

ZAŁĄCZNIK nr 2.

Autoreferat w języku polskim

Rafał Tomecki

AUTOREFERAT

Informacje o osiągnięciu i dorobku naukowym

Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Analiza biochemiczna i funkcjonalna białek z rodziny Dis3 – podjednostek katalitycznych kompleksu egzozomu u *Eukaryota*”.

Warszawa, marzec 2014

1. Imię i nazwisko: Rafał Tomecki**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miesiąca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego dnia 19.03.2007.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Identyfikacja i analiza funkcji ludzkiej mitochondrialnej polimerazy poli(A)”. Promotorem w przewodzie doktorskim był prof. dr hab. Piotr P. Stępień (Instytut Genetyki i Biotechnologii UW), a recenzentami: prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka (Instytut Mikrobiologii; Wydział Biologii UW) oraz prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn (Katedra Biologii Molekularnej; Wydział Biologii; Uniwersytet Gdański).

Rozprawa uzyskała wyróżnienie Rady Naukowej Wydziału Biologii UW.

- tytuł magistra biologii w zakresie biologii molekularnej (**dyplom z wyróżnieniem**) uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego 21.03.2002.

Tytuł pracy magisterskiej: „Lokalizacja miejsca wiązania aktywatora ARCA w promotorze genu *otaA Aspergillus nidulans* - wpływ delecji w regionie AnUAS_{arg} na funkcjonowanie tego białka *in vivo*”.

Promotorem pracy był prof. dr hab. Piotr Węgleński.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych i odbytych studiach na terenie Polski

- **od 01.10.2011:** adiunkt w Instytucie Genetyki i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego;
- **od 01.10.2008:** adiunkt w Pracowni Biologii RNA i Genomiki Funkcjonalnej w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN;
- **28.07.2008-30.09.2008:** asystent w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN;
- **15.07.2007-14.07.2010:** adiunkt naukowy na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego;
- **15.03.2007-14.07.2007:** asystent naukowy na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego;
- **październik 2002-luty 2007:** studia doktoranckie w Studium Medycyny Molekularnej oraz na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra P. Stępnia;
- **październik 1997-marzec 2002:** interdyscyplinarne studia magisterskie w Kolegium Międzywydziałowych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych (MISMαP) Uniwersytetu Warszawskiego.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**A) Tytuł osiągnięcia naukowego**

Analiza biochemiczna i funkcjonalna białek z rodziny Dis3 – podjednostek katalitycznych kompleksu egzozomu u *Eukaryota*.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

- i. Lorentzen E., Basquin J., **Tomecki R.**, Dziembowski A. i Conti, E. (2008) Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Molecular Cell* **29**, 717 – 728.
IF₂₀₀₈ – **12,903**; IF_{5-letni} – **14,902**; punktacja MNiSW – **50**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **78**.
- ii. Lebreton A.*, **Tomecki R.***, Dziembowski A. i Séraphin B. (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**, 993 – 997; * – **równorzędni autorzy**.

- IF₂₀₀₈ – **31,434**; IF_{5-letni} – **38,159**; punktacja MNiSW – **50**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **135**.
- iii. **Tomecki R.**, Drazkowska K. i Dziembowski A. (2010) Mechanisms of RNA degradation by the eukaryotic exosome. *ChemBiochem* **11**, 938 – 945.
IF₂₀₁₀ – **3,945**; IF_{5-letni} – **3,67**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **17**.
- iv. **Tomecki R.**, Kristiansen M.S., Lykke-Andersen S., Chlebowski A., Larsen K.M., Szczesny R.J., Drazkowska K., Pastula A., Andersen J.S., Stepien P.P., Dziembowski A. i Jensen T.H. (2010) The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO Journal* **29**, 2342 – 2357.
IF₂₀₁₀ – **10,124**; IF_{5-letni} – **9,602**; punktacja MNiSW – **45**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **53**.
- v. Lykke-Andersen S.*, **Tomecki R.***, Jensen T.H. i Dziembowski A. (2011) The eukaryotic RNA exosome: Same scaffold but variable catalytic subunits. *RNA Biology* **8**, 61 – 66; * – **równorzędni autorzy**.
IF₂₀₁₁ – **4,933**; IF_{5-letni} – **5,436**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **30**.
- vi. Drazkowska K., **Tomecki R.**, Stodus K., Kowalska K., Czarnocki-Cieciura M. i Dziembowski A. (2013) The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Research* **41**, 3845 – 3858.
IF₂₀₁₂ – **8,278**; IF_{5-letni} – **8,055**; punktacja MNiSW – **40**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **5**.
- vii. **Tomecki R.#**, Drazkowska K., Kucinski I., Stodus K., Szczesny R.J., Gruchota J., Owczarek E.P., Kalisiak K. i Dziembowski A. (2014) Multiple myeloma-associated *hDIS3* mutations cause perturbations in cellular RNA metabolism and suggest hDIS3 PIN domain as a potential drug target. *Nucleic Acids Research* **42**, 1270 – 1290; # – **autor korespondencyjny**.
IF₂₀₁₂ – **8,278**; IF_{5-letni} – **8,055**; punktacja MNiSW – **40**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **0**.

Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie każdej z powyższych prac zamieszczono w Załączniku nr 9 (Oświadczenia współautorów)

- Łączny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac z roku 2013 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF₂₀₁₂) – **79,895**;
- Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – **295**;
- Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **318**.

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Kompleks egzozomu – główna eukariotyczna rybonukleaza odpowiedzialna za degradację, obróbkę i kontrolę jakości różnych klas RNA

Ekspresja informacji genetycznej w komórkach eukariotycznych jest regulowana na wielu poziomach – jednym z nich jest kontrola tempa degradacji RNA. Metabolizm RNA jest jednym z głównych procesów warunkujących prawidłową syntezę w pełni funkcjonalnych RNA reprezentujących określone klasy, połączoną z precyzyjnie kontrolowaną obróbką i wprowadzaniem odpowiednich modyfikacji posttranskrypcyjnych. Ponadto zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie komórek eukariotycznych funkcjonują liczne ścieżki kontroli jakości RNA, zapewniające wydajną eliminację niewłaściwie zsyntetyzowanych lub niefunkcyjnych transkryptów. Prawidłowa obróbka i rozkład licznych klas RNA zależy od aktywności różnych białek, w tym helikaz RNA, polimeraz poli(A) i poli(U), a przede wszystkim od enzymów degradujących RNA (rybonukleaz); zaliczają się do nich zarówno endorybonukleazy, czyli enzymy nacinające szkielet fosforanowo-cukrowy cząsteczek RNA w środku, jak i egzorybonukleazy inicjujące degradację substratów poprzez odtrawianie nukleotydów od końców cząsteczek RNA.

Wielopodjednostkowy, zachowany w ewolucji kompleks białkowy zwany egzozomem uczestniczy w większości procesów związanych z metabolizmem RNA w jądrze komórkowym i cytoplazmie komórek

eukariotycznych.^[1-3] Egzosom został odkryty u *Saccharomyces cerevisiae* jako enzym niezbędny dla prawidłowej obróbki 5.8S rybosomalnego RNA^[4], wchodzącego w skład dużej podjednostki rybosomu. W przypadku drożdży, które wciąż stanowią główny model badawczy wykorzystywany do prowadzenia analiz funkcji tego kompleksu, egzosom jest jedyną egzorybonukleazą degradującą RNA w kierunku 3'-5' niezbędną do życia – delecja genu kodującego którąkolwiek z podjednostek kompleksu, z wyjątkiem jądrowo-specyficznego czynnika Rrp6, jest letalna.^[4-6]

W cytoplazmie egzosom bierze udział w degradacji prawidłowo zsintetyzowanych cząsteczek mRNA, które spełniły swoją funkcję w komórce jako matryce do syntezy białka w procesie translacji.^[7,8] Działanie egzosomu musi być w tym przypadku poprzedzone usunięciem ogona poli(A) z końca 3' (deadenylacją).^[7,8] Należy wspomnieć, że transkrypty kodujące białka mogą być również degradowane przez egzorybonukleazę Xrn1 w kierunku 5'-3' po usunięciu czapeczki chroniącej koniec 5'.^[7,8] Względny udział obydwu ścieżek degradacji mRNA w cytoplazmie może być nieco odmienny u różnych organizmów eukariotycznych. Poza udziałem w ogólnym „obrocie RNA” (*ang.* RNA turnover), cytoplazmatyczny egzosom jest zaangażowany w bardziej wyspecjalizowane ścieżki degradacji mRNA, jak na przykład w regulowaną degradację transkryptów posiadających elementy bogate w sekwencje AU (*ang.* AU-rich elements; ARE) czy też usuwanie proksymalnych produktów trawienia mRNA powstających wskutek aktywności endonukleolitycznej białka Ago będącego składnikiem kompleksu RISC w procesie interferencji RNA.^[9-11] Ponadto, wraz z innymi enzymami degradującymi RNA, egzosom pełni kluczową funkcję w cytoplazmatycznych ścieżkach kontroli jakości RNA, zapobiegających translacji nieprawidłowych cząsteczek mRNA, takich jak: transkrypty z przedwczesnym kodonem terminacyjnym (*ang.* nonsense-mediated decay; NMD), transkrypty pozbawione kodonu terminacyjnego (*ang.* non-stop decay; NSD) oraz transkrypty z zawadami sterycznymi, które blokują translację rybosomu podczas syntezy białek (*ang.* no-go decay; NGD).^[12]

W jądrze komórkowym egzosom jest niezbędny dla prawidłowej obróbki cząsteczek prekursorowych RNA stabilnych klas (rRNA, tRNA, snRNA – małe jądrowe RNA, snoRNA – małe jąderkowe RNA) oraz degradacji produktów pośrednich dojrzewania różnych typów RNA, w tym intronów usuniętych z pre-mRNA podczas składania eksonów, zapobiegając tym samym ich akumulacji.^[6,13,14] Ponadto jądrowy egzosom uczestniczy w eliminacji mRNA z defektami wynikającymi z błędnego splicingu czy nieprawidłowości w formowaniu kompleksów rybonukleoproteinowych (mRNP), co ogranicza lub wyklucza ich eksport z jądra do cytoplazmy, gdzie ich obecność prowadziłaby do syntezy nieprawidłowych białek.^[15] Analogicznie usuwanie przez egzosom cząsteczek tRNA i rRNA, które uległy niewłaściwej obróbce, odgrywa istotną rolę w uniemożliwieniu im odpowiednio: udziału w dekodowaniu informacji genetycznej i włączaniu w struktury dojrzałych rybosomów.^[6,13,16,17] Kolejną ważną funkcją egzosomu jest bilansowanie wszechobecnej transkrypcji genomów eukariotycznych – wiadomo, że w przypadku upośledzenia funkcji kompleksu dochodzi do znaczącej akumulacji RNA powstających w obszarach międzygenowych (*ang.* cryptic unstable transcripts – CUTs u drożdży) lub powyżej promotorów genów kodujących białka (*ang.* promoter-upstream transcripts – PROMPTs w komórkach ludzkich) oraz transkryptów antysensownych.^[18-20] Niektóre z tych niekodujących cząsteczek RNA pełnią istotne funkcje regulacyjne, między innymi uczestnicząc w remodelowaniu struktury chromatyny w pobliżu miejsc w których są syntetyzowane.

Struktura egzosomu eukariotycznego jest silnie zachowana w ewolucji

Z chwilą identyfikacji kompleksu egzosomu u drożdży stwierdzono, że tworzą go między innymi podjednostki z domenami homologicznymi względem bakteryjnej egzorybonukleazy RNazy PH, występującymi również w fosforylaze polirybonukleotydydowej (PNPazie), która jest głównym białkiem katalitycznym prokariotycznego degradosomu – kompleksu odpowiedzialnego za degradację RNA u bakterii.^[21,22] Dowiedziono, że obydwie wspomniane RNazy bakteryjne, a także egzosom *Archaea*, wykazują bardzo zbliżone właściwości biochemiczne. Są one rybonukleazami fosforolitycznymi – wykorzystują fosforan nieorganiczny (P_i) jako nukleofil do ataku na wiązania fosfodiestrowe w RNA i uwalniają difosforany rybonukleozydów (NDP) jako produkty końcowe.^[21] Reakcja ta jest odwracalna, a jej kierunek zależy od stosunku P_i/NDP – w sytuacji, gdy stężenie NDP znacznie przewyższa dostępność P_i, może zachodzić niezależna od matrycy synteza RNA, prowadząca do powstania heterogennych ogonów poli(A) na końcach 3' RNA.^[23]

Bakteryjne rybonukleazy fosforolityczne i egzosom *Archaea* charakteryzuje również podobna organizacja przestrzenna. RNaza PH ma strukturę pierścienia z centralnym kanałem i zbudowana jest z sześciu identycznych podjednostek, spośród których każda posiada aktywność katalityczną.^[24-26] W przypadku PNPazy analogiczną strukturę formuje homotrimer, w którym każdy monomer obejmuje dwie domeny RNazy PH, ale tylko jedna z nich – PH2 – jest aktywna katalitycznie.^[21] Pierścień egzosomu *Archaea* to trimer heterodimerów Rrp41/Rrp42, w których jedynie Rrp41 wykazuje aktywność fosforolityczną.^[27-29] Zatem w odróżnieniu od RNazy PH, PNPazy i rdzeń egzosomu *Archaea* posiadają jedynie trzy miejsca aktywne zlokalizowane we wgłębieniach wewnętrznej ściany centralnego kanału. Warto jednak zaznaczyć, że podjednostki Rrp42 egzosomu *Archaea* są niezbędne dla aktywności Rrp41^[27], jak również ułatwiają wiązanie substratu i pośredniczą w oddziaływaniach z białkami Csl4 i Rrp4, które zawierają domeny zaangażowane w wiązanie RNA (KH i S1), podobne do tych, które występują w monomerze bakteryjnej PNPazy. Trzy kopie Rrp4 i/lub Csl4 lokalizują się na szczycie egzosomu *Archaea*, otaczając przestrzeń stanowiącą bezpośrednią kontynuację kanału znajdującego się wewnątrz pierścienia podjednostek Rrp41/Rrp42. Główną rolą centralnego kanału, którego średnica umożliwia dostęp zasadniczo wyłącznie jednoniciowym RNA, jest precyzyjna kontrola transportu substratów do zlokalizowanych głębiej miejsc fosforolizy.^[30,31]

W momencie rozpoczęcia przeze mnie realizacji badań dotyczących egzosomu eukariotycznego zaczęły pojawiać się pierwsze doniesienia na temat struktury tego kompleksu.^[32,33] Stało się wówczas oczywiste, że podobnie jak w przypadku PNPazy i egzosomu *Archaea*, czyli głównych enzymów uczestniczących w metabolizmie RNA w dwóch pozostałych królestwach świata żywego, współtworzące go 9 podjednostek białkowych formuje charakterystyczną strukturę pierścienia z wyraźnym centralnym kanałem. Sześć spośród nich – Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 i Mtr3 – zawiera domeny o typie zwinięcia RNazy PH. Co ciekawe, trzy spośród nich (Rrp41, Rrp46 i Mtr3) są bardziej podobne do archebakteryjnego białka Rrp41, natomiast reszta (Rrp42, Rrp43 i Rrp45) przypomina w większym stopniu białko Rrp42 występujące u archebakterii. Pierścień eukariotycznego egzosomu zbudowany jest z trzech heterodimerów – Rrp41/Rrp45, Rrp43/Rrp46 i Mtr3/Rrp42, w obrębie których jedna podjednostka jest typu Rrp41, a druga – typu Rrp42. Pozostałe trzy podjednostki – Rrp4, Rrp40 i Csl4 – zawierają domeny wiążące RNA (KH oraz S1) i formują trimeryczną czapkę ponad heksamerem podjednostek homologicznych do RNazy PH, której światło stanowi przedłużenie centralnego kanału. Obecność czapki Rrp4/Rrp40/Csl4 stabilizuje oddziaływania pomiędzy białkami wchodzącymi w skład heksameru podjednostek homologicznych względem RNazy PH.^[32] W porównaniu z egzosomem *Archaea*, kompleks u *S. cerevisiae* zawiera dwie dodatkowe podjednostki – Dis3 (Rrp44) oraz Rrp6.

Eukariotyczny egzosom wykazuje aktywność hydrolazy zależną od dodatkowych podjednostek – Dis3 i Rrp6

Początkowo sugerowano, że każda z podjednostek eukariotycznego egzosomu może posiadać jakąś aktywność katalityczną.^[4] Przełomowym odkryciem, które w znaczącym stopniu wyznaczyło dalsze kierunki badań nad mechanizmem działania tego kompleksu w komórkach eukariotycznych, było wykazanie braku aktywności fosforolitycznej podjednostek pierścienia wynikającego z nieobecności krytycznych aminokwasów, charakterystycznych dla miejsc aktywnych występujących w bakteryjnych RNazach: PH i PNPazie oraz w egzosomie *Archaea*.^[34] Stwierdzono, że w odróżnieniu od nich egzosom *S. cerevisiae* jest zależną od magnezu procesywną egzorybonukleazą hydrolityczną – degradacja RNA prowadzona przez ten kompleks przebiega przy udziale cząsteczki wody jako nukleofila, a produktem końcowym reakcji są monofosforany rybonuklezydów (NMP).^[34] Udowodniono, że główną podjednostką katalityczną egzosomu u drożdży jest białko Dis3 (Rrp44), występujące zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie. Dis3 w połączeniu z 9-składnikowym pierścieniem tworzy tzw. egzosom 10-składnikowy, zwany także rdzeniem.^[34] Pojedyncza mutacja zachowanej ewolucyjnie reszty kwasu asparaginowego w Dis3, odpowiedzialnej za koordynację jonów magnezu w centrum aktywnym, całkowicie znosi aktywność egzosomu 10-składnikowego i prowadzi do upośledzenia funkcji kompleksu *in vivo*.^[34] Brak aktywności fosforolitycznej stwierdzono również w prowadzonych równolegle badaniach nad ludzkim egzosomem.^[35] Wydaje się zatem, że utrata zdolności pierścienia do prowadzenia fosforolizy, która nastąpiła w toku ewolucji,

była powiązana z dołączeniem do pierścienia kompleksu kolejnej podjednostki – białka Dis3, które w głównej mierze odpowiada za aktywność egzorybonukleolityczną eukariotycznego egzosomu. Jednocześnie postulowano, że mimo braku aktywności enzymatycznej pierścień może pełnić istotną rolę jako platforma dla interakcji z innymi białkami i/lub substratami RNA.^[34]

10-składnikowy egzosom (rdzeń) oddziałuje w jądrze komórkowym *S. cerevisiae* z dodatkową podjednostką katalityczną Rrp6, formując tym samym kompleks 11-składnikowy.^[36] W przeciwieństwie do silnie procesywnego enzymu, jakim jest Dis3, białko Rrp6 jest egzorybonukleazą dystrybutywną, homologiczną względem RNazy D *Escherichia coli*, a jego aktywność odgrywa niewielką rolę w regulacji metabolizmu jądrowego RNA. Jedną z głównych funkcji białka Rrp6 jest usuwanie ostatnich 30 nukleotydów od końca 3' prekursora 5.8S rRNA podczas jego dojrzewania. W odróżnieniu od pozostałych podjednostek egzosomu delecja genu *RRP6* nie jest dla drożdży letalna.^[5]

OGÓLNE CELE BADAŃ: Szczegółowa analiza aktywności rybonukleolitycznej białka Dis3, również w kontekście pozostałej części rdzenia egzosomu; charakterystyka ludzkich homologów drożdżowego białka Dis3; próba ustalenia związku pomiędzy mutacjami w domenach Dis3 odpowiedzialnych za aktywność katalityczną a procesami chorobowymi.

Cel szczegółowy 1.: Wyjaśnienie mechanizmu degradacji RNA przez aktywność egzorybonukleolityczną drożdżowego białka Dis3.

