

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Seweryn Mroczek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Stopień doktora nauk biologicznych uzyskany dnia 19.06.2009 na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł rozprawy „Metabolizm rybosomalnego RNA w apoptozie i w stresie oksydacyjnym u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”. Promotor – Prof. dr hab. Joanna Kufel.

Tytuł magistra w zakresie biotechnologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego dnia 30.06.2004. Tytuł pracy „Charakterystyka oddziaływania białka hSuv3p z XIPp metodami *in vitro* i *in situ*”. Promotor – Prof. dr hab. Piotr Stępień.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

Od 01.11.2012 – aktualnie – Adiunkt w Instytucie Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Pracownia Biologii RNA i Genomiki Funkcjonalnej.

01.01.2018 – 01.10.2018 - asystent w Pracowni Biologii RNA i Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN.

09.2009 - 01.11.2012 - Technik, Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, grupa kierowana przez dr. hab. Andrzeja Dziembowskiego.

07.2009 - 07.2017 – Biolog (postdoc), Zakład Biofizyki, Instytut Biofizyki i Biochemii, PAN, Pracowni Biologii RNA i Genomiki Funkcjonalnej kierowana przez dr. hab. Andrzeja Dziembowskiego.

2004 - 2009 – studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

2002 - 2004 - studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

1999 - 2002 – studia licencjackie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Staż zagraniczne:

01.2006 – 02.2006 Staż w laboratorium Prof. Franka Madeo na Uniwersytecie w Graz.

06.2008 – 09.2008 Staż w Centrum Biologii Komórki Wellcome Trust na Uniwersytecie w Edynburgu w grupie Prof. Davida Tollerveya (w ramach Federation of European Biochemical Societies Collaborative Experimental Scholarships).

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Identyfikacja nieopisanych wcześniej enzymów i analiza kompleksów białkowych zaangażowanych w metabolizm RNA w komórkach eukariotycznych.

b) Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

1. C16orf57, a gene mutated in poikiloderma with neutropenia, encodes a putative phosphodiesterase responsible for the U6 snRNA 3' end modification. Mroczek S, Krwawicz J, Kutner J, Lazniewski M, Kucinski I, Ginalski K, Dziembowski A. **2012. Genes Dev 26: 1911-1925.**

IF₂₀₁₂ – 12.444; IF_{5-letni} – 10.567; punktacja MNiSW₂₀₁₂ – 45; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 47; wg Google Scholar – 57.

2. U6 biogenesis and disease associations. Mroczek S, Dziembowski A. **2013. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2013 Sep;4(5):581-92.**

IF₂₀₁₃ – 6.154 ; IF_{5-letni} – 6.004; punktacja MNiSW₂₀₁₃ – 30; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 24; wg Google Scholar – 31.

3. Architecture and nucleic acids recognition mechanism of the THO complex, an mRNP assembly factor. Pena A, Gewartowski K, Mroczek S, Cuellar J, Szykowska A, Prokop A, Czarnocki-Cieciura M, Piwowarski J, Tous C, Aguilera A, Carrascosa J, Valpuesta J.M, Dziembowski A. **2012. EMBO J 31: 1605-1616.**

IF₂₀₁₂ – 9.822; IF_{5-letni} – 10.345; punktacja MNiSW₂₀₁₂ – 40; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 40; wg Google Scholar – 57.

4. Analysis of rRNA synthesis using quantitative transcription run-on (qTRO) in yeast. Koper M, Mroczek S.; **Biotechniques. 2018 Sep;65(3):163-168.**

IF₂₀₁₈ – 2.098 ; IF_{5-letni} – 2.63; punktacja MNiSW₂₀₁₈ – 30; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – 0; wg Google Scholar – 0.

5. The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma; Mroczek S, Chlebowska J, Kuliński TM, Gewartowska O, Gruchota J, Cysewski D, Liudkovska V, Borsuk E, Nowis D, Dziembowski A.; **Nat Commun. 2017 Sep 20;8(1):619.**

IF₂₀₁₇ – 12.353 ; IF_{5-letni} – 13.691; punktacja MNiSW₂₀₁₇ – 45; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 10; wg Google Scholar – 12.

