin Aygun-Soyalp.

Tytuł: Białko wiążące RNA, PUF-9, jest niezbędne do reprodukcji u *C. elegans*.

2. Hasan Ali.

Tytuł: Funkcje *dpf-4* i *dpf-5* w płodności robaków.

3. Aditya Trivedi.

Tytuł: Opracowanie specyficznych i silnych inhibitorów DPF-3.

Dodatkowo w roku akademickim kończącym się w 2024 r. studiował student studiów magisterskich oraz student programu Erasmus w ramach trzymiesięcznej wymiany.

Praca magisterska napisana pod moim kierunkiem:

1. Safa Öksüz, 2024, „Rola *txdc-12.2* w regulacji ekspresji genów za pośrednictwem Argonaute”.

Projekt studenta Erasmusa:

1. Umut Celik, 2025: Rola PUF-9 w rozmnażaniu nicieni

c. *Popularyzacja nauki*

1. Zostałem zaproszony do wygłoszenia przemówienia podczas konferencji „Biological & Medical Model United Nations” w Poznaniu, gdzie przedstawiłem przegląd badań prowadzonych w moim laboratorium, a także omówiłem rolę nauki w reagowaniu na pandemii, opierając się na naszych ostatnich doświadczeniach globalnych. Poruszyłem również kwestię rosnącego wpływu sztucznej inteligencji na badania naukowe. Po wykładzie rozmawiałem ze studentami, odpowiadając na ich pytania naukowe i poruszając szersze tematy, takie jak przyszłość badań naukowych i sposoby przygotowania się młodych ludzi do kariery naukowej.
2. Liczba studentów wybierających biologię i karierę naukową spada w alarmującym tempie. Aby zainspirować kolejne pokolenie, zostałem zaproszony do mojej dawnej szkoły, aby opowiedzieć o karierze naukowej. Podzieliłem się spostrzeżeniami na temat

środowiska badawczego, emocji związanych z odkrywaniem nieznanego oraz wyzwań związanych z karierą naukową. Przedstawiając realistyczny, ale inspirujący obraz, udało mi się przekazać, że kariera naukowa jest nie tylko możliwa, ale także głęboko satysfakcjonująca i intelektualnie spełniająca. Mam nadzieję, że ta interakcja wzbudziła ciekawość przynajmniej u kilku uczniów i zachęciła ich do rozważenia przyszłości w badaniach biologicznych.

3. Na zaproszenie Międzynarodowej Szkoły w Poznaniu (ISOP) odwiedziłem szkołę, aby wyjaśnić uczniom pojęcie „siedlisk”. Pokazałem robaki, bakterie i grzyby oraz wyjaśniłem dzieciom znaczenie siedlisk i to, jak ich zniszczenie/brak może mieć katastrofalne skutki nie tylko dla mikroorganizmów/zwierząt, ale także dla ludzi.
4. Aby wzbudzić zainteresowanie badaniami naukowymi i zwiększyć świadomość społeczną na temat badań nad organizmami modelowymi, zaprosiłem kilku uczniów i ich rodziny do odwiedzenia mojego laboratorium. Podczas wizyty zaprezentowałem im *C. elegans*, nasz organizm modelowy, i pokazałem, jak komórki i neurony wyglądają pod mikroskopem. Wyjaśniłem, w jaki sposób wykorzystujemy te proste, ale potężne organizmy do odkrywania podstawowych procesów biologicznych. Wiele osób spoza środowiska naukowego nie zdaje sobie sprawy z wartości badań nad organizmami modelowymi i tego, jak odkrycia w systemach takich jak *C. elegans* mają szerokie implikacje dla zdrowia ludzkiego. Omówiłem na przykład kluczowe przełomy, takie jak odkrycie mikroRNA i molekularnych mechanizmów programowanej śmierci komórkowej, które po raz pierwszy odkryto u tych robaków, a później stwierdzono, że występują one również u ludzi. Mam nadzieję, że dzięki temu doświadczeniu udało mi się przekazać znaczenie i potencjał badań nad organizmami modelowymi, a być może zainspirowałem odwiedzających do głębszego docenienia nauki.
7. **Oprócz informacji wymienionych w punktach 1-6 powyżej, wnioskodawca może dołączyć inne informacje dotyczące swojej kariery zawodowej, które uzna za istotne.**

a. Niezależne granty

- NCN SONATA BIS (2022-2027) dla projektu zatytułowanego „Rola proteaz z rodziny

DPPIV w wyciszaniu transpozonów i utrzymaniu genomu” – główny badacz;