Całkowita masa kompleksu drożdżowego egzosomu wynosi w przybliżeniu 400 kilodaltonów (kDa). Białko Dis3 jest jego największą podjednostką (110 kDa) i wykazuje modułową organizację domenową – na N-końcu znajduje się domena PIN (*ang.* PiIT N-terminal domain), a poniżej niej – moduł o znaczącej homologii w stosunku do enzymów typu RNazy II/R *E. coli*.^[37] Ten ostatni fragment białka obejmuje 3 domeny wiążące RNA o typie zwinięcia OB (*ang.* oligonucleotide binding-fold domain) [dwie domeny szoku zimna CSD1 i CSD2 (*ang.* cold shock domain) na N-końcu i domenę S1 na C-końcu] – oraz centralną domenę RNB (*ang.* RNase II/R-like domain).^[37-39] Enzymy typu RNazy II/R działają w sposób procesywny do momentu, gdy koniec 5' substratu RNA jest uwalniany w postaci ostatecznego produktu o długości 2-5 nukleotydów.^[40,41] Warto podkreślić, że o ile RNaza II jest w stanie degradować tylko jednoniciowe substraty RNA (ssRNA), co wynika ze średnicy ścieżki wiodącej substrat do centrum aktywnego enzymu, o tyle RNaza R posiada również zdolność trawienia substratów o częściowej strukturze dwuniciowej (dsRNA), pod warunkiem obecności fragmentu jednoniciowego o określonej długości na końcu 3' jednej z nici.^[42] Wstępne analizy aktywności egzorybonukleolitycznej drożdżowego Dis3 pozwalały sądzić, że jego właściwości biochemiczne przypominają bardziej te, które wykazano w przypadku RNazy R, niż RNazy II *E. coli*. Pierwszym celem prowadzonych przeze mnie badań było dogłębne zbadanie aktywności egzorybonukleolitycznej białka Dis3 i wyjaśnienie różnic w zdolności do degradacji substratów częściowo dwuniciowych w porównaniu z bakteryjną RNazą II. Badania biochemiczne były wykonywane we współpracy z grupą prof. Eleny Conti (wówczas EMBL w Heidelbergu), specjalizującą się w analizach strukturalnych białek i kompleksów białkowych uczestniczących w metabolizmie RNA. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w publikacji **4.B.i.**^[37]

Białko Dis3 *S. cerevisiae* pełnej długości (1001 aminokwasów) zostało oczyszczone, ale niestety nie nadawało się do krystalizacji – podejmowane próby kończyły się zawsze uzyskaniem małych kryształów, które nie rozpraszały promieniowania. W eksperymencie typu limitowanej proteolizy w połączeniu z degradacją Edmana zaobserwowano powstawanie fragmentu białka obejmującego aminokwasy 242-1001 (Dis3ΔN), który oczyszczony po nadprodukcji w bakteriach umożliwił otrzymanie kryształów bardzo dobrze rozpraszających promieniowanie. Ponieważ delecja fragmentu Dis3 obejmującego aminokwasy 1-241 usuwała w całości N-końcową domenę PIN, przed rozpoczęciem analiz strukturalnych należało sprawdzić, czy nie wpływa to na aktywność egzorybonukleolityczną białka.^[37]

Przeprowadzone przeze mnie analizy biochemiczne z wykorzystaniem białka Dis3 pełnej długości oraz wariantu Dis3ΔN pozwoliły stwierdzić, że usunięcie domeny PIN nie ma żadnego wpływu na zdolność białka do degradacji jednoniciowych lub częściowo dwuniciowych substratów RNA. Sugerowało to, że aktywność egzorybonukleolityczna Dis3 zależy wyłącznie od modułu homologicznego względem RNazy II/R, co było zgodne z wcześniejszą obserwacją, że mutacja zmieniająca pojedynczy aminokwas w centrum aktywnym

domeny RNB – D551N – całkowicie znosi tę aktywność.^[34] Eksperymenty te pozwoliły również na stwierdzenie, że wariant Dis3 Δ N z mutacją D551N może zostać wykorzystany jako materiał do współkrystalizacji z substratem RNA, co miało umożliwić wyjaśnienie mechanizmu degradacji egzorybonukleolitycznej.^[37]

Kolejnym wnioskiem, który można było wyciągnąć na podstawie przeprowadzonych analiz biochemicznych, było stwierdzenie, że produkty końcowe degradacji egzorybonukleolitycznej mają długość 3-5 nukleotydów (dominujący produkt to 4 nt) oraz że wydajność degradacji substratów częściowo dwuniciowych jest ściśle uzależniona od długości jednoniciowego fragmentu na końcu 3' jednej z nici substratu dsRNA – zarówno w przypadku Dis3 pełnej długości, jak i dla wariantu Dis3 Δ N obserwowałem wydajną degradację dsRNA z jednoniciowym wydłużeniem złożonym z 14 nukleotydów. Wydajność degradacji malała wraz ze spadkiem długości jednoniciowego wydłużenia – substraty dsRNA, w których jedna nić substratu posiadała tylko 2-3 niesparowane nukleotydy praktycznie nie ulegały degradacji egzorybonukleolitycznej. Ponadto, w doświadczeniach opartych na kompetycji stwierdziłem, że w odróżnieniu od RNazy II, której aktywność jest silnie hamowana zarówno przez RNA, jak i DNA, białko Dis3 wykazuje około 50-krotnie wyższe powinowactwo do RNA niż do DNA. Opisane powyżej właściwości biochemiczne pozwoliły stwierdzić jednoznacznie, że aktywność egzorybonukleolityczna drożdżowego białka Dis3 przypomina bardziej tę, którą wykazuje bakteryjna RNaza R, a nie RNaza II.^[37]

Dzięki analizom z wykorzystaniem elektroforezy RNA w żelach natywnych ustaliłem, że degradacji substratów dsRNA przez Dis3 towarzyszy uwalnianie nici komplementarnej, co świadczy o tym, że białko Dis3 posiada zdolność do rozplatania struktur drugorzędowych. Zauważyłem również, że obecność domeny PIN może mieć wpływ na wydajność rozplatania i degradacji substratów dsRNA z krótkimi (4-7 nt) wydłużeniami na końcach 3' jednej z nici – przebieg tych reakcji był 2-3-krotnie wolniejszy dla białka Dis3 Δ N niż w przypadku Dis3 pełnej długości.^[37]

Bardzo interesującą obserwacją było również stwierdzenie, że samo białko Dis3 degraduje substraty dsRNA około 10 razy bardziej wydajnie niż w sytuacji, gdy występuje jako element 10-składnikowego kompleksu.^[37] Sugerowało to, że powiązanie Dis3 z pierścieniem egzosomu obniża aktywność egzorybonukleolityczną tego białka względem pewnych substratów RNA zawierających struktury dwuniciowe. Zjawisko to zostało zbadane bardziej szczegółowo i wyjaśnione w publikacjach **7.A.II.vii.** i **4.B.vi.**^[43,44] Wynika ono z faktu, że substraty RNA docierają do centrum katalitycznego domeny RNB nie bezpośrednio, lecz poprzez centralny kanał pierścienia egzosomu.

Rozwiązanie struktury kryształu białka Dis3 Δ N D551N wraz z 13-nukleotydowym substratem RNA poli(A) oraz jonem magnezu ujawniło uderzającą różnicę we względnej orientacji przestrzennej domen o typie zwinięcia OB, która w znaczący sposób wpływa na przebieg ścieżki doprowadzającej substrat RNA do miejsca aktywnego w domenie RNB. W odróżnieniu od RNazy II, gdzie RNA dociera do centrum katalitycznego poprzez wąską szczelinę między domenami CSD2 i S1, w przypadku Dis3 ścieżka doprowadzająca biegnie pomiędzy domenami CSD1 i RNB. Na podstawie analiz strukturalnych stwierdzono, że jednym z krytycznych aminokwasów formujących tę ścieżkę jest A815. Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia biochemiczne z wykorzystaniem wariantów Dis3 A815W i Dis3 A815F wykazały, że blokada steryczna wynikająca z wprowadzenia pierścieni aromatycznych skutkuje znaczącym obniżeniem wydajności degradacji substratów dsRNA, niezależnie od długości jednoniciowego wydłużenia na końcu 3' jednej z nici. Wyniki te dostarczyły silnego poparcia dla poprawności opisu ścieżki doprowadzającej substrat do centrum katalitycznego domeny RNB na podstawie uzyskanej struktury krystalicznej i potwierdziły jej istotność z punktu widzenia rozplatania substratów RNA zawierających struktury dwuniciowe przez białko Dis3.^[37]

Podsumowując, wykonane przeze mnie analizy biochemiczne w połączeniu z danymi strukturalnymi otrzymanymi przez naszych współpracowników pozwoliły szczegółowo wyjaśnić mechanizm degradacji egzorybonukleolitycznej przez domenę RNB białka Dis3. W szczególności udało się wyjaśnić, że różnice w zdolności do rozplatania i degradacji substratów RNA o częściowej strukturze dwuniciowej charakteryzujące drożdżowe białko Dis3 i bakteryjną RNazę II warunkuje odmienna organizacja przestrzenna domen wiążących RNA, a co za tym idzie – obecność różnych ścieżek doprowadzających substraty do miejsca aktywnego domeny katalitycznej każdego z tych dwóch enzymów.

Połączenie podejścia biochemicznego i strukturalnego pozwoliło nam zaproponować mechanizm molekularny rozplatania struktur drugorzędowych przez Dis3 według którego translokacja substratu podczas

kolejnych rund degradacji może prowadzić do częściowego rozwinięcia nici w pobliżu początku ścieżki prowadzącej substrat do centrum katalitycznego enzymu. Zgodnie z zaproponowanym modelem reakcji, rozplatanie nici nie jest napędzane hydrolizą ATP, jak ma to miejsce w przypadku helikaz, lecz jest możliwe dzięki obecności energii chemicznej uwalnianej podczas hydrolizy łańcucha RNA od końca 3'. Profil ścieżki doprowadzającej substrat do miejsca katalizy w domenie RNB białka Dis3 powoduje zagięcie znajdującej się w niej cząsteczki RNA. W trakcie translatacji substratu dochodzi prawdopodobnie do nieznacznego obrotu łańcucha RNA na początku ścieżki, co z kolei indukuje napięcie torsyjne ułatwiające rozplatanie struktury drugorzędowej.^[37]

Cel szczegółowy 2.: Zbadanie funkcji N-końcowej domeny PIN białka Dis3.

W trakcie prowadzenia badań dotyczących białka Dis3 zauważyliśmy, że w porównaniu do bakteryjnych enzymów typu RNazy II/R posiada ono dodatkową, silnie zachowaną ewolucyjnie domenę na N-końcu – tak zwaną domenę PIN. Wcześniejsze doniesienia literaturowe sugerowały, że domeny PIN obecne w innych białkach mogą być związane z aktywnością nukleolityczną.^[45,46] Kolejnym celem prowadzonych przeze mnie badań stało się zatem określenie roli, jaką odgrywa domena PIN drożdżowego białka Dis3, a w szczególności wykazanie, czy może ona odpowiadać za jakąś dodatkową, nieodkrytą dotąd aktywność rybonukleolityczną głównej podjednostki katalitycznej kompleksu egzozomu u drożdży.

Rezultaty przeprowadzonych przez mnie analiz biochemicznych, uzupełnionych przez wyniki badań w układzie *in vivo*, uzyskane we współpracy z laboratorium kierowanym przez prof. Bertranda Séraphina (wówczas CNRS w Gif-sur-Yvette) zostały przedstawione w publikacji **4.B.ii.**^[47]

We wstępnym eksperymencie udało mi się wykazać, że białko Dis3 D551N, całkowicie pozbawione aktywności egzorybonukleolitycznej, wykazuje *in vitro* zdolność nukleolitycznej degradacji jednoniciowego substratu RNA znakowanego na końcu 5' w buforach zawierających kationy metalu dwuwartościowego (Mg^{2+} , Mn^{2+} lub Zn^{2+}) w wysokim stężeniu (1-3 mM). Optymalnym kofaktorem dla obserwowanej aktywności okazały się jony manganu. Aby stwierdzić, czy aktywność ta jest związana z obecnością domeny PIN, uzyskałem warianty białka Dis3 D551N z dodatkowymi substytucjami zachowanych ewolucyjnie reszt asparaginianu w obrębie potencjalnego centrum katalitycznego domeny PIN – Dis3 D171N D551N oraz Dis3 D198N D551N, które posłużyły do wykonania kolejnych analiz biochemicznych. Ich wyniki pozwoliły wykazać jednoznacznie, że brak którejkolwiek ze wspomnianych reszt kwasu asparaginowego w domenie PIN skutkuje całkowitą utratą zdolności do degradacji RNA, co świadczyło o tym, że nowo odkryta aktywność nukleolityczna białka Dis3 jest całkowicie zależna od niezmienionej domeny PIN. Aktywność tę stwierdzono również w przypadku testów przeprowadzonych dla rekombinowanego fragmentu N-końcowego białka Dis3 obejmującego domenę PIN (aminokwasy 1-241), co wskazywało, że jest ona niezależna od pozostałej części Dis3, homologicznej względem RNazy II/R. Degradacja substratów RNA znakowanych na końcach 5' lub 3' skutkowała powstawaniem produktów pośrednich komplementarnych względem siebie, a w żadnym przypadku nie otrzymano mononukleotydów jako produktów końcowych. Sugerowało to że domena PIN wykazuje aktywność endorybonukleolityczną. Jednoznacznym dowodem potwierdzającym tę hipotezę było wykazanie zdolności dzikiego białka Dis3 (ale nie jego wersji z mutacjami katalitycznymi w obrębie domeny PIN – Dis3 D171N lub Dis3 D198N) do degradacji scyrkularyzowanego (a więc pozbawionego wolnych końców) substratu RNA.^[47]

Ponadto precyzyjne porównanie aktywności białka Dis3 typu dzikiego z jego wariantami zawierającymi pojedyncze i podwójne mutacje w domenach PIN i RNB, w buforach zawierających mieszaniny jonów magnezu i manganu w różnych stężeniach, pozwoliło na wykazanie aktywności endorybonukleolitycznej domeny PIN w kontekście obecności aktywności egzorybonukleolitycznej domeny RNB oraz na stwierdzenie współpracy obu aktywności nukleolitycznych białka Dis3 podczas degradacji substratów RNA. Wydaje się zatem, że Dis3 jest unikatowym przykładem eukariotycznej nukleazy, posiadającej dwie różne aktywności enzymatyczne, zlokalizowane w dwóch odrębnych domenach tego samego białka.^[47]

Ponieważ delecja genu *DIS3* u drożdży jest letalna, aby zbadać znaczenie aktywności endorybonukleolitycznej domeny PIN *in vivo*, skonstruowany został układ eksperymentalny, w którym sekwencje kodujące różne wersje Dis3 w fuzji ze znacznikiem były wprowadzane na plazmidach centromerowych do szczepu drożdży, w którym endogenny *DIS3* znajdował się pod kontrolą promotora regulowanego pochodnymi tetracykliny. W warunkach represji ekspresji endogennego *DIS3*, w podwyższonej

temperaturze, stwierdzono umiarkowany defekt wzrostowy w przypadku obecności wariantu Dis3 D171N, słabszy niż w przypadku wariantu Dis3 D551N, natomiast kombinacja mutacji Dis3 D171N i D551N skutkowałą syntetyczną letalnością. Sugeruje to, że obie aktywności nukleolityczne białka Dis3 są istotne z fizjologicznego punktu widzenia. Warto również wspomnieć, że inaktywacja domeny PIN białka Dis3 wzmacniała fenotyp wzrostowy wynikający z braku innej podjednostki katalitycznej drożdżowego egzozomu – białka Rrp6, co stanowiło dodatkowe poparcie dla znaczącej roli nowo odkrytej aktywności endorybonukleolitycznej dla funkcjonowania kompleksu egzozomu *in vivo*.^[47]

Jeśli chodzi o fenotypy molekularne, mutacja D171N powodowała akumulację 5'-ETS – produktu ubocznego obróbki rRNA, który jest znanym substratem egzozomu. Zgodnie z wynikami analiz biochemicznych oraz testów wzrostowych, poziom akumulacji 5'-ETS był słabszy niż w przypadku mutacji D551N, natomiast połączenie obydwu mutacji skutkowało efektem synergicznym. Dodatkowo w szczepie drożdży z mutacją D551N zaobserwowano wyraźną obecność produktów pośrednich degradacji 5'-ETS, które zanikały w szczepie z mutacją D171N, co sugerowało, że generowanie tych produktów zależy od aktywności endorybonukleolitycznej domeny PIN. Przeprowadzone przeze mnie analizy biochemiczne z wykorzystaniem różnych rekombinowanych wersji białka Dis3 oraz 5'-ETS zsyntetyzowanego w reakcji transkrypcji *in vitro* w pełni potwierdziły wyniki uzyskane *in vivo*. Mapowanie końców produktów pośrednich degradacji 5'-ETS ujawniło, że końce 3' niektórych cząsteczek odpowiadają precyzyjnie końcom 5' innych fragmentów 5'-ETS, co stanowiło dodatkowy dowód potwierdzający, że powstają one w wyniku cięcia endonukleolitycznego. Przyrównanie zmapowanych miejsc cięcia do znanej struktury drugorzędowej 5'-ETS pozwoliło stwierdzić, że lokalizują się one preferencyjnie w regionach pętli i innych fragmentach nieustrukturyzowanych – było to zgodne z obserwacją, że aktywność endorybonukleolityczna domeny PIN białka Dis3 wykazuje ścisłą specyficzność względem jednoniciowych RNA w układzie *in vitro*. Niektóre z produktów pośrednich degradacji 5'-ETS zawierały na końcu 3' krótkie ogony oligo(A), najprawdopodobniej dodawane przez jądrowy kompleks TRAMP, stymulujący aktywność degradacyjną egzozomu. Należy zaznaczyć, że aktywność endorybonukleolityczna domeny PIN nie była specyficzna tylko względem 5'-ETS. Substytucje D171N i D551N w Dis3 wywierały efekt synergiczny również na procesy degradacji utajonego niestabilnego transkryptu NEL025 oraz obróbki prekursora 7S do 5.8S rRNA. Fenotypy te były dodatkowo wzmocnione w szczepie *rrp6Δ*. Endonukleolityczna aktywność rdzenia egzozomu wpływa zatem na szereg różnych fizjologicznych cząsteczek RNA, co świadczy o tym, że jej rola w regulacji metabolizmu RNA jest ogólna.^[47]

W podsumowaniu można stwierdzić, że dzięki przeprowadzeniu szczegółowej analizy biochemicznej i funkcjonalnej domeny PIN białka Dis3 udało nam się zidentyfikować nową aktywność endonukleolityczną rdzenia eukariotycznego egzozomu. Wydaje się, że współdziała ona z odkrytymi wcześniej aktywnościami egzorybonukleolitycznymi białek Dis3 i Rrp6, najprawdopodobniej dostarczając im alternatywnych końców 3' i ułatwiając inicjację degradacji, za czym przemawiają synergiczne efekty obserwowane w przypadku kombinacji mutacji upośledzających aktywności enzymatyczne badanych RNaz. Lokalizacja różnych aktywności nukleolitycznych w odrębnych domenach białka Dis3 sugeruje, że powstało ono na wczesnym etapie ewolucji eukariontów w wyniku fuzji domeny PIN oraz enzymu homologicznego względem bakteryjnych RNaz II/R. Aktywność endorybonukleolityczna domeny PIN umożliwia ponowną inicjację degradacji cząsteczek RNA zawierających struktury drugorzędowe w przypadkach, gdy blokują one mechanicznie aktywności egzorybonukleolityczne egzozomu. Odkrycie zdolności egzozomu do przeprowadzania endonukleolitycznej degradacji RNA wymusiło nowe spojrzenie na mechanizm działania tego kompleksu i wpłynęło na powszechnie akceptowany obraz rozkładu mRNA u *Eukaryota*, zgodnie z którym uważano, że protekcja końców mRNA jest wystarczająca do przeciwdziałania degradacji.

Publikacja **4.B.ii**.^[47] opisująca wspomniane wyżej wyniki była cytowana już ponad 100 razy i uzyskała nagrody JM Rektora Uniwersytetu Warszawskiego oraz Rady Naukowej IBB PAN. Został jej także poświęcony komentarz w czasopiśmie *Nature Structural and Molecular Biology* (2009; **16**, 9 – 10; Jeffrey Wilusz: “RNA stability: is it the endo' the world as we know it?”).^[48]

Wyniki opublikowane w pracach oryginalnych **4.B.i** i **4.B.ii**.^[37,47], dotyczących charakterystyki aktywności nukleolitycznych białka Dis3, zostały przedyskutowane dokładniej i osadzone w szerszym kontekście literaturowym w pracy przeglądowej **4.B.iii**.^[11], której byłem głównym autorem.

Warto również wspomnieć, że przy okazji realizacji badań, które zaowocowały publikacją **7.A.II.vii**, udało mi się opisać drugą funkcję domeny PIN, niezależną od odkrycia jej aktywności

endorybonukleolitycznej. Okazało się bowiem, że odgrywa ona istotną rolę strukturalną – jest to fragment białka Dis3 odpowiadający za jego oddziaływanie z resztą rdzenia egzozomu.^[43]

Cel szczegółowy 3.: Zdefiniowanie roli centralnego kanału pierścienia egzozomu w regulacji aktywności rybonukleolitycznych białka Dis3.