6. Terminal nucleotidyl transferases (TENTs) in mammalian RNA metabolism.

Warkocki Z, Liudkovska V, Gewartowska O, Mroczek S, Dziembowski A.;

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018 Nov 5;373 (1762).

IF₂₀₁₈ – 5.666; IF_{5-letni} – 7.192; punktacja MNiSW₂₀₁₈ – 45; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 3; wg Google Scholar – 3.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania – 48,537.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – 235. Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia 15.04.2019: wg bazy Web of Science – 124; wg Google Scholar – 160.

Oświadczenie określające mój indywidualny wkład w powstanie poszczególnych prac znajduje się w Załączniku 5.

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 6 (Oświadczenia współautorów).

c) omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Tematyka badań naukowych i główne osiągnięcia badawcze

Metabolizm RNA w komórkach eukariotycznych jest bardzo złożonym procesem, w który zaangażowane są liczne białka oraz kompleksy białkowe koordynujące kolejne etapy życia. Enzymy te odgrywają zatem kluczową i podstawową rolę w wielopoziomowej regulacji ekspresji genów. Zaburzenie homeostazy RNA w komórkach, poprzez wystąpienie mutacji w genach kodujących białka zaangażowane w jego metabolizm, może powodować występowanie ciężkich i często nieuleczalnych chorób genetycznych takich jak choroby neurodegeneracyjne czy nowotworowe.

Od czasu studiów magisterskich przedmiotem moich zainteresowań badawczych są różne aspekty metabolizmu RNA w komórkach eukariotycznych, takie jak: analiza transkrypcji, mechanizmy degradacji rRNA w warunkach stresu oksydacyjnego, formowanie 3' końca cząsteczek oraz ich eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy. Projekty badawcze, w które byłem lub jestem obecnie zaangażowany miały na celu identyfikację i funkcjonalną adnotację nowych, dotychczas niescharakteryzowanych enzymów lub poszerzenia wiedzy o funkcjonowaniu znanych już kompleksów białkowych, przyczyniając się do lepszego poznania procesów metabolizmu RNA u eukariontów.

Wszystkie prace stanowiące moje osiągnięcie habilitacyjne dotyczą metabolizmu RNA w komórkach eukariotycznych. Opisują one rolę dwóch niescharakteryzowanych wcześniej genów: *Usb1* oraz *TENT5C*. Wykazaliśmy, że kodują one enzymy zaangażowane w obróbkę 3'-końców RNA. Ze względu na fakt, że mutacje w tych genów prowadzą do występowania stanów chorobowych nasze badania przyczyniają się do zrozumienia ich patomechanizmu. Inne badania, które zawarłem w rozprawie habilitacyjnej pozwoliły poznać architekturę i mechanizm rekrutacji do chromatyny, kompleksu THO, który pełni ważną rolę w koordynacji biogenezy mRNA z jego eksportem z jądra komórkowego do cytoplazmy. Wreszcie, w toku badań, optymalizowałem metody służące do analizy ścieżek regulacji ekspresji genów. Pomimo, że prowadzane przeze mnie badania mogą się wydawać dosyć heterogenne, elementem je spajającym jest fakt zaangażowania badanych enzymów i

kompleksów białkowych w metabolizm RNA oraz wykorzystywanie podobnego warsztatu badawczego opierającego się o nowoczesne narzędzia biologii molekularnej i biochemii białek, wsparte wysokoprępowymi analizami transkryptomycznymi.

2. Identyfikacja funkcji genu (Usb1) kodującego 3'-5' egzorybonukleazę zaangażowaną w formowanie 3'-końca U6 snRNA, którego mutacje powodują rzadką chorobę genetyczną Poikiloderma z neutropenią (PN) oraz są zasocjowane z podobnymi jednostkami chorobowymi takimi jak: syndrom Rothmunda–Thomsona (RTS) oraz Dyskeratosis congenita (DC). Publikacje: nr 1 - doświadczalna i nr 2 – przeglądowa.