- NCN OPUS (2023-2027) dla projektu zatytułowanego „Mechanistyczne zrozumienie *picd-1* w wyciszaniu transpozonów i utrzymaniu genomu” – główny badacz.
- MAB- FENG (2025-2029) dla projektu zatytułowanego „TREAT-EXP: Opracowanie strategii terapeutycznych chorób genetycznych człowieka powodowanych ekspansją powtórzeń nukleotydowych” – kierownik zespołu

b. Nagrody i wyróżnienia

- Luty 2010: Stypendium podoktoranckie ROUX przyznane przez Institut Pasteur.
- Luty 2010: Stypendium podoktoranckie ARC – z wdzięcznością odrzucone.
- Maj 2006: Stypendium doktoranckie Regionu Île-de-France, Paryż, Francja.

(Podpis wnioskodawcy)

Bibliografia

- Aertgeerts, K., S. Ye, M. G. Tennant, M. L. Kraus, J. Rogers, B. C. Sang, R. J. Skene, D. R. Webb, and G. S. Prasad. 2004. 'Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation', *Protein Sci*, 13: 412-21.
- Apoorva, O. S., K. Shukla, A. Khurana, and N. Chaudhary. 2024. 'Proteases: Role in Various Human Diseases', *Curr Pharm Biotechnol*.
- Bartel, D. P. 2004. 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116: 281-97.
- Batista, P. J., J. G. Ruby, J. M. Claycomb, R. Chiang, N. Fahlgren, K. D. Kasschau, D. A. Chaves, W. Gu, J. J. Vasale, S. Duan, D. Conte, Jr., S. Luo, G. P. Schroth, J. C. Carrington, D. P. Bartel, and C. C. Mello. 2008. 'PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. elegans*', *Mol Cell*, 31: 67-78.
- Buckley, B. A., K. B. Burkhart, S. G. Gu, G. Spracklin, A. Kershner, H. Fritz, J. Kimble, A. Fire, and S. Kennedy. 2012. 'A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality', *Nature*, 489: 447-51.
- Claycomb, J. M., P. J. Batista, K. M. Pang, W. Gu, J. J. Vasale, J. C. van Wolfswinkel, D. A. Chaves, M. Shirayama, S. Mitani, R. F. Ketting, D. Conte, Jr., and C. C. Mello. 2009. 'The Argonaute CSR-1 and its 22G-RNA cofactors are required for holocentric chromosome segregation', *Cell*, 139: 123-34.