Jak wspomniano powyżej, uzyskane w trakcie realizacji wcześniejszych badań dane wskazywały, że obecność nieaktywnego katalitycznie pierścienia wpływa na degradację substratów RNA o częściowej strukturze dwuniciowej, co sugerowało, że reguluje on w jakiś sposób aktywność rybonukleolityczną Dis3.^[37] Wyniki analiz strukturalnych, przeprowadzonych w naszej grupie badawczej oraz w innych laboratoriach dowiodły, że Dis3 łączy się z dolną częścią pierścienia za pośrednictwem domeny PIN, która oddziałuje głównie z podjednostką Rrp41.^[43,49,50] Badania biochemiczne sugerowały, że substraty docierają do centrum katalitycznego domeny RNB poprzez centralny kanał pierścienia egzozomu.^[50] Rozwiązane struktury kompleksu wskazywały, że miejsce aktywne domeny RNB znajduje się w pobliżu wyjścia z kanału, a mutacje zachowanych ewolucyjnie zasadowych aminokwasów w białku trimerycznej czapeczki Rrp4 w sąsiedztwie wejścia do kanału skutkowały efektem letalnym.^[43,50] Ponadto zablokowanie kanału poprzez substytucje zachowanych ewolucyjnie zasadowych aminokwasów w białku Rrp41 na aminokwasy kwaśne powodowało obniżenie aktywności 10-składnikowego egzozomu, co korelowało z brakiem protekcji RNA w porównaniu z kompleksem niezawierającym tego typu mutacji.^[50] Zauważyliśmy jednak, że nie istniały żadne dane, które potwierdzałyby istnienie ścieżki wiodącej substraty do centrum aktywnego domeny RNB białka Dis3 poprzez centralny kanał pierścienia, zwłaszcza że wyniki badań strukturalnych nie wykluczały istnienia ścieżek alternatywnych. Nie wykazano również, czy kanał może odgrywać jakąkolwiek rolę w regulacji aktywności endorybonukleolitycznej domeny PIN, choć wydawało się to wątpliwe ze względu na fakt, że na podstawie dostępnych struktur stwierdzono, że centrum aktywne tej domeny skierowane jest nie do wnętrza kanału, lecz w stronę rozpuszczalnika.^[43,49,50] Z tych względów podjęliśmy próbę scharakteryzowania funkcji centralnego kanału pierścienia egzozomu w regulacji obu aktywności nukleolitycznych białka Dis3. Wyniki badań *in vivo* oraz wykonanych przeze mnie komplementarnych analiz biochemicznych rekonstruowanych wariantów egzozomu zaprezentowano w publikacji **4.B.vi.**^[44]

Aby ustalić znaczenie centralnego kanału pierścienia egzozomu dla fizjologii drożdży skonstruowany został szczep z substytucjami 4 zasadowych aminokwasów w białku Rrp41 skierowanych do wnętrza kanału (Rrp41^{4M}), które w układzie *in vitro* powodowały zanik protekcji RNA przez egzozom i obniżały jego aktywność egzorybonukleolityczną.^[44,50] Mutacje te hamowały wzrost drożdży w podwyższonej temperaturze i były syntetycznie letalne z delecją *RRP6*. Wyniki te sugerowały istnienie pewnej redundancji pomiędzy aktywnością Rrp6 i obecnością funkcjonalnego kanału. Syntetycznych interakcji nie zaobserwowaliśmy natomiast w przypadku połączenia mutacji Rrp41^{4M} i substytucji aminokwasów powodujących zniesienie aktywności endorybonukleolitycznej (D171N – endo-) lub egzorybonukleolitycznej (D551N – exo-) białka Dis3, co wskazywało, że kanał oraz aktywności nukleolityczne Dis3 uczestniczą w tej samej ścieżce degradacji. Analizy fenotypów molekularnych dowiodły, że upośledzenie funkcji kanału poprzez mutację Rrp41^{4M} skutkuje akumulacją różnych jądrowych substratów egzozomu, takich jak 7S rRNA, 5'-ETS i NEL025 CUT, co potwierdzało przypuszczenia o udziale kanału w rekrutowaniu substratów RNA. Obserwowane zmiany w poziomie badanych transkryptów nie były tak silne, jak w przypadku mutacji Dis3^{exo-} – wskazywało to, że mutacja Rrp41^{4M} ma charakter hipomorficzny. Zgodnie z wynikami fenotypów wzrostowych efekty mutacji Rrp41^{4M} oraz Dis3^{exo-} na poziomie molekularnym nie były addytywne. Badając znaczenie centralnego kanału dla procesów metabolizmu RNA zachodzących w cytoplazmie, w przypadku mutacji Rrp41^{4M} zauważyliśmy zahamowanie degradacji normalnych transkryptów, jak i obniżenie wydajności cytoplazmatycznych ścieżek kontroli jakości RNA przejawiające się w wydłużeniu czasu półtrwania odpowiednich transkryptów reporterowych. Co istotne, dotyczyło to także reportera mRNA pozbawionego kodonu terminacyjnego, degradowanego w ścieżce NSD (*ang. non-stop decay*), o której wiadomo, że jest zależna tylko od aktywności egzorybonukleolitycznej lub endorybonukleolitycznej białka Dis3. Sugerowało to, że centralny kanał pierścienia egzozomu – wbrew danym strukturalnym – może uczestniczyć w jakimś stopniu w regulacji tej drugiej aktywności. Warto podkreślić, że w odróżnieniu od efektu wywieranego na substraty jądrowe, na reporter NSD mutacja Rrp41^{4M} wywierała efekt silniejszy niż

mutacje Dis3^{exo-} lub Dis3^{endo-}, a jej wprowadzenie przy jednoczesnym zniesieniu aktywności domeny RNB białka Dis3 skutkowało synergią.^[44]

Ponieważ opisane powyżej wyniki wskazywały, że kanał egzozomu wpływa na obie aktywności nukleolityczne Dis3, postanowiłem wykonać bardziej szczegółowe analizy *in vitro* z wykorzystaniem wariantów 10-składnikowego egzozomu *Chaetomium thermophilum* rekonstruowanych z rekombinowanych podjednostek. Użycie białek pochodzących z tego termofilnego workowca zamiast homologicznych białek *S. cerevisiae* umożliwiło uzyskanie dużych ilości kompleksu o wysokim stopniu czystości, co było ważne szczególnie w przypadku analizy aktywności endorybonukleolitycznej domeny PIN, która mogła być potencjalnie łatwo maskowana przez ewentualne kontaminacje. Badane warianty egzozomu różniły się funkcjonalnością kanału (Rrp41^{WT} lub Rrp41^{4M}) i obecnością różnych wersji białka Dis3 (Dis3^{WT}, Dis3^{exo-}, Dis3^{endo-}, Dis3^{exo-/endo-}) lub N-końcowego fragmentu tego białka zawierającego domenę PIN. Zablokowanie kanału powodowało silne zahamowanie degradacji egzorybonukleolitycznej, widoczne szczególnie dla substratu RNA zawierającego fragment dwuniciowy. Porównanie aktywności zrekonstruowanych egzozomów z samą domeną PIN lub białkiem Dis3 pełnej długości w wersji *exo-* doprowadziło natomiast do stwierdzenia, że funkcjonalny kanał stymuluje aktywność endorybonukleolityczną domeny PIN, która jest nieco niższa w obecności C-końcowego fragmentu Dis3, gdyż dochodzi wtedy do przekierowania substratu do miejsca aktywnego domeny RNB, które prawdopodobnie wykazuje wyższe powinowactwo do RNA.^[44]

W kolejnym cyklu eksperymentów podjęliśmy się wyjaśnienia przyczyny stwierdzonego we wcześniejszej publikacji (7.A.II.vii.) efektu letalności mutacji trzech zasadowych aminokwasów obecnych na powierzchni białka trimerycznej czapeczki – Rrp4 (Rrp4^{3M}), ulokowanych w pobliżu wejścia do centralnego kanału, które prawdopodobnie uczestniczą w rozpoznawaniu substratów.^[43] Wykorzystując preparaty egzozomów oczyszczone ze szczepów drożdży oraz kompleksy zrekonstruowane *in vitro*, ustaliliśmy, że mutacja Rrp4^{3M} obniża wydajność degradacji egzorybonukleolitycznej zależnej od domeny RNB białka Dis3, szczególnie w przypadku substratów o częściowej strukturze dwuniciowej. Kombinacja mutacji Rrp4^{3M} i Rrp41^{4M} powodowała synergiczną inhibicję aktywności domeny RNB, co wskazywało na fakt, że RNA może przechodzić przez centralny kanał pierścienia egzozomu zawierającego wariant Rrp4^{3M}. Ponieważ wydawało się, że obserwowany poziom zahamowania degradacji egzorybonukleolitycznej wynikający z obecności mutacji Rrp4^{3M} nie może odpowiadać za efekt letalny, zbadaliśmy inne molekularne efekty mutacji. Stwierdziliśmy jednak, że nie powoduje ona zmiany lokalizacji białka Rrp4 ani zaburzenia jego oddziaływania z jedynym niezbędnym jądrowym kofaktorem egzozomu – helikazą Mtr4. O ile powód letalności mutacji Rrp4^{3M} pozostaje nieznany, udało się potwierdzić, że podmienione aminokwasy uczestniczą w rekrutowaniu substratów RNA.^[44]

W podsumowaniu można stwierdzić, że centralny kanał pierścienia egzozomu uczestniczy w regulacji obu aktywności nukleolitycznych białka Dis3 zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. W przypadku aktywności endorybonukleolitycznej domeny PIN jest to o tyle zaskakujące, że dostępne dane strukturalne nie dostarczają poparcia dla istnienia ścieżki doprowadzającej substraty do centrum katalitycznego domeny PIN, która wiodłaby przez kanał.

Cel szczegółowy 4.: Charakterystyka biochemiczna i funkcjonalna podjednostek katalitycznych ludzkiego egzozomu.

Badania biochemiczne aktywności egzozomu *H. sapiens*, towarzyszące rozwiązaniu struktury krystalicznej kompleksu rekonstruowanego *in vitro*, sugerowały początkowo, że w odróżnieniu od egzozomu drożdżowego wykazuje on aktywność fosforolityczną, którą przypisano podjednostce pierścienia hRRP41.^[32] Okazało się jednak, że obserwowana aktywność wynika z obecności śladowego zanieczyszczenia preparatu bakteryjną PNPazą.^[35] W związku z tym pojawiło się pytanie: które białko jest podjednostką katalityczną ludzkiego egzozomu? Naturalnymi kandydatami na pełnienie tej funkcji były ortologi drożdżowego białka Dis3. Ich udział w strukturze egzozomu *H. sapiens* poddawano jednak dość długo w wątpliwość, gdyż nie stwierdzano ich obecności w preparatach endogenego kompleksu izolowanego z ludzkich komórek.^[51] Mimo to wykazano, że nadprodukcja jednego z tych białek umożliwia komplementację temperaturowrażliwej mutacji w genie kodującym białko Dis3 *S. cerevisiae*, która w znacznym stopniu upośledza wzrost drożdży w temperaturze restrykcyjnej – sugerowało to istnienie pewnej analogii funkcjonalnej między białkiem ludzkim i drożdżowym.^[52] W obliczu tych danych podjąłem się (jako kierownik i główny wykonawca

pozyskanego samodzielnie grantu własnego MNiSW) przeprowadzenia szczegółowej charakterystyki biochemicznej i funkcjonalnej ludzkich homologów drożdżowego białka Dis3. Wyniki badań wykonanych częściowo we współpracy z laboratorium kierowanym przez prof. Torbena Heicka Jensena (Uniwersytet w Aarhus), zostały przedstawione w publikacji **4.B.iv.**^[53], której byłem pierwszym autorem.

Przed opublikowaniem sekwencji genomu ludzkiego został zidentyfikowany tylko jeden ortolog drożdżowego białka Dis3 nazywany hDIS3.^[52,54] Przeprowadzone przez nas analizy typu PSI-BLAST wykazały jednak, że nie jest to jedyne białko wykazujące homologię w stosunku do drożdżowego Dis3. Szczegółowa analiza *in silico* wykazała, że u wyższych *Eukaryota* spośród wszystkich białek zawierających obszary homologiczne do Dis3 dwa ortologi: hDIS3 (43% identyczności sekwencji względem Dis3) oraz hDIS3L (33% identyczności względem Dis3), zawierają wszystkie domeny typowe dla tego białka: domenę PIN, trzy domeny o typie zwinienia OB, domenę RNB oraz bardzo silnie zachowany w ewolucji dziewięcioaminokwasowy motyw o nieznanym zwinieniu obecny na N-końcu białka. Z sytuacją współistnienia dwóch genów kodujących homologi Dis3 mamy do czynienia we wszystkich całkowicie zsekwencjonowanych genomach kręgowców, co wskazuje, że w trakcie ewolucji doszło do przynajmniej jednej duplikacji genu *DIS3*.^[53]

Na podstawie analizy sekwencji stwierdziliśmy, że oba ludzkie białka: hDIS3 oraz hDIS3L zawierają wszystkie aminokwasy koordynujące jony dwuwartościowe niezbędne do aktywności egzonukleolitycznej domen RNB, co sugerowało, że są one aktywne enzymatycznie. W przypadku N-końcowej domeny PIN odpowiedzialnej za aktywność endonukleolityczną zauważyliśmy, że jedynie białko hDIS3 posiada wszystkie aminokwasy niezbędne do katalizy. W doświadczeniu opartym na komplementacji w szczepie drożdży, w którym endogenna wersja *DIS3* znajdowała się pod kontrolą promotora regulowanego pochodnymi tetracykliny zaobserwowaliśmy, że jedynie hDIS3 wykazuje zdolność częściowej komplementacji defektu wzrostowego wynikającego z obniżenia poziomu ekspresji drożdżowego *DIS3*. Obserwacje te sugerowały możliwość istnienia pewnych różnic we właściwościach biochemicznych i funkcjach ludzkich białek hDIS3 i hDIS3L.^[53]

Aby zbadać oddziaływanie białek hDIS3 i hDIS3L z resztą rdzenia ludzkiego egzozomu, zastosowaliśmy technikę koimmunoprecypitacji wspomaganą użyciem aminokwasów znakowanych ciężkimi izotopami w hodowli komórkowej (*ang.* SILAC – *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*). Wykorzystaliśmy również skonstruowane przez nas stabilne linie komórkowe pochodne HEK293 Flp-In T-REx, wyrażające w sposób indukowany białko hDIS3, hDIS3L lub podjednostkę pierścienia – hRRP41 ze znacznikiem FLAG na C-końcu. Wykonane przy pomocy spektrometrii mas analizy eluatów ze złoża anty-FLAG doprowadziły do stwierdzenia, że zarówno hDIS3, jak i hDIS3L wchodzi w skład rdzenia egzozomu, przy czym oddziaływanie ma charakter wzajemnie wykluczający się, a hDIS3L oddziałuje z pierścieniem silniej niż hDIS3 – w przypadku tego drugiego interakcję można zaobserwować, jeśli podczas oczyszczania zastosuje się mniej restrykcyjne warunki.^[53]

Następnie zbadaliśmy lokalizację wewnątrzkomórkową białek hDIS3 i hDIS3L z wykorzystaniem techniki immunofluorescencji oraz frakcjonowania komórek w połączeniu z analizą frakcji metodą western-blot, przy jednoczesnym użyciu przeciwciał rozpoznających białka będące markerami odpowiednich przedziałów wewnątrzkomórkowych. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdziliśmy, że hDIS3 lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym (z wyłączeniem rejonów jąderek), natomiast hDIS3L zlokalizowane jest wyłącznie w cytoplazmie ludzkich komórek. Ponadto wykonaliśmy analogiczne analizy dla innej podjednostki katalitycznej ludzkiego egzozomu – białka hRRP6 – wykazaliśmy, że akumuluje się ono w jąderkach, natomiast w odróżnieniu od homologa w drożdżach pewna jego frakcja występuje również w cytoplazmie.^[53]

Aby stwierdzić, jaki udział w metabolizmie RNA mają ludzkie homologi białek Dis3 i Rrp6, przeprowadziliśmy wyciszenie ekspresji genów kodujących te białka przy pomocy interferencji RNA. Analiza poziomu niekodujących jądrowych transkryptów PROMPT (*ang.* *promoter-upstream transcripts*) metodą PCR w czasie rzeczywistym oraz obróbki rybosomalnego RNA 5.8S z wykorzystaniem techniki hybrydyzacyjnej northern wykazała, że obniżenie poziomu hDIS3 i hRRP6 (ale nie hDIS3L) powoduje akumulację PROMPT oraz prekursorów 5.8S rRNA, przy czym fenotypy te są wzmacniane w wyniku jednoczesnego wyciszenia ekspresji *hDIS3* i *hRRP6*. Z kolei w następstwie obniżenia poziomu hDIS3L następowała stabilizacja

cytoplazmatycznych mRNA *c-FOS* i *c-MYC*. Uzyskane wyniki były zgodne z obserwowaną lokalizacją wewnątrzkomórkową podjednostek katalitycznych ludzkiego egzosomu.^[53]

Ostatnim etapem badań, który wykonałem całkowicie samodzielnie, były szczegółowe oznaczenia biochemiczne przeprowadzone z wykorzystaniem białek hDIS3 i hDIS3L oczyszczonych ze stabilnych linii komórkowych z epitopem w postaci białka A, dla substratów RNA znakowanych w różny sposób. Doprowadziły one do stwierdzenia, że oba białka wykazują procesywną aktywność egzorybonukleolityczną w kierunku 3'-5', zależną od domeny RNB, analogicznie jak w przypadku drożdżowego białka Dis3. Jeśli chodzi o aktywność endorybonukleolityczną, zaobserwowałem ją jedynie podczas analiz białka hDIS3; jej brak w przypadku hDIS3L był zgodny z substytucjami krytycznych kwaśnych aminokwasów w domenie PIN tego białka, stwierdzonymi wcześniej w analizach *in silico*.^[53]

Podsumowując, połączenie wyników uzyskanych przy użyciu rozmaitych technik pozwoliło nam wnioskować, że w ludzkich komórkach doszło w toku ewolucji do rozdzielenia różnych funkcji w metabolizmie RNA pomiędzy wyspecjalizowane formy egzosomu, zawierające inny zestaw podjednostek katalitycznych i charakteryzujące się odmienną lokalizacją wewnątrzkomórkową, aktywnościami biochemicznymi oraz specyficzną substratową.

Publikacja **4.B.iv.**^[53] zawierająca omówione wyżej wyniki została nagrodzona przez Radę Naukową IBB PAN. Poświęcono jej także komentarz w sekcji czasopisma *EMBO Journal* zatytułowanej "Have You seen...?", wyróżniającej najważniejsze publikacje danego wydania (2010; **29**, 2260 – 2261; María-Eugenia Gas i Bertrand Séraphin: "Twins take the job").^[55]

W publikacji przeglądowej **4.B.v.**^[56], stanowiącej swego rodzaju autokomentarz do wyników oryginalnych opublikowanych w pracy **4.B.iv.**^[53], zwróciliśmy uwagę na fakt, że formy kompleksu egzosomu występujące u różnych grup organizmów eukariotycznych, mimo że oparte o to samo strukturalne rusztowanie, różnią się repertuarem związanych podjednostek katalitycznych i zaproponowaliśmy możliwe przyczyny takiego stanu rzeczy. Wynikają one naszym zdaniem z ewolucji kompleksu wymuszonej różnorodnością substratów RNA, w których metabolizm jest on zaangażowany. Wydaje się, że powiązanie pierścienia egzosomu z aktywnościami rybonukleolitycznymi o różnym charakterze jest korzystne z punktu widzenia pokonywania różnorodnych przeszkód podczas degradacji RNA, takich jak struktury drugorzędowe czy białka wiążące się z substratami – przemawia za tym również konieczność dodatkowych interakcji egzosomu z kompleksami wspomagającymi, zawierającymi enzymy o aktywności helikaz RNA czy polimeraz poli(A).^[56]

Chociaż możliwe jest, że podjednostki katalityczne egzosomu pełnią pewne funkcje niezależne od ich asocjacji z resztą rdzenia egzosomu wydaje się, że ich główne zadania są wykonywane w ramach działalności kompleksu. Ponieważ obróbka lub degradacja określonego typu substratu wymaga najczęściej współpracy dwóch lub większej liczby aktywności rybonukleolitycznych, w toku ewolucji prawdopodobnie korzystne stało się skoordynowanie tych aktywności – w obrębie jednego białka czy też kompleksu; w przypadku egzosomu obserwujemy przykłady wykorzystania obydwu tych strategii: centralny pierścień kompleksu oddziałuje z rybonukleazami różnego typu – RRP6 i DIS3, przy czym ta ostatnia zawiera domeny odpowiedzialne za aktywności egzorybonukleazy i endorybonukleazy. Jednocześnie utrzymywanie aktywności w oddzielnych podjednostkach zapewnia środki umożliwiające regulowania potencjału katalitycznego i innych właściwości kompleksu. Można przypuszczać, że w momencie zaistnienia oddziaływań pomiędzy hydrolitycznymi enzymami typu RRP6 i DIS3 z pierwotnym egzosomem eukariotycznym, aktywność fosforolityczna pierścienia kompleksu stała się zbędna, wskutek czego w miejscach aktywnych podjednostek homologicznych względem RNazy PH nagromadziły się mutacje prowadzące do zniesienia tej aktywności. Wydaje się zatem prawdopodobne, że 9-składnikowy pierścień egzosomu eukariotycznego uległ przekształceniu z aktywnej katalitycznie rybonukleazy w nieaktywne, ale niezbędne, rusztowanie zapewniające właściwą kooperację aktywności enzymatycznych oddziałujących z nim rybonukleaz hydrolitycznych. Ponadto wspólna ewolucja egzosomu i jego substratów mogła stworzyć rolę dla centralnego kanału pierścienia, jaką jest dostarczanie cząsteczek RNA do domeny egzozonukleolitycznej białka Dis3.^[56]

Różnorodność podjednostek katalitycznych oddziałujących z pierścieniem egzosomu u różnych grup organizmów eukariotycznych (przykładowo u roślin występuje jedno białko homologiczne względem Dis3, zawierające domenę PIN oraz 3 białka podobne do Rrp6) wynika prawdopodobnie z różnych wymagań

dyktowanych przez złożoność odpowiednich transkryptomów. Zróżnicowanie wariantów egzozomu pod względem potencjału katalitycznego dotyczy w szczególności różnych przedziałów wewnątrzkomórkowych. Dlaczego stworzenie odmian kompleksu o różnym składzie i lokalizacji komórkowej było korzystne dla różnych eukariontów? Wydaje się nam, że jest to sposób na kontrolę stężenia funkcjonalnego egzozomu w określonym przedziale subkomórkowym przy jednoczesnym precyzyjnym dostrojeniu jego potencjału katalitycznego, jaki potrzebny jest w danej lokalizacji. Biorąc pod uwagę liczbę procesów związanych z metabolizmem RNA kontrolowanych przez egzozom, które różnią się intensywnością w czasie, korzystne było rozdzielenie jego funkcji pomiędzy konkretne formy umiejscowione w poszczególnych kompartmentach, zamiast losowego rozmieszczenia kompleksów o tym samym składzie w całej komórce. Przykładowo większy stopień ustrukturyzowania substratów RNA w jądrze ludzkich komórek narzucił prawdopodobnie wymóg zachowania aktywności endonukleolitycznej domeny PIN białka hDIS3, która w trakcie ewolucji okazała się zbędna w przypadku białka hDIS3L, będącego główną podjednostką katalityczną egzozomu cytoplazmatycznego.^[56]

Cel szczegółowy 5.: Wyjaśnienie wpływu mutacji w genie *hDIS3*, znajdujących u chorych na szpiczaka mnogiego, na metabolizm RNA.

Rozregulowanie ekspresji informacji genetycznej jest jednym z typowych zjawisk związanych z transformacją nowotworową. W ostatnich latach obserwujemy wzrost liczby doniesień sugerujących, że zaburzenia regulacji etapów posttranskrypcyjnych mają niebagatelne znaczenie dla kancerogenezy.^[57-59] Dotyczą one nie tylko transkryptów kodowanych przez onkogeny oraz odpowiadających supresorom nowotworów, ale również coraz liczniejszej klasy niekodujących RNA, które mogą wpływać zarówno na stabilność innych transkryptów, jak i regulować wydajność translacji mRNA.^[60,61] Zmiany zachodzące na poziomie transkryptomu są często wynikiem zaburzonej ekspresji lub aktywności białek kontrolujących metabolizm RNA.