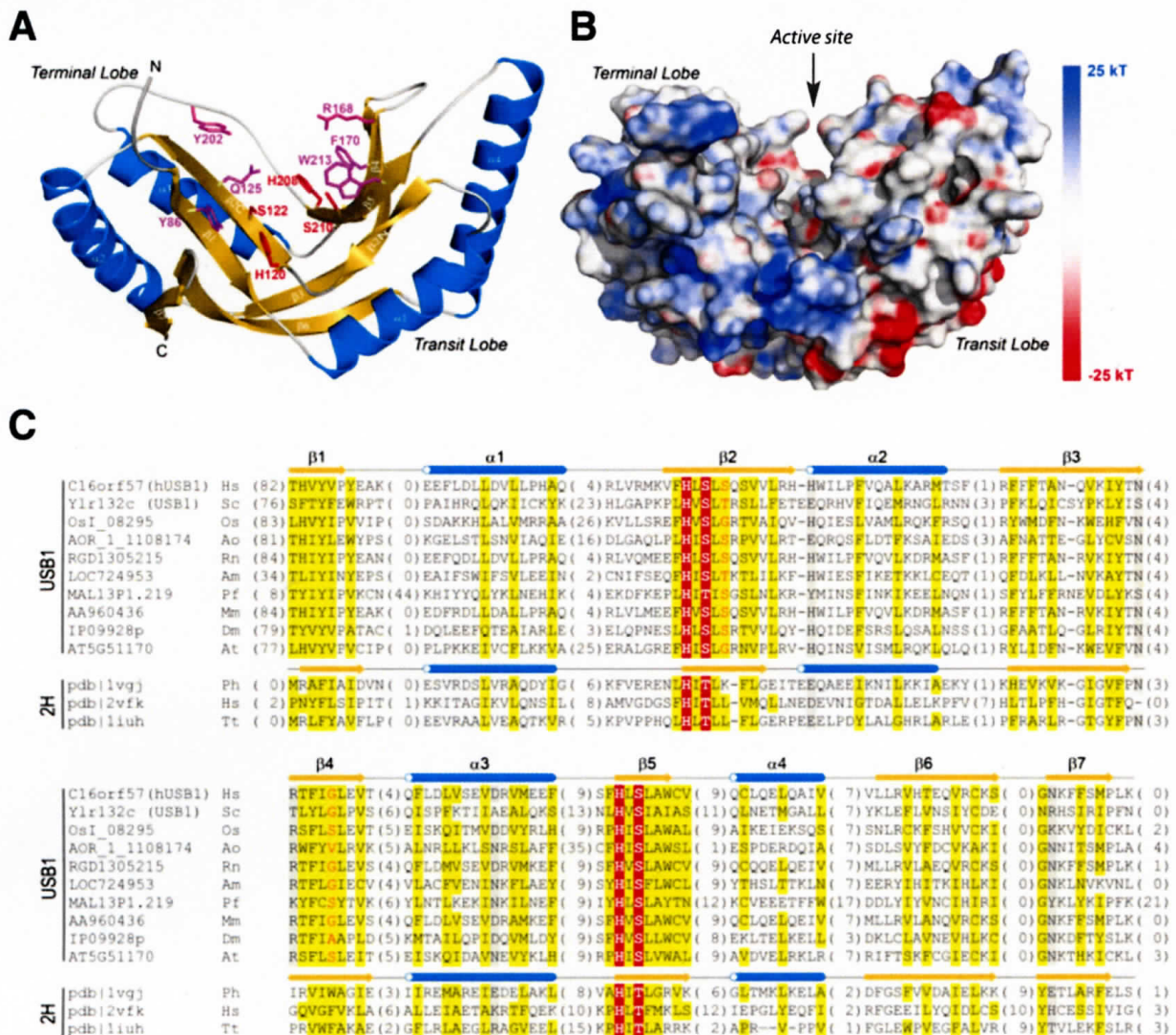
Cząsteczki mRNA u wyższych eukariontów ulegają transkrypcji w postaci prekursorów (pre-mRNA), które muszą ulec procesowi składania, czyli usuwania intronów. Jest to jeden z najważniejszych etapów posttranskrypcyjnej obróbki transkryptów, który jest niezbędny do powstania dojrzałych mRNA stanowiących matrycę do syntezy białka [1]. Proces ten zachodzi na terenie jądra komórkowego i jest przeprowadzany przez wielkocząsteczkowy (masa cząsteczkowa ok. ~12 MDa), metalozależny rybozym zwany spliceosomem. W komórkach eukariontów występują dwie formy tego kompleksu: główny, złożony z pięciu mniejszych stechiometrycznych kompleksów rybonukleoproteinowych (U1, U2, U4, U5, U6 snRNP) usuwający „klasyczne” introny typu U2 oraz mniejsza forma wycinająca rzadkie nietypowe introny typu U12, złożona z U5 snRNP i unikalnych U11, U12, U4atac i U6atac snRNP [2, 3]. Kompleksy U-snRNA są złożone z odpowiedniego U-bogatego snRNA, białek rdzenia oraz białek specyficznych. Kompleksy U1 oraz U2 snRNP inicjują reakcję składania pre-mRNA poprzez rozpoznanie i wiązanie do, kolejno, miejsca składania po stronie 5' SS (ang: *splicing site*) oraz miejsca rozgałęzienia BP (ang: *branch point*). Pozostałe podjednostki tworzą z kolei trimer U4/U6.U5 tri-snRNP, odpowiedzialny zasadniczo za przeprowadzenie właściwej reakcji wycięcia intronu. W dużym uproszczeniu reakcja składania pre-mRNA polega na dwuetapowej transestryfikacji. W pierwszym etapie grupa 2'-OH adeniny obecnej w miejscu BP, przeprowadza atak nukleofilowy na miejsca składania po stronie 5', prowadząc do przecięcia pre-mRNA i utworzenia struktury lariat. W następnym etapie grupa 3'-OH pierwszego eksonu przeprowadza atak nukleofilowy na miejsca składania po stronie 3', prowadząc do wycięcia lariat i ligacji eksonów.