- Deacon, C. F. 2019. 'Physiology and Pharmacology of DPP-4 in Glucose Homeostasis and the Treatment of Type 2 Diabetes', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10: 80.
- Ghildiyal, M., and P. D. Zamore. 2009. 'Small silencing RNAs: an expanding universe', *Nat Rev Genet*, 10: 94-108.
- Grishok, A., A. E. Pasquinelli, D. Conte, N. Li, S. Parrish, I. Ha, D. L. Baillie, A. Fire, G. Ruvkun, and C. C. Mello. 2001. 'Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C-elegans developmental timing', *Cell*, 106: 23-34.
- Gu, W. F., M. Shirayama, D. Conte, J. Vasale, P. J. Batista, J. M. Claycomb, J. J. Moresco, E. M. Youngman, J. Keys, M. J. Stoltz, C. C. G. Chen, D. A. Chaves, S. H. Duan, K. D. Kasschau, N. Fahlgren, J. R. Yates, S. Mitani, J. C. Carrington, and C. C. Mello. 2009. 'Distinct Argonaute-Mediated 22G-RNA Pathways Direct Genome Surveillance in the C. elegans Germline', *Molecular Cell*, 36: 231-44.
- Gudipati, R. K., K. Braun, F. Gypas, D. Hess, J. Schreier, S. H. Carl, R. F. Ketting, and H. Grosshans. 2021. 'Protease-mediated processing of Argonaute proteins controls small RNA association', *Mol Cell*, 81: 2388-402 e8.
- Gudipati, R. K., D. Gaidatzis, J. Seebacher, S. Muehlhaeusser, G. Kempf, S. Cavadini, D. Hess, C. Sonesson, and H. Grosshans. 2024. 'Deep quantification of substrate turnover defines protease subsite cooperativity', *Mol Syst Biol*.
- Harvey, L. M., P. M. Frederick, R. K. Gudipati, P. Michaud, F. Houle, D. Young, C. Desbiens, S. Ladouceur, A. Dufour, H. Grosshans, and M. J. Simard. 2025. 'Dipeptidyl peptidase DPF-3 is a gatekeeper of microRNA Argonaute compensation in animals', *Nat Commun*, 16: 2738.
- Klemann, C., L. Wagner, M. Stephan, and S. von Horsten. 2016. 'Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system', *Clin Exp Immunol*, 185: 1-21.
- 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.
- Lopez-Otin, C., and J. S. Bond. 2008. 'Proteases: multifunctional enzymes in life and disease', *J Biol Chem*, 283: 30433-7.
- Meister, G. 2013. 'Argonaute proteins: functional insights and emerging roles', *Nat Rev Genet*, 14: 447-59.
- Mentlein, R. 1999. 'Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides', *Regul Pept*, 85: 9-24.
- Puente, X. S., L. M. Sanchez, C. M. Overall, and C. Lopez-Otin. 2003. 'Human and mouse proteases: a comparative genomic approach', *Nat Rev Genet*, 4: 544-58.
- Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 1993. 'Evolutionary families of peptidases', *Biochem J*, 290 (Pt 1): 205-18.
- Rawlings, N. D., A. J. Barrett, P. D. Thomas, X. Huang, A. Bateman, and R. D. Finn. 2018. 'The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database', *Nucleic Acids Res*, 46: D624-D32.
- Reed, K. J., J. M. Svendsen, K. C. Brown, B. E. Montgomery, T. N. Marks, T. Vijayasathy, D. M. Parker, E. O. Nishimura, D. L. Updike, and T. A. Montgomery. 2020. 'Widespread roles for piRNAs and WAGO-class siRNAs in shaping the germline transcriptome of Caenorhabditis elegans', *Nucleic Acids Res*, 48: 1811-27.
- Schechter, I., and A. Berger. 1967. 'On the size of the active site in proteases. I. Papain', *Biochem Biophys Res Commun*, 27: 157-62.
- Turk, B. 2006. 'Targeting proteases: successes, failures and future prospects', *Nat Rev Drug Discov*, 5: 785-99.

- Wedeles, C. J., M. Z. Wu, and J. M. Claycomb. 2013. 'Protection of germline gene expression by the *C. elegans* Argonaute CSR-1', *Dev Cell*, 27: 664-71.
- Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun. 1993. 'Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*', *Cell*, 75: 855-62.
- Yigit, E., P. J. Batista, Y. X. Bei, K. M. Pang, C. C. G. Chen, N. H. Tolia, L. Joshua-Tor, S. Mitani, M. J. Simard, and C. C. Mello. 2006. 'Analysis of the *C. elegans* argonaute family reveals that distinct argonautes act sequentially during RNAi', *Cell*, 127: 747-57.
- Yu, D. M., T. W. Yao, S. Chowdhury, N. A. Nadvi, B. Osborne, W. B. Church, G. W. McCaughan, and M. D. Gorrell. 2010. 'The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology', *FEBS J*, 277: 1126-44.