W przypadku badanego przez nas kompleksu egzozomu stwierdzono między innymi dodatnią korelację pomiędzy zapaleniem wielomięśniowym/sklerodermią (schorzenie autoimmunologiczne charakteryzujące się podwyższonym poziomem przeciwciał rozpoznających podjednostki egzozomu) a częstością występowania nowotworów.^[62-64] Ponadto jeden ze składników egzozomu – białko hRRP46, które zostało zidentyfikowane jako autoantygen w przewlekłej białaczce szpikowej, jest silnie nadprodukowane w liniach komórek nowotworów hematopoetycznych i nabłonkowych.^[65]

Jeśli chodzi o główną podjednostkę katalityczną ludzkiego egzozomu – białko hDIS3 – jego nadprodukcję zaobserwowano w ludzkich komórkach raka jelita grubego oraz w mysim modelu tego nowotworu, gdzie podwyższony poziom tego białka jest dodatnio skorelowany z częstością przerzutowania.^[54,66] Analiza profili ekspresji genów ujawniła, że *hDIS3* jest jednym spośród genów, w przypadku których utrata funkcji znacząco obniża przeżywalność linii komórek raka jelita grubego.^[67] Ponadto podwyższony poziom mRNA *hDIS3* został zdefiniowany jako jedna z cech charakterystycznych dla nabłonkowego raka jajnika.^[68] Na istotną rolę produktu genu *hDIS3* w nowotworzeniu wskazują również ostatnie badania z zakresu genomiki funkcjonalnej. Jest to między innymi jeden z genów, którego ekspresja różnicuje czerniaka szerzącego się powierzchniowo od czerniaka guzkowego.^[69] Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie pozwoliło również stwierdzić obecność mutacji w genie kodującym białko hDIS3 (w tym mutacji prowadzącej do zamiany ściśle zachowanej reszty kwasu asparaginowego w centrum aktywnym domeny RNB, a więc powodującej bezpośrednio utratę aktywności egzozonukleolitycznej) w przypadku rdzeniaka zarodkowego oraz ostrych białaczek szpikowych.^[70,71] Ponadto wyniki przeprowadzonego niedawno sekwencjonowania genomów 38 pacjentów ze szpiczakiem mnogim (*ang.* multiple myeloma; MM) ujawniły stosunkowo dużą (~10%) częstość mutacji genu *hDIS3*, z których wszystkie lokowały się w obrębie sekwencji odpowiadającej domenie RNB białka, ściśle związanej z aktywnością egzozonukleolityczną.^[72] Mutacje te miały charakter homo- lub hemizygotyczny, a wysoka częstość ich występowania u chorych na MM została potwierdzona w innych analizach wysokoprzepustowych.^[73-75] Wszystkie wspomniane przykłady sugerują istnienie molekularnego związku pomiędzy funkcjami białka hDIS3 i rozwojem nowotworów. Wydaje się również, że szczególną rolę w tym powiązaniu może odgrywać aktywność egzozonukleolityczna tego białka.

Ze względu na dużą częstotliwość mutacji w genie *hDIS3* u chorych na MM wydaje się, że mogą one być związane z patogenezą tego nowotworu, której podłoże molekularne pozostaje w znacznym stopniu nieznane. W związku z tym postanowiliśmy przyjrzeć się bliżej konsekwencjom tych mutacji dla ludzkich komórek, a w szczególności wpływowi, jakie wywierają one na różne aspekty metabolizmu RNA. Wyniki przeprowadzonych przez nas analiz biochemicznych, genetycznych i funkcjonalnych zaprezentowane zostały w publikacji **4.B.vii.**^[76], której byłem pierwszym autorem i równorzędnym autorem korespondującym.

Jak już wspomniano, większość mutacji w genie *hDIS3* znalezionych u chorych na MM (S477R, V504G, A524P, G766R, R780K i I845V) dotyczyła zachowanych ewolucyjnie reszt aminokwasowych w domenie RNB, co sugerowało, że mogą one wpływać na aktywność egzorybonukleolityczną enzymu.^[72] Dla porównania żadna z mutacji nie lokalizowała się w domenie PIN, całkowicie odpowiedzialnej za aktywność endorybonukleolityczną. Aby zbadać wpływ tych mutacji na aktywność egzorybonukleolityczną *hDIS3* oczyszciliśmy rekombinowane warianty białka po nadprodukcji w *E. coli*, z wyjątkiem *hDIS3*^{A524P}, które okazało się nierozpuszczalne. Następnie wykonałem szereg oznaczeń biochemicznych z wykorzystaniem różnych substratów RNA w obecności kontroli, które stanowiły białka: *hDIS3*^{WT} (posiadające nienaruszoną domenę RNB) i *hDIS3*^{RNB MUT} (z mutacją D487N, o której na podstawie wyników opisanych w publikacji **4.B.iv.** wiedzieliśmy, że całkowicie znosi aktywność egzorybonukleolityczną *hDIS3*). Zauważyłem, że o ile potencjał degradacyjny wariantów *hDIS3*^{V504G} i *hDIS3*^{I845V} był praktycznie niezmienny względem *hDIS3*^{WT}, o tyle aktywność białek *hDIS3*^{S477R}, *hDIS3*^{G766R} oraz *hDIS3*^{R780K} była znacząco niższa – w przypadku tej ostatniej wersji efekt był porównywalny do obserwowanego dla białka *hDIS3*^{RNB MUT}. Bardziej precyzyjne analizy jakościowe ujawniły, że mutacja R780K skutkuje prawie całkowitą inhibicją degradacji jednoniciowych RNA, natomiast mutacje S477R i G766R powodują nieco łagodniejsze defekty, przejawiające się zmianą względnego poziomu końcowych produktów degradacji o długości 4 i 5 nukleotydów. Ponadto w przypadku wariantu *hDIS3*^{G766R} dla jednego z substratów zaobserwowałem utratę procesywności. Podczas badania degradacji substratów o częściowej strukturze dwuniciowej stwierdziłem, że aktywność wariantów *hDIS3*^{S477R}, *hDIS3*^{G766R} oraz *hDIS3*^{R780K} ulega silnemu obniżeniu w momencie napotkania fragmentu dwuniciowego, chociaż w porównaniu z białkiem *hDIS3*^{RNB MUT} degradacja tego typu substratów nie była całkowicie zahamowana. Wszystkie powyższe wyniki silnie sugerowały, że substytucje S477R, G766R i R780K powodują znaczące zaburzenia aktywności egzorybonukleolitycznej białka *hDIS3*, podczas gdy mutacje V504G i I845V wywierają nieco subtelniejsze skutki. Obserwowane siły fenotypów poszczególnych mutacji były w dużej mierze zgodne z przewidywanym na podstawie analiz *in silico*, dostępnych danych strukturalnych i wcześniejszych doniesień literaturowych możliwym znaczeniem konkretnych aminokwasów dla regulacji aktywności enzymatycznej domeny RNB.^[76]

Ponieważ drożdże *S. cerevisiae* były dotąd najpowszechniej wykorzystywanym modelem do badania funkcji Dis3, rozpoczęliśmy analizy funkcjonalne mutacji związanych z MM poprzez skonstruowanie szczepów drożdży wyrażających różne wersje endogennego *DIS3* z równoważnymi mutacjami (z wyjątkiem odpowiednika substytucji aminokwasu I845, który nie jest zachowany u *S. cerevisiae*) – *dis3-G833R* (odpowiednik G766R u ludzi), *dis3-R847K* (R780K), *dis3-V568G* (V504G) oraz *dis3-A588P* (A524P). Na podstawie przeprowadzonych testów wzrostowych stwierdziliśmy, że szczepy *dis3-G833R* i *dis3-R847K* wykazują silny defekt wzrostowy nawet w temperaturze fizjologicznej. Pozostałe dwa szczepy: *dis3-V568G* oraz *dis3-A588P* rosły normalnie w 30°C, natomiast zaobserwowaliśmy efekt termowrażliwości – wzrost ulegał praktycznie całkowitemu zahamowaniu w podwyższonej temperaturze. Słabszy fenotyp wzrostowy odpowiednika mutacji V504G w porównaniu z odpowiednikami mutacji G766R i R780K był zgodny z wynikami testów biochemicznych.^[76]

W toku wcześniejszych badań wykazaliśmy, że mutacja *DIS3* D551N (odpowiednik D487N u ludzi), znosząca aktywność egzorybonukleolityczną białka drożdżowego jest syntetycznie letalna z delecją *RRP6* lub jednoczesnym zablokowaniem aktywności endorybonukleolitycznej domeny PIN białka Dis3.^[34,47] Dzięki połączeniu odpowiednich mutacji stwierdziliśmy, że o ile substytucje G833R i R847K w drożdżowym Dis3 są również syntetycznie letalne z inaktywacją domeny PIN, o tyle w przypadku ich kombinacji z delecją *RRP6* dochodzi jedynie do umiarkowanego synergicznego zahamowania wzrostu.^[76]

Jeśli chodzi o fenotypy molekularne, wszystkie badane mutacje *DIS3* powodowały podobną akumulację typowych substratów egzozomu: 5'-ETS i 7S rRNA (bez wpływu na poziom dojrzałego 5.8S rRNA). W przypadku produktów pośrednich degradacji tych transkryptów oraz NEL025 CUT obserwowaliśmy, że

mutacje G833R i R847K powodują nieco silniejszy wzrost ich poziomu w porównaniu z substytucjami V568G i A588P, co było w pełni zgodne z wynikami testów biochemicznych i wzrostowych. Wyniki uzyskane dla modelu drożdżowego sugerują, że zmiany reszt aminokwasowych w pozycjach białka Dis3 analogicznych do tych, których dotyczą mutacje znajdowane u chorych na MM, wpływają negatywnie na wzrost *S. cerevisiae* poprzez upośledzenie zdolności egzozomu do egzorybonukleolitycznej degradacji fizjologicznych substratów kompleksu.^[76]

U kręgowców, inaczej niż u drożdży, fizjologiczna rola DIS3 i potencjalna redundancja jego funkcji z innymi rybonukleazami związanymi z egzozomem – RRP6 i DIS3L, nie została dotąd dokładnie zbadana. Doświadczenia wykonane przez nas w trakcie realizacji badań do publikacji **4.B.iv.** z wykorzystaniem interferencji RNA w ludzkich komórkach wykazały, że deplecja hDIS3 nie wywiera silnego wpływu na tempo wzrostu komórek, a obserwowane fenotypy molekularne były w tym przypadku stosunkowo łagodne.^[53] W celu oceny rzeczywistego znaczenia DIS3 dla fizjologii komórek kręgowców skonstruowaliśmy warunkowy nokaut genu kodującego to białko w kurzych komórkach DT40, charakteryzujących się wysokim poziomem rekombinacji homologicznej. Warunkowy charakter delekcji został osiągnięty dzięki integracji konstruktów delecyjnych obejmujących kasetę wyrażającą cDNA dla hDIS3, otoczoną miejscami *loxP* i wykorzystaniu pochodnej linii DT40 zdolnej do produkcji rekombinazy Cre pod wpływem indukcji przy pomocy 4-hydroksytamoksyfenu (4-HT). Po dwóch rundach integracji otrzymaliśmy linie, w których znacząca część genu *DIS3* została usunięta, a kasetka zawierająca cDNA dla hDIS3 ulegała ekspresji. Zmodyfikowane w ten sposób linie hetero- i homozygotyczne z delecją *DIS3* były następnie traktowane 4-HT, który spowodował wycięcie kaset wyrażających hDIS3 przy pomocy rekombinazy Cre. Próby selekcji klonów z wyciętymi kasetami powiodły się jedynie w przypadku nokautu *DIS3* w linii heterozygotycznej, ale nie homozygotycznej. Wyniki te wskazywały, że gen *DIS3* jest niezbędny dla przeżycia komórek linii DT40, a jego funkcje nie mogą zostać zastąpione przez białka DIS3L i RRP6.^[76]

W kolejnych doświadczeniach postanowiliśmy zbadać wpływ mutacji w *hDIS3* znajdujących u chorych na MM z wykorzystaniem odpowiedniego ludzkiego modelu komórkowego. Najbardziej właściwym byłoby zastosowanie stabilnych linii komórkowych wyprowadzonych ze szpiczaka mnogiego, które wyrażałyby zmutowane warianty hDIS3 analizowane w poprzednich eksperymentach, jednak żadna z komercyjnie dostępnych linii nie zawierała badanego genu z odpowiednią mutacją. W związku z tym skonstruowaliśmy alternatywny model, który umożliwiałby zdefiniowanie wpływu mutacji w *hDIS3* na stan fizjologiczny i metabolizm RNA w ludzkich komórkach. Nasz system eksperymentalny opierał się na wykorzystaniu linii komórkowej HEK293 Flp-In T-REx (Invitrogen), do genomu których integrowane były konstrukty wyrażające równocześnie sh-miRNA wyciszające ekspresję endogennego *hDIS3* (w połączeniu z sekwencją kodującą eGFP) oraz różne egzogenne wersje hDIS3 (WT, RNB MUT, G766R i R780K) ze znacznikiem FLAG na C-końcu, pod kontrolą dwukierunkowego promotora indukowanego pochodnymi tetracykliny. Wyniki analiz typu northern i PCR w czasie rzeczywistym dla próbek RNA wyizolowanych ze skonstruowanych linii komórkowych hodowanych w nieobecności doksycykliny lub poddanych indukcji pozwoliły stwierdzić, że produkcja zmutowanych wariantów hDIS3 prowadzi do akumulacji różnych substratów egzozomu, należących do rozmaitych klas, takich jak: wydłużony na końcu 3' prekursor obróbki 5.8S rRNA (przy czym fenotyp ten nie powodował zaburzeń biogenezy rybosomów czy formowania polisomów i nie ulegał wzmocnieniu wskutek wyciszenia ekspresji *hRRP6*), transkrypty syntetyzowane przez polimerazę III RNA – komponent RNowy RNazy P, 7SL RNA oraz różne dojrzałe tRNA i ich prekursory, a także produkty transkrypcji polimerazy II RNA – mRNA histonu H2A, U5 snRNA i niekodujące niestabilne transkrypty PROMPT. Co istotne, efekty molekularne obserwowane w przypadku produkcji wariantów hDIS3^{RNB MUT} i hDIS3^{R780K} były dla większości substratów egzozomu silniejsze niż dla wersji hDIS3^{G766R}. Korelowało to doskonale z wykazaniem w kolejnych doświadczeniach poziomem zahamowania wzrostu i obniżenia aktywności metabolicznej w liniach komórkowych wyrażających odpowiednie wersje hDIS3.^[76]

W ostatniej fazie badań sprawdziliśmy, czy w ludzkich komórkach, podobnie jak w modelu drożdżowym, występują syntetyczne interakcje pomiędzy związanymi z MM mutacjami w domenie RNB a dysfunkcją aktywności endorybonukleolitycznej domeny PIN białka hDIS3. W tym celu skonstruowaliśmy linie komórkowe analogiczne do opisanych powyżej, które wyrażały warianty hDIS3 z dodatkową mutacją D146N, znoszącą aktywność endorybonukleolityczną badanego białka. Obecność samej mutacji D146N nie powodowała zaburzenia wzrostu komórek, co sugerowało, że aktywność endorybonukleolityczna nie ma

istotnego znaczenia dla fizjologii komórek. W odróżnieniu, połączenie mutacji w centrum aktywnym domeny PIN z którąkolwiek z mutacji w domenie RNB silnie hamowało wzrost komórek i obniżało ich aktywność metaboliczną. Co ciekawe, na poziomie molekularnym nie zaobserwowaliśmy synergicznego efektu kombinacji tych mutacji w postaci zwiększenia poziomu prekursora 5.8S rRNA – sugerowało to, że transkrypt ten jest degradowany głównie przez aktywność egzorybonukleolityczną białka hDIS3. W przypadku produkcji podwójnych mutantów hDIS3^{D146N D487N}, hDIS3^{D146N G766R} i hDIS3^{D146N R780K} dochodziło natomiast do znacznie większej akumulacji cząsteczek RNA typu PROMPT i odpowiadających im transkryptów kodujących białka, w porównaniu z liniami wyrażającymi wersje hDIS3 z mutacjami tylko w obrębie domeny RNB – wskazywało to, że degradacja tych substratów zależy od współpracy obydwu aktywności nukleolitycznych białka hDIS3.^[76]

Sekwencja zdarzeń łączących zniesienie aktywności egzorybonukleolitycznej i wynikającej z tego utraty zdolności do wydajnej degradacji fizjologicznych substratów egzosomu z obniżoną przeżywalnością komórek wymaga dalszego wyjaśnienia. Obserwowane efekty fenotypowe mogą wydawać się sprzeczne z intuicją w kontekście patogenezy MM oraz innych typów nowotworów. Należy jednak brać pod uwagę możliwość, że zaburzenia funkcji enzymatycznej domeny RNB białka hDIS3 mogą prowadzić do transformacji nowotworowej jedynie w tle genetycznym specyficznym dla określonego typu komórek, które może różnić się od tego, które występuje w stosowanej z konieczności w naszych badaniach linii HEK293 Flp-In T-REx. Oczywiście wydaje się, że wyjaśnienie bezpośredniego udziału hDIS3 w onkogenezie wymaga stworzenia rzeczywistego komórkowego modelu fizjologicznego MM z mutacjami genu *hDIS3* zaburzającymi aktywność egzonukleazy. Mimo to nie ulega jednak żadnej wątpliwości, że stwierdzona przez nas syntetyczna interakcja pomiędzy związanymi z MM mutacjami w domenie RNB oraz dysfunkcją domeny PIN sugeruje możliwość wykorzystania tej ostatniej jako celu dla leku w terapiach nowotworów wynikających z zaburzenia aktywności egzonukleolitycznej białka hDIS3. Zjawisko syntetycznej letalności stało się ostatnio jedną z najbardziej obiecujących strategii rozwoju terapii przeciwnowotworowych, jako że umożliwia ona stosunkowo specyficzne oddziaływanie na komórki nowotworu, przy jednocześnie niskim wpływie na komórki, które nie uległy transformacji nowotworowej.^[77] Przykładowo komórki raka piersi z mutacjami w genach *BRCA1* i *BRCA2* są wrażliwe na inhibicję aktywności polimerazy poli[ADP-rybozy] (PARP1), podczas gdy obniżenie aktywności tego enzymu nie ma znaczącego wpływu na przeżycie i proliferację normalnych komórek z niezmiennymi genami *BRCA*.^[78,79] Związki wiodące oparte na inhibitorach PARP1 są obecnie analizowane w zaawansowanej fazie badań klinicznych.^[80] Ewentualna możliwość wykorzystania syntetycznej letalności mutacji w domenach RNB i PIN białka hDIS3 mogłaby być szczególnie wartościowa w przypadku MM – choroby nowotworowej, która pozostaje nieuleczalna. Struktura domeny PIN białka DIS3 została rozwiązana i opracowano oznaczenia biochemiczne służące do analizy jej aktywności endorybonukleolitycznej; powinno to ułatwić identyfikację inhibitorów domeny PIN w oparciu o klasyczną chemię medyczną lub wirtualne poszukiwanie związków wiodących.

Większość naszych odkryć zaprezentowanych w publikacji **4.B.vii**.^[76] stała się uprzednio przedmiotem zgłoszenia patentowego. Na podstawie dodatkowych eksperymentów przedstawionych w zgłoszeniu zaproponowaliśmy również, że potencjalnym kandydatem na inhibitor aktywności endonukleolitycznej domeny PIN może być pochodna związku 2-hydroksy-(4H)-isochinolino-1,3-dion (AC1LAHYL). W przypadku zidentyfikowania związku wydajnie hamującego aktywność endonukleazy planujemy rozpoczęcie procedur wdrożeniowych we współpracy z polską firmą OncoArendi Therapeutics Sp. z o.o.

Bibliografia (podkreślono publikacje z udziałem autora; prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego wyróżniono kolorem szarym)

1. Tomecki R, Drazkowska K i Dziembowski A (2010) Mechanisms of RNA degradation by the eukaryotic exosome. *ChemBiochem*, **11**, 938-945.
2. Lebreton A i Séraphin B (2008) Exosome-mediated quality control: substrate recruitment and molecular activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1779**, 558-565.
3. Schmid M i Jensen TH (2008) The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 501-510.
4. Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M i Tollervey D (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell*, **91**, 457-466.
5. Briggs MW, Burkard KT i Butler JS (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13255-13263.
6. Allmang C, Kufel J, Chanfreau G, Mitchell P, Petfalski E i Tollervey D (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.*, **18**, 5399-5410.