Niekodujące U6 snRNA jest jednym z najważniejszych składników spliceosomu, ponieważ współtworzy jego centrum aktywne, oddziałuje ze substratowym pre-mRNA oraz odpowiada za koordynację dwuwartościowych jonów magnezu niezbędnych do przeprowadzenia reakcji

transestryfikacji podczas wycinania intronu z pre-mRNA. Jony te są wiązane przez urydynę w pozycji 80 (U₈₀) znajdującej się w sekwencji zwanej 3'ISL (ang: 3' *internal stem-loop*) [4]. Pomimo wielu dekad badań nad mechanizmami biogenezy składników kompleksu spliceosomu, wciąż nie były znane wszystkie aspekty powstawania cząsteczek U6 snRNA. Cząsteczki U6 snRNA tworzą struktury drugo- i trzeciorzędowe (między- i wewnątrzcząsteczkowe helisy) podobne do tych występujących w samowycinających się intronach grupy II. W związku z tym, że U6 snRNA występuje w komórkach w trzech różnych kompleksach snRNP: wolnych U6 snRNP, U4/U6 di-snRNP oraz U4/U6.U5 tri-snRNP jego struktura drugorzędowa podlega znacznym zmianom konformacyjnym w czasie cyklu reakcji składania. Po związaniu przez pre-mRNA U1 oraz U2 snRNP, kompleks U4/U6.U5 tri-snRNP wiąże się z tzw. pre-spliceosomem. Przed właściwą reakcją składania U1 oraz U4 oddysocjują z kompleksu, co pozwala U6 snRNA na hybrydyzację z U2 snRNA i stworzenie miejsca aktywnego kompleksu. Po reakcji składania U6 snRNA odłącza się od spliceosomu jako U6 snRNP. Kolejnym krokiem recyklingu U6 jest utworzenie U4/U6 di-snRNP z udziałem białka Prp24, a następnie zrekutowanie U5 snRNA i powstanie U4/U6.U5 trisnRNP [5].

Biogeneza U6 snRNA (a także U6atac w spliceosomie niekanonicznym) ma szereg szczególnych aspektów w porównaniu do innych snRNA biorących udział w splicingu. U6 snRNA w odróżnieniu od pozostałych U-snRNA jest transkrybowane przez polimerazę RNA III, a jego dojrzewanie zachodzi wyłącznie na terenie jądra komórkowego [6]. U6 snRNA jest najbardziej zachowane w ewolucji spośród wszystkich snRNA biorących udział w składaniu pre-mRNA, przykładowo, podobieństwo sekwencji pomiędzy drożdżowym a ludzkim U6 snRNA wynosi aż ok. 60% [6]. Cząsteczki U6 snRNA ulegają na terenie jąderka posttranskrypcyjnej pseudourydylacji katalizowanej przez snoRNAs klasy Box H/ACA oraz 2'-O-metylacji przeprowadzanej przez snoRNAs klasy Box C/D. Uważa się, że mogą one mieć znaczenie dla oddziaływania U6 i U4. Dodatkowo, końce U6 snRNA posiadają szczególne właściwości chemiczne. 5'-koniec U6 snRNA nie posiada klasycznej czapeczki 2,2,7-trimetyloguanozynowej (TMG) (m³G), zaś pierwsza zasada (guanozyna) jest monometylowana (MPG). W komórkach drożdży dojrzałe U6 snRNA jest zakończone resztą fosforanową w pozycji 3', z kolei w komórkach ludzkich ok. 90% cząsteczek U6 snRNA jest zakończone resztą urydyny posiadającą cykliczny 2'3' fosforan (U>P) [7]. Dotychczas nie był znany mechanizm oraz enzymy zaangażowane w formowanie dojrzałego 3'końca U6 snRNA oraz wszystkie

funkcje tej grupy fosforanowej. Sugerowano, że może być on związany z formowaniem i dojrzewaniem U6 snRNP [8].



Rysunek 1. (A) Model 3D przewidzianej struktury ludzkiego białka Usb1. Aminokwasy katalityczne z motywu HXS/T zaznaczono na czerwono, pozostałe aminokwasy odpowiedzialne za oddziaływanie z substratem na fioletowo. **(B)** Analiza potencjału elektrostatycznego powierzchni białka wykazuje pozytywne naładowanie jednej z domen, co może ułatwiać oddziaływanie z negatywnie naładowanym RNA. **(C)** Przyrównanie sekwencji białek z rodziny USB1 oraz wybranych białek z rodziny 2H fosfodiesteraz. Oznaczenie aminokwasów według następującego schematu: nienaładowane zaznaczono na żółto; naładowane lub polarne są zaznaczone na szaro; katalityczne aminokwasy motywów HXS/T są zaznaczone na czerwono. Lokalizacje przewidzianych struktur drugorzędowych zaznaczono nad sekwencją. Oznaczenia gatunków: (Hs) *Homo sapiens*; (Sc) *Saccharomyces cerevisiae*; (Os) *Oryza sativa*; (Ao) *Aspergillus oryzae*; (Rn) *Rattus norvegicus*; (Am) *Apis mellifera*; (Pf) *Plasmodium falciparum*; (Mm) *Mus musculus*; (Dm) *Drosophila melanogaster*; (At) *Arabidopsis thaliana*; (Ph) *Pyrococcus horikoshii*; (Tt) *Thermus thermophilus*. Źródło – publikacja własna [13].