7. Meyer S, Temme C i Wahle E (2004) Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 197-216.
8. Parker R i Song H (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 121-127.
9. Mukherjee D, Gao M, O'Connor JP, Raijmakers R, Pruijn G, Lutz CS i Wilusz J (2002) The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.*, **21**, 165-174.
10. Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmüller D, Moroni C, Karin M i Chen CY (2004) A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol. Cell*, **14**, 571-583.
11. Orban TI i Izaurralde E (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*, **11**, 459-469.
12. Isken O i Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.*, **21**, 1833-1856.
13. Allmang C, Mitchell P, Petfalski E i Tollervey D (2000) Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1684-1691.
14. Gudipati RK, Xu Z, Lebreton A, Séraphin B, Steinmetz LM, Jacquier A i Libri D (2012) Extensive degradation of RNA precursors by the exosome in wild-type cells. *Mol. Cell*, **48**, 409-421.
15. Assenholt J, Mouaikel J, Andersen KR, Brodersen DE, Libri D i Jensen TH (2008) Exonucleolysis is required for nuclear mRNA quality control in yeast THO mutants. *RNA*, **14**, 2305-2313.
16. Kadaba S, Krueger A, Trice T, Krecic AM, Hinnebusch AG i Anderson J (2004) Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA_{Met} in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.*, **18**, 1227-1240.
17. Wang X, Jia H, Jankowsky E i Anderson JT (2008) Degradation of hypomodified tRNA_i^{Met} *in vivo* involves RNA-dependent ATPase activity of the DEXH helicase Mtr4p. *RNA*, **14**, 107-116.
18. Wyers F, Rougemaille M, Badis G, Rousselle JC, Dufour ME, Boulay J, Régnault B, Devaux F, Namane A, Séraphin B i wsp. (2005) Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell*, **121**, 725-737.
19. Preker P, Nielsen J, Kammler S, Lykke-Andersen S, Christensen MS, Mapendano CK, Schierup MH i Jensen TH (2008) RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science*, **322**, 1851-1854.
20. Camblong J, Iglesias N, Fickentscher C, Diepinois G i Stutz F (2007) Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell*, **131**, 706-717.
21. Symmons MF, Jones GH i Luisi BF (2000) A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation. *Structure*, **8**, 1215-1226.
22. Symmons MF, Williams MG, Luisi BF, Jones GH i Carpousis AJ (2002) Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 11-18.
23. Yehudai-Resheff S, Hirsh M i Schuster G (2001) Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 5408-5416.
24. Ishii R, Nureki O i Yokoyama S (2003) Crystal structure of the tRNA processing enzyme RNase PH from *Aquifex aeolicus*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 32397-32404.
25. Choi JM, Park EY, Kim JH, Chang SK i Cho Y (2004) Probing the functional importance of the hexameric ring structure of RNase PH. *J. Biol. Chem.*, **279**, 755-764.
26. Harlow LS, Kadziola A, Jensen KF i Larsen S (2004) Crystal structure of the phosphorolytic exoribonuclease RNase PH from *Bacillus subtilis* and implications for its quaternary structure and tRNA binding. *Protein Sci.*, **13**, 668-677.
27. Lorentzen E, Walter P, Fribourg S, Evguenieva-Hackenberg E, Klug G i Conti E (2005) The archaeal exosome core is a hexameric ring structure with three catalytic subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 575-581.
28. Büttner K, Wenig K i Hopfner KP (2005) Structural framework for the mechanism of archaeal exosomes in RNA processing. *Mol. Cell*, **20**, 461-471.
29. Lorentzen E i Conti E (2005) Structural basis of 3' end RNA recognition and exoribonucleolytic cleavage by an exosome RNase PH core. *Mol. Cell*, **20**, 473-481.
30. Lorentzen E, Dziembowski A, Lindner D, Seraphin B i Conti E (2007) RNA channelling by the archaeal exosome. *EMBO Rep.*, **8**, 470-476.
31. Navarro MV, Oliveira CC, Zanchin NI i Guimarães BG (2008) Insights into the mechanism of progressive RNA degradation by the archaeal exosome. *J. Biol. Chem.*, **283**, 14120-14131.
32. Liu Q, Greimann JC i Lima CD (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell*, **127**, 1223-1237.
33. Hernández H, Dziembowski A, Taverner T, Séraphin B i Robinson CV (2006) Subunit architecture of multimeric complexes isolated directly from cells. *EMBO Rep.*, **7**, 605-610.
34. Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E i Séraphin B (2007) A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 15-22.
35. Liu Q, Greimann JC i Lima CD (2006) Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome - erratum. *Cell*, **131**, 188-189.
36. Allmang C, Petfalski E, Podtelejnikov A, Mann M, Tollervey D i Mitchell P (1999) The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'→5' exonucleases. *Genes Dev.*, **13**, 2148-2158.
37. Lorentzen E, Basquin J, Tomecki R, Dziembowski A i Conti E (2008) Structure of the active subunit of the yeast exosome core. Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Mol. Cell*, **29**, 717-728.
38. Frazão C, McVey CE, Amblar M, Barbas A, Vornrhein C, Arraiano CM i Carrondo MA (2006) Unravelling the dynamics of RNA degradation by ribonuclease II and its RNA-bound complex. *Nature*, **443**, 110-114.
39. Zuo Y, Vincent HA, Zhang J, Wang Y, Deutscher MP i Malhotra A (2006) Structural basis for processivity and single-strand specificity of RNase II. *Mol. Cell*, **24**, 149-156.
40. Cannistraro VJ i Kennell D (1994) The processive reaction mechanism of ribonuclease II. *J. Mol. Biol.*, **243**, 930-943.

41. Cheng ZF i Deutscher MP. (2002) Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *J. Biol. Chem.*, **277**, 21624-21629.
42. Vincent HA i Deutscher MP (2006) Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J. Biol. Chem.*, **281**, 29769-29775.
43. Malet H, Topf M, Clare DK, Ebert J, Bonneau F, Basquin J, Drazkowska K, Tomecki R, Dziembowski A, Conti E i wsp. (2010) RNA channelling by the eukaryotic exosome. *EMBO Rep.*, **11**, 936-942.
44. Drazkowska K, Tomecki R, Stodus K, Kowalska K, Czarnocki-Cieciura M i Dziembowski A (2013) The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3845-3858.
45. Arcus VL, Bäckbro K, Roos A, Daniel EL i Baker EN (2004) Distant structural homology leads to the functional characterization of an archaeal PIN domain as an exonuclease. *J. Biol. Chem.*, **279**, 16471-16478.
46. Glavan F, Behm-Ansmant I, Izaurralde E i Conti E (2006) Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *EMBO J.*, **25**, 5117-5125.
47. Lebreton A, Tomecki R, Dziembowski A i Séraphin B (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature*, **456**, 993-997.
48. Wilusz J (2009) RNA stability: is it the endo' the world as we know it? *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 9-10.
49. Wang HW, Wang J, Ding F, Callahan K, Bratkowski MA, Butler JS, Nogales E i Ke A (2007) Architecture of the yeast Rrp44 exosome complex suggests routes of RNA recruitment for 3' end processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16844-16849.
50. Bonneau F, Basquin J, Ebert J, Lorentzen E i Conti E (2009) The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell*, **139**, 547-559.
51. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Rajmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M i Karin M (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, **107**, 451-464.
52. Shiomi T, Fukushima K, Suzuki N, Nakashima N, Noguchi E i Nishimoto T (1998) Human dis3p, which binds to either GTP- or GDP-Ran, complements *Saccharomyces cerevisiae* dis3. *J. Biochem.*, **123**, 883-890.
53. Tomecki R, Kristiansen MS, Lykke-Andersen S, Chlebowski A, Larsen KM, Szczesny RJ, Drazkowska K, Pastula A, Andersen JS, Stepien PP i wsp. (2010) The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J.*, **29**, 2342-2357.
54. Lim J, Kuroki T, Ozaki K, Kohsaki H, Yamori T, Tsuruo T, Nakamori S, Imaoka S, Endo M i Nakamura Y (1997) Isolation of murine and human homologues of the fission-yeast dis3+ gene encoding a mitotic-control protein and its overexpression in cancer cells with progressive phenotype. *Cancer Res.*, **57**, 921-925.
55. Gas ME i Séraphin B (2010) Twins take the job. *EMBO J.*, **29**, 2260-2261.
56. Lykke-Andersen S, Tomecki R, Jensen TH i Dziembowski A (2011) The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. *RNA Biol.*, **8**, 61-66.
57. Audic Y i Hartley RS (2004) Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol. Cell*, **96**, 479-498.
58. Scholzova E, Malik R, Sevcik J i Kleibl Z (2007) RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett.*, **246**, 12-23.
59. Benjamin D i Moroni C (2007) mRNA stability and cancer: an emerging link? *Expert Opin. Biol. Ther.*, **7**, 1515-1529.
60. Fabbri M i Calin GA (2010) Beyond genomics: interpreting the 93% of the human genome that does not encode proteins. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, **13**, 350-358.
61. Zhang C (2009) Novel functions for small RNA molecules. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **11**, 641-651.
62. Brouwer R, Pruijn GJ i van Venrooij WJ (2001) The human exosome: an autoantigenic complex of exoribonucleases in myositis and scleroderma. *Arthritis Res.*, **3**, 102-106.
63. Brouwer R, Vree Egberts WT, Hengstman GJ, Rajmakers R, van Engelen BG, Seelig HP, Renz M, Mierau R, Genth E, Pruijn GJ i wsp. (2002) Autoantibodies directed to novel components of the PM/ScI complex, the human exosome. *Arthritis Res.*, **4**, 134-138.
64. Rajmakers R, Renz M, Wiemann C, Egberts WV, Seelig HP, van Venrooij WJ i Pruijn GJ (2004) PM-ScI-75 is the main autoantigen in patients with the polymyositis/scleroderma overlap syndrome. *Arthritis Rheum.*, **50**, 565-569.
65. Yang XF, Wu CJ, Chen L, Alyea EP, Canning C, Kantoff P, Soiffer RJ, Dranoff G i Ritz J (2002) CML28 is a broadly immunogenic antigen, which is overexpressed in tumor cells. *Cancer Res.*, **62**, 5517-5522.
66. Liang L, Qu L i Ding Y (2007) Protein and mRNA characterization in human colorectal carcinoma cell lines with different metastatic potentials. *Cancer Invest.*, **25**, 427-434.
67. Camps J, Pitt JJ, Emons G, Hummon AB, Case CM, Grade M, Jones TL, Nguyen QT, Ghadimi BM, Beissbarth T i wsp. (2013) Genetic amplification of the NOTCH modulator LNX2 upregulates the WNT/ β -catenin pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.*, **73**, 2003-2013.
68. Pils D, Tong D, Hager G, Obermayr E, Aust S, Heinze G, Kohl M, Schuster E, Wolf A, Sehouli J i wsp. (2013) A combined blood based gene expression and plasma protein abundance signature for diagnosis of epithelial ovarian cancer – a study of the OVCAD consortium. *BMC Cancer*, **13**, 178.
69. Rose AE, Polisenio L, Wang J, Clark M, Pearlman A, Wang G, Vega Y Saenz de Miera EC, Medicherla R, Christos PJ i wsp. (2011) Integrative genomics identifies molecular alterations that challenge the linear model of melanoma progression. *Cancer Res.*, **71**, 2561-2571.
70. Parsons DW, Li M, Zhang X, Jones S, Leary RJ, Lin JC, Boca SM, Carter H, Samayoa J, Bettegowda C i wsp. (2011) The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science*, **331**, 435-439.
71. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD i wsp. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, **481**, 506-510.
72. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet JP, Ahmann GJ, Adli M i wsp. (2011) Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, **471**, 467-472.
73. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Hulkki S, Potter NE, Johnson DC, Fenwick K, Kozarewa I, Gonzalez D, Lord CJ i wsp. (2012) Intracлонаl heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. *Blood*, **120**, 1077-1086.

74. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES i Getz G (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* w druku, doi: 10.1038/nature12912.
75. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, Sougnez C, Knoechel B, Gould J, Saksena G i wsp. (2014) Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*, **25**, 91-101.
76. Tomecki R, Drazkowska K, Kucinski I, Stodus K, Szczesny RJ, Gruchota J, Owczarek EP, Kalisiak K i Dziembowski A (2014) Multiple myeloma-associated hDIS3 mutations cause perturbations in cellular RNA metabolism and suggest hDIS3 PIN domain as a potential drug target. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 1270-1290.
77. Porcelli L, Quatralo AE, Mantuano P, Silvestris N, Brunetti AE, Calvert H, Paradiso A i Azzariti A (2012) Synthetic lethality to overcome cancer drug resistance. *Curr. Med. Chem.*, **19**, 3858-3873.
78. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ i Helleday T (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, **434**, 913-917.
79. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C i wsp. (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, **434**, 917-921.
80. Barber LJ, Sandhu S, Chen L, Campbell J, Kozarewa I, Fenwick K, Assiotis I, Rodrigues DN, Filho JS, Moreno V i wsp. (2013) Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor. *J. Pathol.*, **229**, 422-429.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się już od okresu studiów magisterskich na różnych aspektach regulacji ekspresji genów u organizmów eukariotycznych.

Głównym zamierzeniem projektu mojej pracy magisterskiej, realizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Węgleńskiego, było potwierdzenie *in vivo* roli określonych sekwencji w promotorze genu *otaA* kodującego transaminazę ornitynową, związanego z katabolizmem argininy u *Aspergillus nidulans*, dla funkcjonowania białka ARCA – specyficznego aktywatora transkrypcji zawierającego palec cynkowy typu Zn₂Cys₆. W tym celu skonstruowałem i wykonałem analizę enzymatyczną szczepów *A. nidulans* posiadających delecje w regionie promotorowym tego genu przy równoczesnej obecności mutacji *arcA*^{d47}, zmieniającej białko ARCA w superaktywator niewymagający argininy do stymulowania transkrypcji genu *otaA*. Wcześniejsza analiza mutacyjna promotorów obu genów, których produkty białkowe uczestniczą w katabolizmie argininy (*agaA*, kodującego arginazę i *otaA*) pozwoliła na zidentyfikowanie w ich obrębie sekwencji związanych z regulacją ekspresji zależną od argininy. Obszar ten może stanowić jednocześnie potencjalne miejsce wiązania aktywatora ARCA, którego przypuszczalnym koinduktorem jest arginina. Poparciem dla tej hipotezy było wykazanie podobieństwa homologicznych regionów AnUAS_{arg} genu *otaA* oraz ABS genu *agaA* do sekwencji regulatorowych obecnych w promotorach genów kodujących arginazę (*CARI*) i transaminazę ornitynową (*CAR2*) u *S. cerevisiae*, podlegających regulacji za pośrednictwem kompleksu białkowego, którego jedną ze składowych stanowi białko należące do rodziny Zn₂Cys₆. Wykonane przeze mnie analizy fenotypowe i molekularne oraz wyniki oznaczeń biochemicznych aktywności arginazy i transaminazy ornitynowej w szczepach z delecjami w obrębie regionu AnUAS_{arg} genu *otaA*, w których dochodziło do produkcji superaktywatora ARCA^{d47} dostarczyły jednoznacznego poparcia dla hipotezy mówiącej o istotnym znaczeniu badanego fragmentu promotora dla prawidłowego funkcjonowania białka ARCA *in vivo*. Opracowane wyniki zostały włączone do pracy oryginalnej **7.A.I.i.**, opublikowanej w roku 2003.

W roku 2002 zostałem laureatem konkursu na stypendium doktoranckie w Studium Medycyny Molekularnej przy Akademii Medycznej w Warszawie i rozpocząłem studia doktoranckie na Wydziale Biologii pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra P. Stępnia, włączając się w badania dotyczące posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów w mitochondriach. W roku 2004 ukazała się praca przeglądowa **7.A.I.ii.**, której byłem współautorem. Podsumowaliśmy tam ówczesny stan wiedzy na temat regulacji metabolizmu mitochondrialnego RNA w komórkach drożdży *S. cerevisiae* i człowieka. Skoncentrowaliśmy się na szczegółach różniących systemy posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji w mitochondriach tych dwóch odległych ewolucyjnie gatunków eukariontów. Podkreśliliśmy również możliwe powiązania pomiędzy metabolizmem mitochondrialnego RNA a starzeniem komórkowym i programowaną śmiercią komórki. Końcowym wnioskiem naszych rozważań było stwierdzenie potrzeby identyfikacji genów jądrowych, których produkty białkowe uczestniczą w regulacji ekspresji genów w ludzkich mitochondriach.

Projekt realizowanej przez mnie rozprawy doktorskiej stanowił częściową próbę sprostania temu wyzwaniu, gdyż dotyczył identyfikacji ludzkiej mitochondrialnej polimerazy poli(A), a także wyjaśnienia fizjologicznej funkcji poliadenylacji w mitochondriach człowieka. Wiedza na temat regulacji ekspresji genów w ludzkich mitochondriach w momencie, kiedy rozpoczyznałem badania w ramach projektu pracy doktorskiej,

była bardzo ograniczona. Wiadomo było, że w procesach tych istotną rolę odgrywa prawdopodobnie w szczególności regulacja stabilności pierwotnych transkryptów. Poliadenylacja to zjawisko szeroko rozpowszechnione w świecie organizmów żywych, związane z degradacją RNA we wszystkich znanych systemach biologicznych. Funkcja poliadenylacji może być odmienna w zależności od grupy organizmów czy nawet przedziału komórkowego, w którym proces ten zachodzi. Synteza ogonów poli(A) na końcach 3' w jądrze komórkowym eukariontów może prowadzić do zwiększenia lub zmniejszenia stabilności transkryptów, zależnie od typu enzymu katalizującego reakcję. Poliadenylacja mRNA w cytoplazmie zwiększa ich stabilność i stymuluje translację. W przypadku prokariotów, chloroplastów oraz mitochondriów roślinnych poliadenylowane RNA są natomiast kierowane na ścieżkę egz nukleolitycznej degradacji.

Obecność ogonów poli(A) na końcach 3' ludzkich transkryptów mitochondrialnych została odkryta we wczesnych latach 70., jednak rzetelne zbadanie rzeczywistego wpływu poliadenylacji na metabolizm mitochondrialnych mRNA było w dużej mierze utrudnione ze względu na nieznaną rolę enzymu, odpowiedzialnego za przeprowadzanie tego procesu. Dokładne badanie sekwencji ogonów poli(A) usytuowanych na końcach 3' różnych transkryptów mitochondrialnych przeprowadzone w początkowym etapie moich studiów doktoranckich ujawniło, że składają się one prawie wyłącznie z nukleotydów adeninowych. Sugerowało to, że za ich syntezę odpowiada polimeraza poli(A), a nie inny enzym (na przykład hPAP, która znacznie częściej powoduje włączanie innych nukleotydów, tworząc ogony heteropolimerowe). Następnie zidentyfikowałem białko należące do odkrytej wówczas nowej rodziny polimeraz poli(A), które mogło być potencjalnym kandydatem na polimerazę poli(A) w mitochondriach człowieka. Posiadało ono wykrywaną z dużym prawdopodobieństwem przez różne algorytmy N-końcową sekwencję sygnałową kierującą do przedziału mitochondrialnego, a także domenę nukleotydylotransferazy oraz dwie domeny związane z aktywnością polimerazy poli(A).

Wykazałem, że gen kodujący przypuszczalną ludzką mitochondrialną polimerazę poli(A) (hmtPAP) jest wyrażany we wszystkich tkankach poddanych analizie, przy czym poziom jego ekspresji był najwyższy w tkankach o dużych zapotrzebowaniach energetycznych: sercu, mózgu i mięśniach szkieletowych. Następnie w celu potwierdzenia, że hmtPAP lokalizuje się w mitochondriach, przeprowadziłem eksperyment immunocytochemiczny na komórkach dwóch ssących linii komórkowych: małpiej Cos-1 i ludzkiej HeLa, transfekowanych konstruktem kodującym fuzję hmtPAP z epitopem c-myc na C-końcu. Analiza mikroskopowa ujawniła, że pozycja nadeksprymowanego białka fuzyjnego pokrywała się niemal idealnie z sygnałem pochodzącym od odczynnika MitoTracker CMX-Ros, specyficznego barwiącego mitochondria. Umożliwiło to stwierdzenie, że hmtPAP rzeczywiście lokalizuje się w przedziale mitochondrialnym.

Dalszą część badań wykonałem w dużej mierze we współpracy z laboratorium prof. Roberta N. Lightowlersa na Uniwersytecie w Newcastle upon Tyne w Wielkiej Brytanii w ramach stypendium FEBS. Aby zbadać funkcję hmtPAP *in vivo*, wykorzystałem technikę interferencji RNA. Stwierdziłem, że wyciszenie ekspresji hmtPAP za pośrednictwem cząsteczek siRNA prowadziło do znacznego zmniejszenia długości mitochondrialnych mRNA, a analiza sekwencji końców 3' tych transkryptów jednoznacznie dowiodła, że efekt ten wynika ze skrócenia ich ogonów poli(A). Tym samym wykazałem, że hmtPAP jest odpowiedzialna za proces poliadenylacji w ludzkich mitochondriach.

Zaobserwowałem także, że zahamowanie funkcji hmtPAP w komórce powoduje różnokierunkowe zmiany w poziomie wypadkowym niektórych ludzkich transkryptów mitochondrialnych. Wydawało się to potwierdzać, że poliadenylacja ma istotne znaczenie z punktu widzenia regulacji metabolizmu RNA w tym przedziale komórkowym, jednak nie można było na tej podstawie określić, czy obecność ogonów poli(A) stabilizuje mRNA, czy też przeciwnie – kieruje je na ścieżkę rybonukleolitycznej degradacji. Badania nad tempem degradacji oligoadenylowanych i poliadenylowanych transkryptów również nie dostarczyły jednoznacznych wyników – zauważono wprawdzie, że cząsteczki mRNA obdarzone krótkim ogonem oligo(A) zanikają szybciej niż transkrypty posiadające ogon poli(A), jednak może to być wynikiem nie tylko ich zwiększonej degradacji, ale również readenylacji ogonów oligo(A) aż do momentu przywrócenia pełnej długości ogona poli(A). Warto podkreślić, że mimo licznych prób zdefiniowania wpływu poliadenylacji na stabilność transkryptów w ludzkich mitochondriach, rzeczywiste znaczenie tego procesu dla regulacji ekspresji genów w mitochondriach pozostaje do chwili obecnej niewyjaśnione.

Podjąłem również próbę oczyszczenia potencjalnych białek oddziałujących z hmtPAP przy zastosowaniu tandemowej chromatografii powinowactwa. Udało mi się stwierdzić, że badane białko może funkcjonować w mitochondriach w formie homopolimeru.

Większość opisanych powyżej wyników została przedstawiona w pracach **7.A.I.iii.** oraz **7.A.I.iv.** opublikowanych w 2004 i 2006 roku. Pierwsza z tych dwóch publikacji została uhonorowana nagrodą Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. J.K. Parnasa oraz nagrodą Polskiego Towarzystwa Genetycznego I stopnia jako najlepsza praca wykonana w całości w polskim laboratorium w 2004 roku.

W trakcie studiów doktoranckich byłem również zaangażowany w projekty badawcze związane z innymi białkami uczestniczącymi w regulacji stabilności ludzkich transkryptów mitochondrialnych: fosforolityczną egzorybonukleazą hPNPazą (którą badałem głównie pod kątem właściwości biochemicznych jako stypendysta FEBS podczas stażu w laboratorium prof. Gadiego Schustera w Izraelskim Instytucie Technologii w Hajfie) oraz helikazą RNA/DNA hSUV3. Przyczyniłem się przede wszystkim do przeanalizowania wpływu wyciszenia ekspresji genów kodujących te białka przy pomocy interferencji RNA na metabolizm mitochondrialnych RNA. Wyniki swoich badań dotyczących hPNPazy i hSUV3 prezentowałem na prestiżowej konferencji EMBO w Szwajcarii w roku 2005.

Podczas analizy funkcji fizjologicznej hPNPazy pojawiły się doniesienia o korelacji pomiędzy podwyższonym poziomem mRNA hPNPazy a starzeniem komórkowym oraz zatrzymaniem wzrostu komórek czerniaka połączonym z indukcją apoptozy w następstwie ich traktowania przy pomocy interferonu β . W przeprowadzonych przez nas doświadczeniach potwierdziliśmy, że interferon β powoduje zwiększenie poziomu mRNA hPNPazy w liniach komórkowych czerniaka wyprowadzonych z guzów przerzutowych od pacjentów. Niestety, nie było to skorelowane ze wzrostem poziomu białka czy indukcją apoptozy w tych komórkach – wykluczało to praktycznie możliwość wykorzystania pomiarów zmian poziomu mRNA hPNPazy jako wskaźnika potencjału wrażliwości komórek czerniaka na traktowanie interferonem β . Zauważyliśmy natomiast, że indukcja ekspresji hPNPazy za pomocą interferonu β w kontrolnych liniach komórkowych Jurkat i HeLa powoduje skrócenie ogonów poli(A) na końcach 3' mitochondrialnego transkryptu ND3. Dostarczyło to silnej sugestii przemawiającej za udziałem hPNPazy w regulacji metabolizmu mitochondrialnego RNA poprzez kontrolowanie długości ogonów poli(A). Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w roku 2006 w pracy **7.A.I.v.**

W roku 2007, tuż po obronie rozprawy doktorskiej, która uzyskała wyróżnienie Rady Wydziału Biologii UW, rozpocząłem pracę w nowo tworzonej grupie badawczej dra Andrzeja Dziembowskiego. W swojej działalności naukowo-badawczej skoncentrowałem się na analizach biochemicznych i funkcjonalnych kompleksu egzozomu u eukariontów, co stanowiło kontynuację badań zapoczątkowywanych przez mojego opiekuna naukowego. Opublikowane w trakcie stażu podoktorskiego prace związane z tą tematyką stanowią podstawę do ubiegania się przeze mnie o stopień doktora habilitowanego i zostały opisane szczegółowo w punkcie 4. niniejszego autoreferatu. Uczestniczyłem również w badaniach powiązanych z analizą strukturalną eukariotycznego egzozomu. Owocem tych badań była publikacja **7.A.II.vii.**, w której we współpracy z laboratoriami prof. Eleny Conti (wówczas EMBL w Heidelbergu) i prof. Helen Saibil (Birkbeck College w Londynie) rozwiązałyśmy struktury 10-składnikowego egzozomu *S. cerevisiae* przy pomocy mikroskopii elektronowej opartej o barwienie negatywowe (*ang.* negative staining) oraz kriomikroskopii elektronowej. Warto wspomnieć, że w toku gromadzenia danych do tej pracy wykonałem doświadczenie, które po raz pierwszy wykazało rolę domeny PIN jako fragmentu białka Dis3 odpowiedzialnego za większość interakcji z resztą rdzenia egzozomu. Skonstruowałem szczep drożdży, w którym białko Dis3 opatrzone znacznikiem w postaci białka A na C-końcu zawierało sekwencję rozpoznawaną przez proteazę C3 (PreScission) pomiędzy N-końcową częścią obejmującą domenę PIN a resztą białka. Następnie kompleks egzozomu został oczyszczony z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa na złożu IgG-sefaroza i poddany trawieniu proteazą C3, bądź nie był nią traktowany. Ostatecznie obydwie próbki rozdzielono na kolumnie do sączenia molekularnego, po czym przeanalizowano zebrane frakcje w żelu SDS-PAGE. Okazało się, że o ile w przypadku egzozomu niepoddanego trawieniu proteazą C3 pełnej długości białko Dis3 współmigruje z pozostałymi podjednostkami rdzenia kompleksu, o tyle odtrawienie domeny PIN przy pomocy proteazy C3 powoduje oddysocjowanie rdzenia egzozomu od C-końcowego fragmentu Dis3. Wyniki tego eksperymentu przedstawiłem już podczas konferencji *RNA Society*, która odbyła się w Berlinie w lipcu 2008 roku, a więc przed ukazaniem się publikacji pochodzących z innych laboratoriów, które opisywały

oddziaływanie białka Dis3 z resztą rdzenia kompleksu za pośrednictwem domeny PIN. Znalazły one potwierdzenie w opublikowanych przez nas strukturach egzozomu. Ponadto rozwiązanie w analogiczny sposób struktur kompleksu w obecności substratu RNA znakowanego przy pomocy złota koloidalnego dostarczyło silnego poparcia dla istnienia ścieżki doprowadzającej substrat do centrum aktywnego domeny RNB białka Dis3, wiodącej przez centralny kanał pierścienia egzozomu. Wykazaliśmy również, że zachowane ewolucyjnie zasadowe aminokwasy na powierzchni białka Rrp4, wchodzącego w skład trimerycznej czapki na szczycie pierścienia, mają istotne znaczenie dla funkcjonowania egzozomu *in vivo*. Zagadnienia te zostały zbadane bardziej szczegółowo i opublikowane w pracy **4.B.vi.**, stanowiącej część osiągnięcia naukowego. Nasze odkrycia dotyczące związku pomiędzy strukturą egzozomu i regulacją jego aktywności nukleolitycznych przedyskutowaliśmy w pracy przeglądowej **7.A.II.viii.**, w kontekście dostępnych wtedy danych literaturowych dotyczących tej problematyki.

W trakcie badań, które doprowadziły do zidentyfikowania aktywności endonukleolitycznej domeny PIN białka Dis3 zainteresowałem się problematyką udziału endorybonukleaz w różnych zjawiskach związanych z metabolizmem RNA u eukariontów. Efektem tego zainteresowania była obszerna publikacja przeglądowa **7.A.II.vi.**, opisująca szczegółowo funkcje eukariotycznych enzymów wykazujących ten typ aktywności nukleolitycznej. Pierwsza część publikacji została poświęcona charakterystyce endorybonukleaz uczestniczących w ogólnych zjawiskach związanych z posttranskrypcyjną regulacją ekspresji genów, takich jak jądrowa degradacja RNA (Dis3, Swt1 – enzym biorący udział w kontroli jakości RNA w jądrze komórkowym), cytoplazmatyczna kontrola jakości RNA (Smg6 – endonukleaza stanowiąca efektor w jednej ze ścieżek NMD; Dom34 – enzym zaangażowany w procesy NGD i 18S NRD – *ang.* 18S nonfunctional rRNA decay), obróbka różnych klas RNA (CPSF-73 – składnik jednego z kompleksów biorących udział w reakcji cięcia i poliadenylacji mRNA; XendoU – obróbka snoRNA; Nob1 – ostatni etap dojrzewania 18S rRNA), interferencja RNA (Dicer, Ago2, C3PO), różne etapy obróbki i degradacji RNA w chloroplastach (RNaza E, RNaza J1, Csp41). W drugiej części pracy skoncentrowałem się na endorybonukleazach, które ujawniają swoją aktywność w specyficznych warunkach, zależnych od typu komórek, określonych segmentów sekwencji obecnych w substratach RNA, sygnałów zewnętrznych lub w warunkach stresowych, wpływając tylko na pewne subpopulacje wewnątrzkomórkowej puli transkryptów. W osobnych podrozdziałach opisałem mechanizmy działania, regulacji aktywności i funkcji takich białek jak IRE-1 (enzymu działającego w różnych etapach szlaku UPR – *ang.* unfolded protein response), PMR1 (nukleazy aktywującej degradację mRNA kodującego albuminę), Zc3h12a (endonukleazy uczestniczącej w ochronie przed chorobami układu immunologicznego), angiogeniny (członka rodziny białek podobnych do RNazy A, który indukuje degradację tRNA w cytoplazmie w warunkach stresowych) i APE1 (enzymu uczestniczącego w degradacji mRNA dla protoonkogenu *c-MYC*). Zwróciłem także uwagę na istnienie enzymów o aktywności endorybonukleolitycznej, które nie posiadają domen homologicznych względem znanych RNaz oraz na zachodzenie na terenie komórki zdarzeń endorybonukleolitycznych, w przypadku których enzymy za nie odpowiedzialne nie zostały dotąd zidentyfikowane. Publikacja **7.A.II.vi.** została uhonorowana nagrodą Rady Naukowej IBB PAN jako najlepsza praca przeglądowa opublikowana w roku 2010.

Podczas badań ludzkich ortologów drożdżowego białka Dis3 – hDIS3 i hDIS3L – zauważyliśmy, że w genomie człowieka znajduje się gen kodujący trzecie białko homologiczne względem bakteryjnych RNaz II/R, które nazwaliśmy hDIS3L2. Analizie jego funkcji zostały poświęcone niezależne badania, które zaowocowały opublikowaniem pracy **7.A.II.ix.** Część projektu była realizowana z wykorzystaniem środków finansowych przyznanych mi w ramach programu MNiSW „Juventus Plus”. Stwierdziliśmy, że N-końcowy fragment hDIS3L2 jest słabo zachowany ewolucyjnie i w odróżnieniu od hDIS3 oraz hDIS3L nie zawiera domeny PIN. Zgodnie z tą obserwacją w doświadczeniach opartych na koimmunoprecypitacji wykazaliśmy, że hDIS3L2 nie oddziałuje z pierścieniem egzozomu. Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem immunofluorescencji i technik mikroskopowych oraz frakcjonowania komórek w połączeniu z analizą western-blot doprowadziły do stwierdzenia, że białko hDIS3L2 lokalizuje się wyłącznie na terenie cytoplazmy. Wykonane w głównej mierze przeze mnie oznaczenia biochemiczne ujawniły, że hDIS3L2 wykazuje procesywną aktywność egzorybonukleolityczną w kierunku 3'-5', ściśle zależną od obecności niezmienionego aminokwasu D391 w obrębie domeny RNB, który jest niezbędny do koordynacji jonu magnezu w centrum aktywnym tej domeny. Co ciekawe, długość produktów końcowych degradacji była nieco mniejsza niż w przypadku hDIS3 i hDIS3L (3 nt zamiast 4-5 nt). Jeszcze bardziej interesującą

obserwacją było stwierdzenie, że aktywność egzorybonukleolityczna hDIS3L2 względem substratów o częściowej strukturze dwuniciowej jest mniej wrażliwa na długość jednoniciowego wydłużenia na końcu 3' jednej z nici – w odróżnieniu od hDIS3 i hDIS3L, hDIS3L2 posiada nawet zdolność do prowadzenia słabej degradacji „tępo” zakończonych substratów dwuniciowych. Sugeruje to, że miejsce aktywne domeny RNB białka hDIS3L2 może być zlokalizowane nieco płycej w strukturze enzymu w porównaniu z hDIS3 i hDIS3L. Możliwe również, że wydłużenie domeny CSD1 obecne w hDIS3L2 zwiększa jego zdolność do rozplatania struktur drugorzędowych, prawdopodobnie wskutek odmiennej niż hDIS3 i hDIS3L organizacji przestrzennej domen o typie zwinięcia OB. Warto także dodać, że z uwagi na nieobecność domeny PIN, białko hDIS3L2 nie posiada aktywności endorybonukleolitycznej.

Wyniki analiz funkcjonalnych białka hDIS3L2 *in vivo* świadczyły o tym, że oddziałuje ono w sposób zależny od RNA z cytoplazmatyczną egzorybonukleazą 5'-3' hXRN1 oraz, podobnie jak hXRN1, jest obecne na polisomach. Było to o tyle zaskakujące, że dotąd nie stwierdzano związku pomiędzy aktywnością egzorybonukleolityczną 3'-5' (z wyjątkiem deadenylaz) a procesem translacji. Wydaje się zatem, że aktywności enzymatyczne białek hXRN1 i hDIS3L2, działające w przeciwnych kierunkach, mogą współdziałać ze sobą w cytoplazmie podczas degradacji mRNA w trakcie translacji. Za ogólnym udziałem hDIS3L2 w regulacji metabolizmu transkryptów w cytoplazmie przemawiała również obserwacja, że deplecja hDIS3L2 z wykorzystaniem interferencji RNA prowadzi do zwiększenia liczby ciałek P (*ang.* P-bodies) – cytoplazmatycznych struktur granularnych gromadzących nadmiar mRNA nieulegających translacji. Fenotyp ten nieco różnił się od obserwowanego w przypadku zmniejszenia poziomu hXRN1, które powoduje raczej zwiększenie rozmiaru uprzednio istniejących ciałek P bez zwiększenia ich liczby. Wyciszenie ekspresji genów kodujących oba te enzymy skutkowało synergicznym fenotypem, natomiast deplecja hDIS3L – głównej podjednostki katalitycznej cytoplazmatycznej formy ludzkiego egzosomu – nie miała wpływu na rozmiar i liczbę ciałek P, także w przypadku jednoczesnego traktowania komórek siRNA specyficznymi względem hXRN1. Analiza czasu półtrwania reporterowego mRNA, zawierającego sekwencje ARE w 3'-UTR wykazała, że deplecja hDIS3L2 powoduje zwiększenie stabilności tego transkryptu, co stanowiło pierwszy bezpośredni dowód na udział aktywności egzorybonukleolitycznej tego białka w kontrolowaniu tempa degradacji mRNA w cytoplazmie. Aby ustalić względny udział hXRN1, hDIS3L2 i hDIS3L w metabolizmie cytoplazmatycznych RNA, wykonaliśmy globalne sekwencjonowanie próbek RNA uzyskanych z komórek poddanych interferencji RNA z wykorzystaniem specyficznych siRNA, stosowanych pojedynczo lub w kombinacjach. Analiza otrzymanych wyników, które zostały częściowo zweryfikowane przy pomocy PCR w czasie rzeczywistym, umożliwiła wyciągnięcie wniosku, że każda z tych trzech egzorybonukleaz posiada pewne spektrum substratów, przy czym największa część wspólna istnieje pomiędzy pulami substratów dla hDIS3L2 i hXRN1, a hDIS3L w powiązaniu z pierścieniem egzosomu wydaje się odgrywać najmniej znaczącą rolę w regulacji poziomu mRNA w cytoplazmie, jeśli chodzi o liczbę transkryptów, których poziom ulega zmianie wskutek jego deplecji.

Podsumowując, nasze dane doprowadziły do opisanie nowej ścieżki degradacji cytoplazmatycznych RNA w kierunku 3'-5', niezależnej od egzosomu, a kontrolowanej przez egzorybonukleazę hDIS3L2. Odkrycie to może okazać się szczególnie użyteczne z punktu wyjaśnienia mechanizmów patogenezы zespołu Perlmana i predyspozycji do guza Wilmsa – choroby, w przypadku której stwierdzono mutacje w genie *hDIS3L2* mogące hamować aktywność enzymatyczną białka. O dużym znaczeniu publikacji 7.A.II.ix. zawierającej omówione wyżej wyniki świadczy fakt poświęcenia jej (oraz pracom o pokrewnej tematyce pochodzących z innych laboratoriów) komentarza w sekcji czasopisma *EMBO Journal* zatytułowanej “Have You seen...?” (2013; 32, 1799 – 1801; Imed E. Gallouzi i Jeffrey Wilusz: “A DIStinctively novel exoribonuclease that really likes U”).

Badania prowadzone aktualnie i plany naukowe na przyszłość

- **Globalna analiza substratów poszczególnych podjednostek katalitycznych ludzkiego egzosomu z wykorzystaniem metod wysokoprzepustowych**

W ramach kontynuacji projektu dotyczącego charakterystyki egzosomu *H. sapiens* zapoczątkowane zostały próby określenia spektrum substratów RNA dla poszczególnych podjednostek katalitycznych kompleksu. Badania te realizowane są dwutorowo. Po pierwsze skonstruowane zostały odpowiednie linie

komórkowe dla białek hDIS3, hDIS3L i hRRP6, analogiczne do opisanych w publikacji 4.B.vii., w których dochodzi do jednoczesnego wyciszenia ekspresji endogennego genu i produkcji egzogennych wariantów danego białka: dzikich lub z mutacją katalityczną. Z linii tych został wyizolowany całkowity RNA, który poddano procedurze wysokoprzepustowego sekwencjonowania (RNA-seq) – obecnie trwa analiza bioinformatyczna uzyskanych wyników. Powinna ona w niedługim czasie pozwolić na wytypowanie transkryptów, których poziom ulega zmianie w wyniku zniesienia określonej aktywności rybonukleolitycznej. Drugie podejście opiera się na identyfikacji substratów RNA oddziałujących bezpośrednio z danym białkiem. Wykorzystujemy w tym celu technikę CLIP (*ang.* *cross-linking and immunoprecipitation*) – RNA są sieciowane z danym białkiem *in vivo* przy pomocy promieniowania UV, a następnie wykonywana jest immunoprecypitacja. Cząsteczki RNA związane z białkiem są identyfikowane poprzez RNA-seq. Również w przypadku tej strategii skonstruowano odpowiednie linie komórkowe i wykonano kilka powtórzeń biologicznych eksperymentów. W najbardziej zaawansowanym stadium są analizy dotyczące hDIS3, których wyniki niedługo powinny być złożone w formie publikacji do recenzji w prestiżowym czasopiśmie.

- **Charakterystyka biochemiczna, strukturalna i funkcjonalna roślinnego kompleksu egzozomu z wykorzystaniem *Arabidopsis thaliana* jako organizmu modelowego**

W roku 2012 Narodowe Centrum Nauki rozpoczęło finansowanie realizacji projektu dotyczącego analizy egzozomu roślinnego, w którym pełnię funkcję kierownika – grant ten został mi przyznany w programie NCN „SONATA”. O ile egzozom został już względnie dobrze scharakteryzowany w komórkach drożdży i człowieka, o tyle niewiele wiadomo na temat jego funkcjonowania u roślin. Wyjaśnienie mechanizmu działania roślinnego egzozomu jest niezbędne dla zrozumienia molekularnych podstaw zjawisk związanych z metabolizmem RNA u tej ważnej grupy organizmów eukariotycznych. Motywacją do podjęcia przeze mnie badań roślinnego egzozomu był również fakt, że może on wykazywać wiele osobliwych cech, których nie obserwuje się w przypadku badanych do tej pory kompleksów egzozomu u innych organizmów modelowych.

Przede wszystkim możliwe jest, że pierścień roślinnego egzozomu, w odróżnieniu od drożdżowego i ludzkiego odpowiednika, zachował aktywność fosforolityczną. Staram się zweryfikować tę hipotezę, prowadząc dokładne badania biochemiczne podjednostki AtRRP41, której przypisywana jest powyższa aktywność. Dotychczasowe doświadczenia zostały wykonane bez uwzględnienia krytycznych kontroli w postaci mutantów katalitycznych. Ponadto, co zaskakujące, nie wykazano dotąd oddziaływania hydrolitycznych nukleaz – homologów Dis3 i Rrp6 – z pierścieniem roślinnego egzozomu. Możliwe jest, że w świetle ewentualnego zachowania aktywności fosforolitycznej przez AtRRP41, siła interakcji między pierścieniem a hydrolazami uległa istotnemu osłabieniu, co należy jednak wiarygodnie udokumentować. Aby to zrobić, wykonywane są rekonstrukcje różnych wariantów egzozomu z rekombinowanych podjednostek oraz doświadczenia typu koimmunoprecypitacji z wykorzystaniem roślinnych homologów Dis3 i Rrp6 opatrzonych odpowiednimi znacznikami. Warto także zauważyć, że u *A. thaliana* obecny jest tylko jeden homolog Dis3 (AtDIS3), natomiast aż 3 białka homologiczne względem Rrp6 (AtRRP6L1-3) – interesujące zatem byłoby sprawdzenie, czy podobnie jak hDIS3 i hDIS3L w komórkach ludzkich, białka AtRRP6L1-3 determinują istnienie różnych form egzozomu w tej roślinie. Kolejnym zagadnieniem wymagającym szczegółowej analizy są właściwości biochemiczne białek AtDIS3 i AtRRP6L1-3, które nie zostały do chwili obecnej określone. W szczególności potencjalne zróżnicowanie aktywności białek AtRRP6L1-3 może wpływać na istnienie odmiennych funkcji poszczególnych form egzozomu *A. thaliana*. Biorąc pod uwagę prawdopodobną możliwość współistnienia w obrębie egzozomu *A. thaliana* aż 4 różnych aktywności nukleolitycznych (fosforolitycznej egzorybonukleazy, dystrybutywnej egzorybonukleazy hydrolitycznej, procesywnej egzorybonukleazy hydrolitycznej oraz endorybonukleazy), niezbędne jest porównanie właściwości biochemicznych pojedynczych białek i zrekonstruowanych kompleksów; umożliwi to zaproponowanie mechanizmu współdziałania poszczególnych podjednostek katalitycznych w degradacji różnego rodzaju substratów RNA. Dostępne dane z analiz fenotypowych i molekularnych sugerują istnienie pewnej specjalizacji funkcjonalnej podjednostek egzozomu *A. thaliana*. Wykonane dotąd badania obejmowały jednak wyłącznie mutanty insercyjne oraz rośliny, w których poziom ekspresji poszczególnych podjednostek obniżano przy pomocy interferencji RNA. Takie podejścia nie pozwalają odróżnić efektów wynikających z zaburzenia struktury kompleksu od skutków upośledzenia poszczególnych aktywności enzymatycznych.

Jednym z zamierzeń projektu jest nisko- oraz wysokoprzepustowa analiza fenotypów molekularnych w roślinach z mutacjami w centrach aktywnych potencjalnych podjednostek katalitycznych, co pozwoli na określenie spektrum substratów dla poszczególnych nukleaz funkcjonujących w obrębie egzosomu *A. thaliana*. Odpowiednie linie roślin zostały już skonstruowane. Realizacja projektu będzie trwała do końca roku 2016.

- **Nowe enzymy do analiz RNA w skali całego transkryptomu i ich wykorzystanie do badania molekularnego mechanizmu antynowotworowego działania 5-fluorouracylu**

Kolejny prestiżowy grant, którego realizacją aktualnie kieruję, został mi przyznany w roku 2012 przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach III edycji programu „LIDER”.

Pierwszym celem proponowanych badań jest produkcja enzymów, które będą mogły znaleźć zastosowanie podczas wielu analiz RNA wykonywanych metodami biologii molekularnej. Użyteczność tych enzymów zostanie zweryfikowana w toku realizacji drugiego celu niniejszego projektu, którym jest zrozumienie globalnych zmian w metabolizmie RNA, wywoływanych przez antymetabolit o działaniu antyproliferacyjnym i przeciwnowotworowym – 5-fluorouracyl (5-FU) – w kontekście mutacji podjednostek katalitycznych ludzkiego kompleksu egzosomu.

Związek pomiędzy antyproliferacyjnymi właściwościami 5-FU a regulacją metabolizmu RNA przez kompleks ludzkiego egzosomu nie został dokładnie poznany. Dotychczasowe badania były bowiem prowadzone głównie na modelu *S. cerevisiae* i koncentrowały się na analizie obróbki rybosomalnego RNA, jako najliczniejszej klasy transkryptów w komórkach eukariotycznych. Z kolei w przypadku doświadczeń wykonanych z

wykorzystaniem komórek ludzkich stwierdzono, że 5-fluorouracyl może wpływać na aktywność dystrybutywnej egzonukleazy 3'-5' hRRP6, podobnie jak ma to miejsce u drożdży, ale doświadczenia te zostały przeprowadzone zanim odkryliśmy, że głównymi podjednostkami katalitycznymi egzosomu w komórkach człowieka są najprawdopodobniej białka hDIS3 oraz hDIS3L. Z tych względów planuję przeprowadzić szeroko zakrojone badania zmian metabolizmu RNA w komórkach z zaburzonymi funkcjami enzymatycznymi podjednostek ludzkiego egzosomu, poddanych działaniu 5-FU, z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Ustalenie zmian ilościowych i jakościowych zachodzących na poziomie całego transkryptomu pomoże wytypować nowe biomarkery RNA, które potencjalnie będą wykorzystywane do prognozowania szans powodzenia terapii antynowotworowej prowadzonej z zastosowaniem 5-FU, a także w badaniach laboratoryjnych na liniach komórkowych, które mają na celu zwiększenie skuteczności działania tego leku.

Podczas planowania eksperymentów, które mają prowadzić do realizacji powyższego celu, zauważyłem konieczność opracowania metod nadprodukcji i oczyszczania kilku enzymów (egzonukleazy 5'-3' Xrn1, enzymu usuwającego czapkę, enzymu dodającego ogony policytozynowe na końcu 3' RNA, termostabilnej ligazy RNA), które mogą stać się powszechnie wykorzystywanymi narzędziami w wielu doświadczeniach poświęconych badaniu metabolizmu RNA, a zatem mogą zostać potencjalnie skomercjalizowane przez firmę biotechnologiczną zajmującą się produkcją oraz dystrybucją enzymów stosowanych w biologii molekularnej.

Omówienie postępów prac w projekcie, który zostanie zakończony w roku 2015, oraz dokładniejsze informacje na temat merytorycznych przesłanek przemawiających za jego realizacją przedstawiono na stronie internetowej: <http://adz.ibb.waw.pl/lider-tomecki/>.

- **Identyfikacja endorybonukleaz uczestniczących w obróbce rybosomalnego RNA w komórkach ludzkich**

Powstawanie dojrzałych rybosomalnych RNA 18S, 5.8S oraz 25/28S w komórkach eukariotycznych jest uzależnione od prawidłowej obróbki długiego prekursora, syntetyzowanego przez polimerazę I RNA. Obróbka ta obejmuje usunięcie fragmentów otaczających (*ang.* ETS – external transcribed sequences) oraz rozdzielających (*ang.* ITS – internal transcribed sequences) dojrzałe rRNA. Proces obróbki pre-rRNA przebiega wieloetapowo, z wykorzystaniem alternatywnych ścieżek i zależy między innymi od działalności licznych endorybonukleaz. W trakcie pisania pracy przeglądowej **7.A.II.vi**, zwróciłem uwagę na fakt, że nawet w przypadku drożdży *S. cerevisiae*, które są podstawowym modelem służącym do badania obróbki pre-rRNA, nie wszystkie enzymy uczestniczące w tej ścieżce metabolizmu RNA zostały zidentyfikowane. Dla

komórek ludzkich nasza wiedza dotycząca dojrzewania rRNA jest jeszcze bardziej fragmentaryczna. Wiadomo na przykład, że ze względu na większą długość fragmentów ETS i ITS, w porównaniu z drożdżowym pre-rRNA występują dodatkowe miejsca cięcia. Ponadto wydaje się, że egzosom pełni nieco inne funkcje w dojrzewaniu poszczególnych rRNA w komórkach ludzkich niż u drożdży. Wskazuje to, że odkrycia dotyczące obróbki pre-rRNA u *S. cerevisiae* nie mogą być we wszystkich sytuacjach ekstrapolowane na przebieg tego procesu w komórkach człowieka. Moje własne nieopublikowane dane wskazują, że homolog jednego z białek potencjalnie uczestniczących w endonukleolitycznej obróbce w miejscach A₀, A₁ i A₂ u drożdży, nie bierze udziału w cięciu sekwencji ludzkiego prekursora rRNA, które byłyby równoważne tym miejscom. Obecnie prowadzę intensywne badania dotyczące funkcji tego białka w komórkach ludzkich. W najbliższym czasie planuję również rozpoczęcie analiz potencjalnych endorybonukleaz należących do różnych rodzin, w celu stwierdzenia czy i które z nich uczestniczą w obróbce 47S pre-rRNA u *H. sapiens*.

6. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2, ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy

- i. Lorentzen E., Basquin J., **Tomecki R.**, Dziembowski A. i Conti E. (2008) Structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44: diverse modes of substrate recruitment in the RNase II nuclease family. *Molecular Cell* **29**, 717 – 728.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ zaplanowaniu oznaczeń biochemicznych aktywności egzorybonukleolitycznej różnych wersji białka Dis3 oraz kompleksu egzosomu *S. cerevisiae*;
- ❖ wykonaniu doświadczeń polegających na:
 - 1) oczyszczeniu zrekombinowanych wersji białka Dis3 po nadprodukcji heterologicznej w bakteriach oraz uzyskaniu natywnych preparatów egzosomu z drożdży;
 - 2) przygotowaniu różnego rodzaju substratów RNA;
 - 3) analizie aktywności egzorybonukleolitycznej otrzymanych białek i kompleksów, badaniu rozplatania dwuniciowych RNA oraz powinowactwa białek do substratów RNA i DNA, których wyniki przedstawiono na rycinie 1 oraz na rycinach uzupełniających S1-S4;
- ❖ interpretacji wyników wykonanych doświadczeń;
- ❖ napisaniu wstępnej wersji części Wyników, Materiałów i Metod oraz Suplementu, dotyczących przeprowadzonych przeze mnie badań;
- ❖ wykonaniu ryciny 1 oraz rycin uzupełniających S1, S2, S3A,B i S4 wraz z legendami.

Mój udział szacuje na 15%.

- ii. Lebreton A.*, **Tomecki R.***, Dziembowski A. i Séraphin B. (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* **456**, 993 – 997; * – **równorzędni autorzy.**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ zaplanowaniu oznaczeń biochemicznych, których celem było wykazanie aktywności endorybonukleolitycznej N-terminalnej domeny PIN białka Dis3 *S. cerevisiae*;
- ❖ wykonaniu doświadczeń polegających na:
 - 1) przygotowaniu konstruktów plazmidowych do nadprodukcji heterologicznej różnych wersji białka Dis3 *S. cerevisiae* oraz N-końcowej domeny PIN tego białka;
 - 2) oczyszczeniu zrekombinowanych wersji białka Dis3 pełnej długości oraz domeny PIN tego białka po nadprodukcji heterologicznej w bakteriach;
 - 3) przygotowaniu różnego rodzaju substratów RNA;
 - 4) analizie aktywności nukleolitycznych otrzymanych białek, których wyniki przedstawiono na rycinach 1 i 3C oraz na rycinach uzupełniających S1-S5;
- ❖ interpretacji wyników doświadczeń;
- ❖ napisaniu znaczącej części manuskryptu oraz Suplementu;
- ❖ wykonaniu rycin 1 i 3C oraz rycin uzupełniających S1-S5 wraz z legendami;
- ❖ udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów;

- ❖ kierowaniu grantem BW na Wydziale Biologii UW nr 1755/60, w ramach którego możliwe było wykonanie części badań.

Mój udział szacuje na 30%.

- iii. **Tomecki R.**, Drazkowska K. i Dziembowski A. (2010) Mechanisms of RNA degradation by the eukaryotic exosome. *Chembiochem* **11**, 938 – 945.

Mój wkład w powstanie tej pracy przeglądowej polegał na:

- ❖ zebraniu materiałów literaturowych;
- ❖ zaplanowaniu i napisaniu przeważającej części manuskryptu;
- ❖ wykonaniu rycin 2-4;
- ❖ udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział szacuje na 85%.

- iv. **Tomecki R.**, Kristiansen M.S., Lykke-Andersen S., Chlebowski A., Larsen K.M., Szczesny R.J., Drazkowska K., Pastula A., Andersen J.S., Stepień P.P., Dziembowski A. i Jensen T.H. (2010) The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO Journal* **29**, 2342 – 2357.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ zaplanowaniu znaczącej części doświadczeń;
- ❖ udziale w kierowaniu doświadczeniami wykonywanymi w naszym laboratorium;
- ❖ udziale w koordynacji współpracy z partnerami zagranicznymi;
- ❖ wykonaniu doświadczeń polegających na:
 - 1) analizie ekspresji hDIS3 i hDIS3L po komplementacji w szczepie drożdży *S. cerevisiae* z deplecją endogennego DIS3, z zastosowaniem technik northern-blot i western-blot;
 - 2) przygotowaniu większości konstruktów plazmidowych;
 - 3) oczyszczeniu zrekombinowanych wersji białek hDIS3 i hDIS3L pełnej długości oraz poszczególnych domen tego białka po nadprodukcji heterologicznej w bakteriach;
 - 4) wyprowadzeniu części stabilnych linii komórkowych nadprodukcujących różne wersje białek hDIS3 i hDIS3L;
 - 5) oczyszczeniu białek hDIS3 i hDIS3L z powyższych linii komórkowych;
 - 6) przygotowaniu różnego rodzaju substratów RNA;
 - 7) analizie aktywności nukleolitycznych białek rekombinowanych i natywnych, których wyniki przedstawiono na rycinach 2B,C, 6, 7 oraz na rycinach uzupełniających S6-S10;
- ❖ interpretacji wyników doświadczeń;
- ❖ napisaniu przeważającej części manuskryptu oraz Suplementu;
- ❖ wykonaniu rycin 1, 2, 6, 7 oraz rycin uzupełniających S1A, S2, S3, S6-S11 i współudziale w wykonaniu pozostałych rycin;
- ❖ udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów;
- ❖ kierowaniu projektem badawczym MNiSW nr N N301 250836, w ramach którego możliwe było wykonanie części badań.

Mój udział szacuje na 45%.

- v. Lykke-Andersen S.*, **Tomecki R.***, Jensen T.H. i Dziembowski A. (2011) The eukaryotic RNA exosome: Same scaffold but variable catalytic subunits. *RNA Biology* **8**, 61 – 66; * – **równorzędni autorzy.**

Mój wkład w powstanie tej pracy przeglądowej polegał na:

- ❖ napisaniu znaczącej części manuskryptu;
- ❖ wykonaniu obu rycin;
- ❖ udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział szacuje na 40%.

- vi. Drązkowska K., **Tomecki R.**, Stodus K., Kowalska K., Czarnocki-Cieciura M. i Dziembowski A. (2013) The RNA exosome complex central channel controls both exonuclease and endonuclease Dis3 activities *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Research* **41**, 3845 – 3858.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ zaplanowaniu oznaczeń biochemicznych, których celem było wykazanie roli centralnego kanału egzozomu w regulacji aktywności nukleolitycznych białka Dis3;
- ❖ udziale w kierowaniu doświadczeniami jako promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Drązkowskiej;
- ❖ wykonaniu doświadczeń polegających na:
 - 1) przygotowaniu różnego rodzaju substratów RNA;
 - 2) analizie aktywności nukleolitycznych rekombinowanych wersji białka Dis3 i jego domeny PIN oraz zrekonstruowanych w układzie *in vitro* różnych wariantów kompleksu egzozomu *C. thermophilum*, których wyniki przedstawiono na rycinach 4, 5, 7B oraz na rycinach uzupełniających S3-S7;
- ❖ interpretacji wyników doświadczeń;
- ❖ współudziale w pisaniu manuskryptu oraz Suplementu;
- ❖ wykonaniu rycin 4, 5, 7 oraz rycin uzupełniających S3-S7 i współudziale w wykonaniu pozostałych rycin;
- ❖ udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział szacuję na 15%.

- vii. **Tomecki R.**[#], Drązkowska K., Kucinski I., Stodus K., Szczesny R.J., Gruchota J., Owczarek E.P., Kalisiak K. i Dziembowski A. (2013) Multiple myeloma-associated *hDIS3* mutations cause perturbations in cellular RNA metabolism and suggest *hDIS3* PIN domain as a potential drug target. *Nucleic Acids Research* **42**, 1270 – 1290; [#] – **autor korespondencyjny**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ zaplanowaniu przeważającej części doświadczeń, w tym opracowaniu modelu komórkowego umożliwiającego badanie wpływu mutacji w genie kodującym *hDIS3*, znajdujących w przypadkach szpiczaka mnogiego, na metabolizm RNA;
- ❖ udziale w kierowaniu doświadczeniami;
- ❖ wykonaniu doświadczeń polegających na:
 - 1) przygotowaniu różnego rodzaju substratów RNA;
 - 2) analizie aktywności egzorybonukleolitycznej rekombinowanych wariantów białka *hDIS3* z mutacjami analogicznymi do tych, które zidentyfikowano w przypadku szpiczaka mnogiego;
 - 3) współudziale w analizie szczepów drożdży z mutacjami w genie kodującym białko Dis3, analogicznymi do tych, których obecność stwierdzono w ludzkim genie *hDIS3* u pacjentów cierpiących na szpiczaka mnogiego;
 - 4) przygotowaniu plazmidów umożliwiających skonstruowanie stabilnych linii komórkowych wyrażających po indukcji różne wersje *hDIS3*, przy jednoczesnym wyciszeniu ekspresji endogennego *hDIS3* przy pomocy *sh-miRNA*;
 - 5) wyprowadzeniu stabilnych linii komórkowych z wykorzystaniem wspomnianych powyżej plazmidów oraz przeprowadzeniu testów weryfikujących poprawność skonstruowanego modelu komórkowego;
 - 6) wszechstronnej analizie fenotypów wzrostowych i molekularnych wynikających z obecności w wyprowadzonych liniach komórkowych wersji *hDIS3* z mutacjami odpowiadającymi tym, które zidentyfikowano w przypadkach szpiczaka mnogiego; których wyniki przedstawiono na rycinach 1C, 2, 5, 6, 7A,C,D,E oraz na rycinach uzupełniających S1B i S6-S10;
- ❖ interpretacji wyników doświadczeń;
- ❖ napisaniu większości manuskryptu oraz Suplementu;
- ❖ wykonaniu większości rycin w manuskrypcie oraz Suplemencie;
- ❖ udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów;

- ❖ *kierowaniu projektem badawczym NCBI R LIDER/35/46/L-3/11/NCBR/2012, w ramach którego możliwe było wykonanie części badań.*
Mój udział szacuje na 55%.

7. Pozostałe osiągnięcia naukowe (nie wchodzące w skład osiągnięcia wymienionego w pkt. 4.A)

A) wykaz publikacji naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

I. Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

- i. Dzikowska A., Kacprzak M., **Tomecki R.**, Koper M., Scazzocchio C. i Weglenski P. (2003) Specific induction and carbon/nitrogen repression of arginine catabolism gene of *Aspergillus nidulans* – functional *in vivo* analysis of the *otaA* promoter. *Fungal Genetics and Biology* **38**, 175 – 186.
IF₂₀₀₃ – **2,746**; IF_{5-letni} – **3,379**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **15**.
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
 - ❖ *wykonaniu transformacji szczepów *A. nidulans*;*
 - ❖ *przeprowadzeniu analiz fenotypowych, molekularnych i enzymatycznych dla uzyskanych transformantów;*
 - ❖ *współudziale w przygotowaniu ryciny 2A i Tabeli 2.*
Mój udział szacuje na 10%.
- ii. Piwowarski J., Dziembowski A., Dmochowska A., Minczuk M., **Tomecki R.**, Gewartowski K. i Stepień P.P. (2004) RNA degradation in yeast and human mitochondria. *Toxicology Mechanisms and Methods* **14**, 53 – 57.
IF₂₀₀₄ – **0,464**; IF_{5-letni} – **1,205**; punktacja MNiSW – **15**; liczba cytowań (wg bazy Web of Knowledge) – **1**.
Mój wkład w powstanie tej pracy przeglądowej polegał na:
 - ❖ *udziale w zbieraniu materiałów literaturowych;*
 - ❖ *napisaniu krótkich fragmentów manuskryptu;*
 - ❖ *edycji manuskryptu.*
Mój udział szacuje na 10%.
- iii. **Tomecki R.**, Dmochowska A., Gewartowski K., Dziembowski A. i Stepień P.P. (2004) Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Research* **32**, 6001 – 6014.
IF₂₀₀₄ – **7,260**; IF_{5-letni} – **8,055**; punktacja MNiSW – **40**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **67**.
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
 - ❖ *współudziale w planowaniu doświadczeń;*
 - ❖ *wykonaniu doświadczeń polegających na:*
 - 1) *zsekwencjonowaniu ogonów poli(A) występujących na końcach 3' wybranych transkryptów w ludzkich mitochondriach;*
 - 2) *analizie ekspresji genu kodującego potencjalną ludzką mitochondrialną polimerazę poli(A) w różnych narządach;*
 - 3) *komputerowej analizie sekwencji aminokwasowej potencjalnej ludzkiej mitochondrialnej polimerazy poli(A);*
 - 4) *sklonowaniu otwartej ramki odczytu kodującej potencjalną ludzką mitochondrialną polimerazę poli(A);*
 - 5) *zbadaniu lokalizacji wewnątrzkomórkowej ludzkiej mitochondrialnej polimerazy poli(A);*
 - 6) *analizie fenotypów molekularnych wynikających z wyciszenia ekspresji genu kodującego ludzką mitochondrialną polimerazę poli(A) po interferencji RNA z wykorzystaniem samodzielnie przygotowanych siRNA,*
których wyniki przedstawiono w tabelach 1-3 oraz na rycinach 1-5;

- ❖ interpretacji wyników badań;
- ❖ napisaniu większości manuskryptu i przygotowaniu wszystkich rycin;
- ❖ udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów;
- ❖ kierowaniu grantami BW na Wydziale Biologii UW nr 1601/20, 1636/54 i 1680/54, w ramach których możliwe było wykonanie części badań.

Mój udział szacuje na 75%.

- iv. Piechota J., **Tomecki R.**, Gewartowski K., Szczesny R., Dmochowska A., Kudła M., Dybczyńska L., Stepień P.P. i Bartnik E. (2006) Differential stability of mitochondrial mRNA in HeLa cells. *Acta Biochimica Polonica* **53**, 157 – 168.

IF₂₀₀₆ – **1,363**; IF_{5-letni} – **1,395**; punktacja MNiSW – **15**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **27**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ wykonaniu analizy poziomu wypadkowego ludzkich transkryptów mitochondrialnych po wyciszeniu ekspresji genu kodującego mitochondrialną polimerazę poli(A), której wyniki przedstawiono na rycinie 4 i w tabeli 5;
- ❖ interpretacji wyników doświadczeń;
- ❖ przygotowaniu ryciny 4;
- ❖ współudziale w napisaniu manuskryptu.

Mój udział szacuje na 15%.

- v. Gewartowski K., **Tomecki R.**, Muchowski L., Dmochowska A., Dzwonek A., Malecki M., Skurzak H., Ostrowski J. i Stepień P.P. (2006) Up-regulation of human PNPase mRNA by beta-interferon has no effect on protein level in melanoma cell lines. *Acta Biochimica Polonica* **53**, 179 – 188.

IF₂₀₀₆ – **1,363**; IF_{5-letni} – **1,395**; punktacja MNiSW – **15**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **6**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ współudziale w wykonaniu analizy długości ogonów poli(A) w komórkach z nadekspresją ludzkiej fosforylasy polinukleotydowej będącej wynikiem traktowania interferonem β , której wyniki przedstawiono na rycinie 4;
- ❖ interpretacji wyników doświadczeń;
- ❖ współudziale w napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rycin.

Mój udział szacuje na 10%.

II. Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

- vi. **Tomecki R.** i Dziembowski A. (2010) Novel endoribonucleases as central players in various pathways of eukaryotic RNA metabolism. *RNA* **16**, 1692 – 1724.

IF₂₀₁₀ – **6,051**; IF_{5-letni} – **5,430**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **31**.

Mój wkład w powstanie tej pracy przeglądowej polegał na:

- ❖ zebraniu materiałów literaturowych;
- ❖ napisaniu manuskryptu;
- ❖ wykonaniu wszystkich rycin;
- ❖ udziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział szacuje na 90%.

- vii. Malet H., Topf M., Clare D.K., Ebert J., Bonneau F., Basquin J., Drazkowska K., **Tomecki R.**, Dziembowski A., Conti E., Saibil H.R. i Lorentzen E. (2010) RNA channelling by the eukaryotic exosome. *EMBO Reports* **11**, 936 – 942.

IF₂₀₁₀ – **7,822**; IF_{5-letni} – **7,396**; punktacja MNiSW – **40**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **22**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ wykonaniu pierwszych doświadczeń biochemicznych, których wyniki zasugerowały, że domena PIN może odpowiadać za oddziaływanie białka Dis3 z pierścieniem egzozomu;

- ❖ współudziale w nadzorowaniu doświadczeń wykonywanych przez mgr Karolinę Drązkowską jako promotor pomocniczy jej rozprawy doktorskiej;
- ❖ współudziale w napisaniu krótkiego fragmentu manuskryptu oraz Suplementu.
Mój udział szacuje na 5%.

Ze względu na niewielki udział własny w przygotowaniu tej pracy zdecydowałem się wyłączyć ją z cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, mimo że jest ona powiązana tematycznie z osiągnięciem.

- viii. Chlebowski A., **Tomecki R.**, López M.E., Séraphin B. i Dziembowski A. (2011) Catalytic properties of the eukaryotic exosome. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **702**, 63 – 78.
IF₂₀₁₁ – **1,093**; IF_{5-letni} – **1,811**; punktacja MNiSW – **25**; liczba cytowań (wg bazy Web of Knowledge) – **9**.

Mój wkład w powstanie tej pracy przeglądowej polegał na:

- ❖ napisaniu pierwszej wersji manuskryptu;
- ❖ edycji końcowej wersji manuskryptu.

Mój udział szacuje na 10%.

Ze względu na niewielki udział własny w przygotowaniu tej pracy zdecydowałem się wyłączyć ją z cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, mimo że jest ona powiązana tematycznie z osiągnięciem.

- ix. Lubas M., Damgaard C.K.*, **Tomecki R.***, Cysewski D., Jensen T.H. i Dziembowski A. (2013) Exonuclease hDIS3L2 specifies an exosome-independent 3'-5' degradation pathway of human cytoplasmic mRNA. *EMBO Journal* **32**, 1855 – 1868. * – **równorzędni autorzy**.
IF₂₀₁₂ – **9,822**; IF_{5-letni} – **9,602**; punktacja MNiSW – **45**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **6**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- ❖ zaplanowaniu oznaczeń biochemicznych mających na celu zbadanie aktywności enzymatycznej białka hDIS3L2;
- ❖ wykonaniu doświadczeń polegających na:
 - 1) przygotowaniu różnego rodzaju substratów RNA;
 - 2) analizie aktywności egzorybonukleolitycznej białka hDIS3L2 oraz jego zmutowanej wersji, których wyniki przedstawiono na rycinie 2 oraz na rycinach uzupełniających S2C-I;
- ❖ interpretacji wyników doświadczeń biochemicznych;
- ❖ współudziale w napisaniu fragmentów manuskryptu dotyczących przeprowadzonych przeze mnie badań;
- ❖ wykonaniu ryciny 2 oraz współudziale w wykonaniu ryciny uzupełniającej S2;
- ❖ kierowaniu projektem badawczym MNiSW nr IP2010 043470, w ramach którego możliwe było wykonanie części badań.

Mój udział szacuje na 15%.

- Łączny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje, które nie weszły w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac z roku 2013 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF₂₀₁₂) – **37,984** (przed doktoratem: **13,196**; po doktoracie: **24,788**)
- Liczba punktów MNiSW za publikacje, które nie weszły w skład osiągnięcia naukowego – **265** (przed doktoratem: **120**; po doktoracie: **145**)
- Liczba cytowań publikacji, które nie weszły w skład osiągnięcia naukowego, do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **174** (prace opublikowane przed doktoratem: **115**; prace opublikowane po doktoracie: **59**).

B) Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe

Brak

C) Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe, które uzyskały ochronę i zostały wystawione na międzynarodowych lub krajowych wystawach lub targach

Brak

D) Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w pkt. 7.A

Brak

E) Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyz, utworów i dzieł artystycznych

Brak

F) Sumaryczny *impact factor* według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku publikacji z roku 2013 uwzględniono dane dla roku 2012)

117,879

G) Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS)

Wszystkie: 492

Bez autocytowań: 465

H) Indeks Hirscha opublikowanych prac według bazy Web of Science (WoS)

10

I) Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

- i. Wykonawca grantu krajowego: „*Rola mitochondriów w chorobach nowotworowych*”. 2003 – 2006. Projekt badawczy zamawiany KBN nr PBZ-KBN-091/P05/2003. Kierownik projektu: prof. dr hab. Piotr P. Stępień.
- ii. Wykonawca grantu krajowego: „*Modele komórkowe w badaniach oddziaływań jądrowo-mitochondrialnych kręgowców*”. 2004 – 2007. Projekt badawczy własny MNiSW nr ZP04A05426. Kierownik projektu: prof. dr hab. Paweł Golik.
- iii. Wykonawca grantu krajowego: „*Ludzkie geny kontrolujące metabolizm mtRNA*”. 2005 – 2008. Projekt badawczy własny MNiSW nr ZP04A00229. Kierownik projektu: prof. dr hab. Piotr P. Stępień.
- iv. Wykonawca grantu krajowego: „*Badanie oddziaływania między podjednostkami kompleksów białkowych zaangażowanych w metabolizm RNA przy użyciu chemicznego sieciowania i spektrometrii mas*”. 2007 – 2010. Projekt badawczy własny MNiSW nr N N301 336733. Kierownik projektu: dr hab. Andrzej Dziembowski.
- v. Główny wykonawca grantu krajowego: „*Analiza funkcjonalna i strukturalna mechanizmu rozpoznawania nieprawidłowych transkryptów przez cytoplazmatyczną formę egzosomu*”. 2007 – 2010. Projekt badawczy specjalny MNiSW nr 501/57 PS15. Kierownik projektu: dr hab. Andrzej Dziembowski.
- vi. Główny wykonawca grantu międzynarodowego: „*Functional and structural characterisation of protein complexes involved in RNA processing and turnover*”. 2007 – 2011. Projekt badawczy EMBO Installation Grant nr F-259. Kierownik projektu: dr hab. Andrzej Dziembowski.
- vii. Kierownik grantu krajowego: „*Analiza funkcjonalna ludzkiego kompleksu egzosomu będącego podstawową egzorybonukleazą organizmów eukariotycznych*”. 2009 – 2011. Projekt badawczy własny MNiSW nr N N301 250836. **Projekt został pozytywnie sprawozdany.**
- viii. Wykonawca grantu krajowego: „*Kompleksy makromolekularne zaangażowane w metabolizm RNA*”. 2009 – 2013. Projekt badawczy Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP) w ramach programu „TEAM” nr TEAM/2008-2/1. Kierownik projektu: dr hab. Andrzej Dziembowski.
- ix. Kierownik grantu krajowego: „*Wysokoprzepustowe analizy podstawowych ścieżek degradacji RNA w komórkach ludzkich ze szczególnym uwzględnieniem substratów kompleksu egzosomu*”. 2010 – 2011.

Projekt badawczy MNiSW w ramach programu „Juventus Plus” nr IP2010 043470. **Projekt został pozytywnie sprawozdany.**

- x. **Kierownik grantu krajowego:** „Charakterystyka biochemiczna, strukturalna i funkcjonalna roślinnego kompleksu egzozomu, z wykorzystaniem *Arabidopsis thaliana* jako organizmu modelowego”. **2012 – 2016.** Projekt badawczy NCN w ramach programu „SONATA” nr 2011/01/D/NZ1/03510.
- xi. **Kierownik grantu krajowego:** „Nowe enzymy do analiz RNA w skali całego transkryptomu i ich wykorzystanie do badania molekularnego mechanizmu antynowotworowego działania 5-fluorouracylu”. **2013 – 2015.** Projekt badawczy NCBiR w ramach programu „LIDER” nr LIDER/35/46/L-3/11/NCBR/2012.

Ponadto pełniłem funkcję **kierownika** następujących grantów na badania własne na Wydziale Biologii UW:

- i. Projekt BW nr 1601/20: „Badanie składu nukleotydowego ogonów poli(A) transkryptów w ludzkich mitochondriach”. **2003.**
- ii. Projekt BW nr 1636/54: „Ustalenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji potencjalnej ludzkiej mitochondrialnej poli(A) polimerazy”. **2004.**
- iii. Projekt BW nr 1680/54: „Wyprowadzanie stabilnej linii komórkowej wyrażającej fuzję ludzkiej mitochondrialnej poli(A) polimerazy (hmtPAP) ze znacznikiem TAP w celu poszukiwania potencjalnych interaktorów białkowych przy pomocy tandemowej chromatografii powinowactwa”. **2005.** Grant sprawozdany z wyróżnieniem.
- iv. Projekt BW nr 1755/60: „Analiza funkcji domeny PIN podjednostki katalitycznej egzozomu *Saccharomyces cerevisiae Dis3p* w układach *in vitro* oraz *in vivo*”. **2007.** Grant sprawozdany z wyróżnieniem.
- v. Projekt BW nr 1791/60: „Analiza funkcjonalna kompleksów białkowych uczestniczących w posttranskrypcyjnych modyfikacjach 3'-końców RNA u *Schizosaccharomyces pombe*”. **2008.**

J) Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową

- i. Stypendium Ministra Edukacji Narodowej za wysokie oceny na studiach i szczególne osiągnięcia naukowe; **czerwiec 2001.**
- ii. Stypendium doktoranckie w ramach Studium Medycyny Molekularnej przy Akademii Medycznej w Warszawie; **październik 2002.**
- iii. Stypendium FEBS na sfinansowanie stażu zagranicznego (FEBS Collaborative Scholarship for Central and Eastern Europe); **2004.**
- iv. Nagroda Polskiego Towarzystwa Genetycznego I stopnia za najlepszą pracę wykonaną w polskich laboratoriach i opublikowaną w latach 2003/2004; **październik 2005.**
- v. Nagroda Polskiego Towarzystwa Biochemicznego im. J.K. Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w Polsce i opublikowaną w roku 2004; **październik 2005.**
- vi. Stypendium FEBS na sfinansowanie stażu zagranicznego (FEBS Collaborative Scholarship for Central and Eastern Europe); **2006.**
- vii. Wyróżnienie sprawozdania grantu na badania własne (BW) na Wydziale Biologii UW; **kwiecień 2006.**
- viii. Stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej „START” dla młodych uczonych; **2007.**
- ix. Nagroda zespołowa III stopnia Rektora Uniwersytetu Warszawskiego za osiągnięcia naukowe; **listopad 2007.**
- x. Wyróżnienie sprawozdania grantu na badania własne (BW) na Wydziale Biologii UW; **kwiecień 2008.**
- xi. Stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej „START” dla młodych uczonych; **2008.**
- xii. Stypendium Konferencyjne Towarzystwa Naukowego Warszawskiego/Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej na dofinansowanie udziału w konferencji 13th Annual Meeting of the RNA Society; **czerwiec 2008.**
- xiii. Nagroda zespołowa II stopnia Rektora Uniwersytetu Warszawskiego za osiągnięcia naukowe; **listopad 2008.**
- xiv. Stypendium Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB) na dofinansowanie udziału w konferencji 21st IUBMB International Congress and 12th FAOBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology: “Biomolecules for Quality of Life”; **marzec 2009.**

- xv. Stypendium na staż podoktorski w ramach programu Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej „TEAM”; *maj 2009*.
- xvi. Nagroda Rady Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za aktywność publikacyjną w roku 2008; *czerwiec 2009*.
- xvii. Stypendium FEBS na dofinansowanie udziału w FEBS Young Scientist Forum “Life of Molecules” oraz 35th FEBS Congress “Molecules of Life”; *kwiecień 2010*.
- xviii. Stypendium Konferencyjne Towarzystwa Naukowego Warszawskiego/Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej na dofinansowanie udziału w konferencji 12th IUBMB and 21th FAOBMB Conference: “The molecules of life – from discovery to biotechnology”; *czerwiec 2010*.
- xix. Nagroda Rady Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za najlepszą publikację oryginalną roku 2010; *czerwiec 2011*.
- xx. Nagroda Rady Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za najlepszą publikację przeglądową roku 2010; *czerwiec 2011*.
- xxi. Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wybitnych Młodych Naukowców; *październik 2011*.
- xxii. Nagroda zespołowa III stopnia Rektora Uniwersytetu Warszawskiego za osiągnięcia naukowe; *listopad 2011*.

K) Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych

- i. “Identification of a novel human, nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase: transcript stability in human mitochondria is not dependent on the presence of the long poly(A) tail”. Konferencja międzynarodowa “**2nd meeting of MitEURO**”; Aussois, Francja; 2-5 września 2004; *plakat*.
- ii. “Diverse role of polyadenylation in various biological systems”. Konferencja międzynarodowa “**Science and Art in Europe – Structure and Function of RNA and Proteins**”; Berlin, Niemcy; 24-25 maja 2005; *referat na zaproszenie*.
- iii. “Studying the role of various proteins in RNA turnover in human mitochondria”. Konferencja międzynarodowa “**EMBO Workshop on Mechanisms and Regulation of mRNA Turnover**”; Arolla, Szwajcaria; 28 sierpnia-1 września 2005; *referat* (wybrany przez organizatorów ze zgłoszonych abstraktów).
- iv. “RNA decay in human mitochondria”. Konferencja międzynarodowa “**Meeting on RNA turnover**”; Jabłonna, Polska; 6-8 października 2005; *referat*.
- v. “Novel endonuclease activity of the exosome contributes to digestion of its physiological substrates”. Konferencja międzynarodowa “**RNA quality conference**” (zorganizowana przez *European Science Foundation*); Granada, Hiszpania; 11-13 czerwca 2008; *plakat*.
- vi. “Crystal structure of the active subunit of the yeast exosome core, Rrp44, bound to RNA”. Konferencja międzynarodowa “**RNA quality conference**” (zorganizowana przez *European Science Foundation*); Granada, Hiszpania; 11-13 czerwca 2008; *plakat*.
- vii. “Cooperation of endo- and exonucleolytic activities of Dis3 protein – catalytic subunit of the exosome complex”. Konferencja międzynarodowa “**13th Annual Meeting of the RNA Society**”; Berlin, Niemcy; 28 lipca-3 sierpnia 2008; *plakat* (jako laureat konkursu na stypendium konferencyjne Towarzystwa Naukowego Warszawskiego/Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej).
- viii. “Novel endonuclease activity of the exosome contributes to digestion of its physiological substrates”. Konferencja międzynarodowa “**FASEB Summer Research Conference: Post-transcriptional control of gene expression: mechanisms of mRNA decay**”; Lucca, Włochy; 14-19 września 2008; *referat* (wybrany przez organizatorów ze zgłoszonych abstraktów).
- ix. “The exosome complex and its novel endonuclease activity”. Konferencja krajowa “**EMBO workshop on ribonucleases**”; Kazimierz Dolny, Polska; 20-21 listopada 2008; *referat*.
- x. “Novel endonuclease activity of the exosome contributes to digestion of its physiological substrates”. Konferencja międzynarodowa “**21st IUBMB International Congress and 12th FAOBMB Congress of Biochemistry and Molecular Biology: Biomolecules for Quality of Life**”; Shanghai, Chiny; 30 lipca-7 sierpnia 2009; *referat* (wybrany ze zgłoszonych abstraktów) w trakcie Young Scientists Programme poprzedzającego konferencję oraz *plakat* w trakcie kongresu; (jako laureat konkursu na stypendium

- konferencyjne dla młodych naukowców przyznawanego przez Międzynarodową Unię Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB)).
- xi. “The human core exosome associates with differentially localized processive ribonucleases: hDIS3 and hDIS3L”. Konferencja międzynarodowa “**EMBL conference: The complex life of RNA: from synthesis to decay**”; Heidelberg, Niemcy; 18-21 marca 2010; plakat.
 - xii. “The human core exosome utilizes differentially localized processive ribonucleases: hDIS3 and hDIS3L”. Konferencja międzynarodowa “**EMBO RNA workshop**”; Warszawa, Polska; 15-16 kwietnia 2010; referat.
 - xiii. “Biochemical activities of human Dis3 orthologs”. Konferencja międzynarodowa “**RNA quality workshop for PhD students and postdocs**” (pod patronatem *European Science Foundation*); Strasbourg, Francja; 29-30 kwietnia 2010; referat (jako współorganizator konferencji).
 - xiv. “The human exosome core utilizes differentially localized processive ribonucleases: hDIS3 and hDIS3L”. Konferencje międzynarodowe “**FEBS Young Scientist Forum: Life of Molecules**” oraz “**35th FEBS Congress: Molecules of Life**”; Göteborg, Szwecja; 23 czerwca-1 lipca 2010; [abstrakt opublikowany w: *FEBS Journal* **277 (Suppl. 1)**, 302]; plakat w trakcie Young Scientist Forum oraz plakat i referat (wybrany przez organizatorów ze zgłoszonych abstraktów) w trakcie kongresu; (jako laureat konkursu na stypendium konferencyjne dla młodych naukowców przyznawanego przez FEBS).
 - xv. „Various forms of the human exosome complex contain differentially localized catalytic subunits: hDIS3 and hDIS3L”. Konferencja międzynarodowa “**12th IUBMB and 21th FAOBMB Conference: The molecules of life – from discovery to biotechnology**”; Melbourne, Australia; 26 września-1 października 2010; plakat (jako laureat konkursu na stypendium konferencyjne Towarzystwa Naukowego Warszawskiego/Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej).
 - xvi. “Preliminary biochemical and functional analysis of *hDIS3* mutations associated with pathogenesis of multiple myeloma”. Konferencja międzynarodowa “**RNA Club 2011**”; Praga, Republika Czeska; 10-11 listopada 2011; plakat.
 - xvii. “Preliminary biochemical and functional analysis of *hDIS3* mutations associated with pathogenesis of multiple myeloma”. Konferencja międzynarodowa “**FEBS International Workshop: New Developments in RNA Biology**”; Tavira, Portugalia; 1-4 września 2012; referat (wybrany przez organizatorów ze zgłoszonych abstraktów).
 - xviii. “Preliminary biochemical and functional analysis of *hDIS3* mutations associated with pathogenesis of multiple myeloma”. Konferencja międzynarodowa “**22nd IUBMB International Congress and 37th FEBS Congress: From Single Molecules to Systems Biology**”; Sevilla, Hiszpania; 4-9 września 2012; [abstrakt opublikowany w: *FEBS Journal* **279 (Suppl. 1)**, 510]; plakat.
 - xix. “Multiple myeloma-associated *hDIS3* mutations cause perturbations in cellular RNA metabolism and suggest hDIS3 PIN domain as a potential drug target”. Konferencja międzynarodowa “**TERM12**”; Sant Feliu de Guíxols, Hiszpania; 22-24 maja 2013; referat.

L) Odbyte zagraniczne staże naukowe

- i. Staż naukowy w laboratorium prof. Roberta N. Lightowersa; Department of Neurology, University of Newcastle upon Tyne; Wielka Brytania; pobyt w ramach *FEBS Collaborative Experimental Scholarship for Central and Eastern Europe*; tytuł projektu: “**Functional analysis of a putative human mitochondrial poly(A) polymerase**”. Lipiec-wrzesień oraz listopad-grudzień 2004.
- ii. Staż naukowy w laboratorium prof. Gadiego Schustera; Department of Biology, Technion – Israel Institute of Technology; Hajfa, Izrael; pobyt finansowany przez Centrum Doskonałości MAMBA oraz *FEBS Collaborative Experimental Scholarship for Central and Eastern Europe*; tytuł projektu: “**Polyadenylation in human mitochondria: different tails tell different tales**”. Luty-marzec oraz maj-sierpień 2006.

M) Odbyte kursy i szkolenia

- i. Praktyki w Zakładzie Genetyki Medycznej w Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie, pod kierunkiem prof. Jerzego Bala; zajęcia dotyczyły metod diagnozowania chorób uwarunkowanych genetycznie; wrzesień 2000.

- ii. Udział w kursie praktycznym MitEURO: **“RNA biochemistry and *in vitro* systems”** na Uniwersytecie w Ulm, Niemcy; lipiec 2002.
- iii. Udział w Szkole Zimowej Studium Medycyny Molekularnej: **“From gene to protein, from structure to disease”** w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie; grudzień 2002.
- iv. Udział w kursie praktycznym MitEURO: **“Transcriptional and translational analysis using yeast genetic methods”** na Uniwersytecie Paris Sud Orsay oraz w CNRS Gif-sur-Yvette, Francja; grudzień 2002.
- v. Udział w kursie teoretyczno-praktycznym Studium Medycyny Molekularnej: **“Molekularne aspekty różnicowania przydatków skóry”** w Katedrze Chemii Fizjologicznej na Akademii Medycznej w Poznaniu; maj 2003.
- vi. Udział w kursie teoretycznym Studium Medycyny Molekularnej: **“Current problems of human genetics: theoretical and clinical aspects”** w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN i na Akademii Medycznej w Poznaniu; maj 2003.
- vii. Udział w kursie praktycznym MitEURO: **“Yeast systems for the analysis of RNA-protein interactions”** na Uniwersytecie „La Sapienza” w Rzymie; Włochy; listopad 2003.
- viii. Udział w kursie praktycznym Studium Medycyny Molekularnej: **“Modern techniques of molecular and cellular biology and their application in medicine”** w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego; Warszawa; marzec 2004.
- ix. Udział w kursie praktycznym MitEURO: **“Analysis of metal transport into mitochondria”** w Institute of Microbiology and Genetics, Vienna Biocenter; Austria; maj 2004.
- x. Udział w Szkole Letniej Studium Medycyny Molekularnej: **“Molecular Endocrinology in Clinical Practice”** organizowanej przez Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach; czerwiec 2005.
- xi. Udział w szkoleniu **“EMBO practical course on image processing for cryo-electron microscopy”** w Birkbeck College w Londynie; Wielka Brytania; wrzesień 2007.

Refot Tomecki