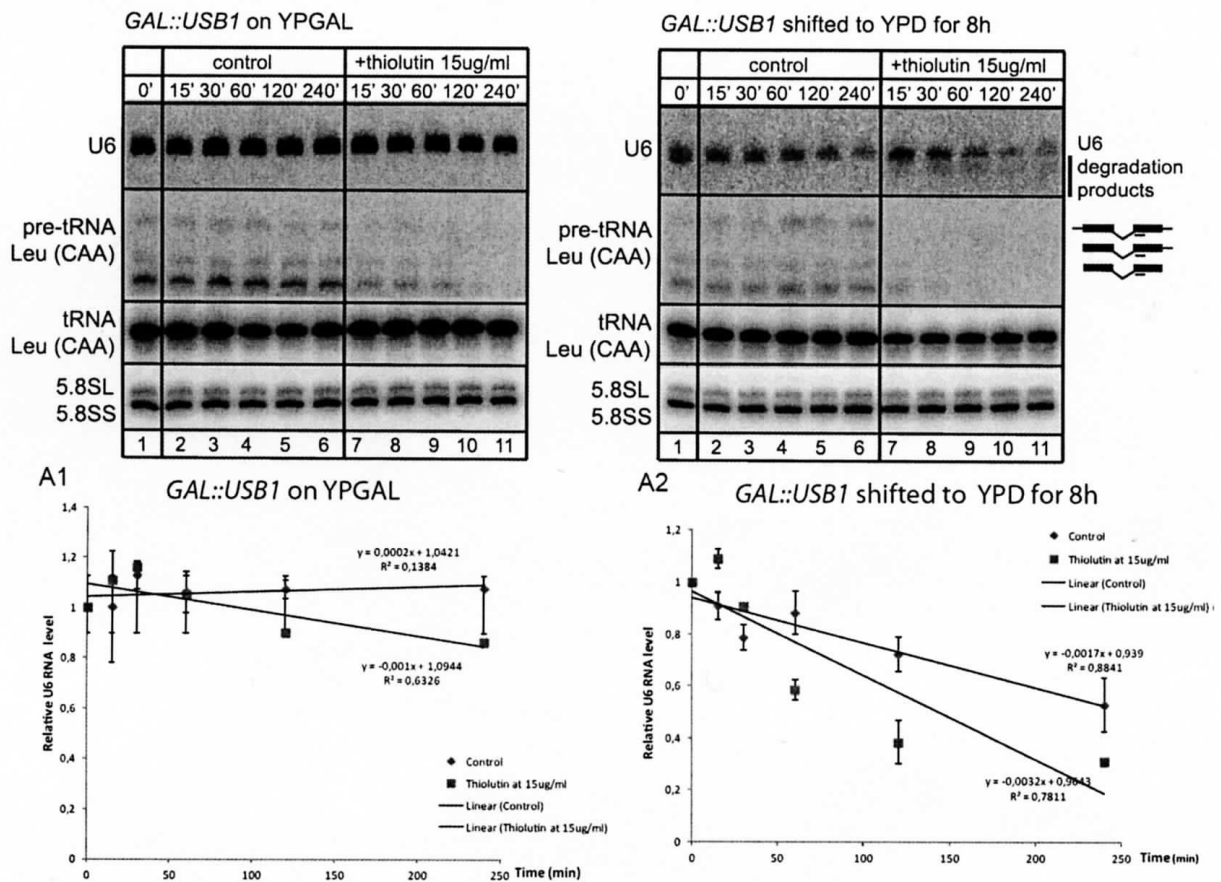
Bioinformatyczne analizy przeprowadzone przez zespół Prof. Krzysztofa Ginalskiego polegające na przewidywaniu funkcji białek poprzez ich modelowanie i szukanie podobieństw strukturalnych z odległymi homologami pozwoliło na wstępne sklasyfikowanie białka kodowanego przez ludzki gen *C16orf57* oraz drożdżowy *YLR132C* jako potencjalne fosfodiesterazy (Rysunek 1C). Metoda ta okazała się bardzo skuteczna w przewidywaniu aktywności enzymatycznych białek o nieznanym funkcjach [9-11]. Enzymy z nadrodziny fosfodiesteraz są często związane z metabolizmem RNA (przykładowo ligazy czy rybonukleazy) i posiadają zachowaną strukturę trzeciorzędową. Zgodnie z tym, białko kodowane przez gen *C16orf57* posiada dwie topologicznie równoważne domeny zwane *terminal lobe* i *transit lobe* (Rysunek 1A, B) [12, 13].

Mimo znacznej różnorodności na poziomie sekwencji przedstawiciele rodziny 2H fosfodiesteraz posiadają zachowane motywy HXT/S (po jednym w każdej domenie) z odpowiedzialnymi za aktywność katalityczną histydynami oraz serynami (Rysunek 1A) [14]. Co istotne, analiza powierzchni elektrostatycznej białka *Usb1* wykazała silne naładowanie dodatnie domeny *terminal lobe*, która może być kluczowa do rozpoznawania ujemnie naładowanego substratu, co dodatkowo sugerowało jego potencjalny udział w metabolizmie RNA (Rysunek 1B). Co ciekawe oba geny nie posiadały znanej funkcji, a ludzki gen jest zmutowany we wszystkich zidentyfikowanych dotychczas przypadkach rzadkiej autosomalnej choroby genetycznej Poikilodermia z neutropenią (PN), z zespołem cech związanych z defektami skóry - siateczkowatej pigmentacji skóry, bliznowatości oraz wrodzonej hipertrofii i dystrofii paznokci, upośledzeniu wzrostu, podwyższonym poziomem LDH, znacznej leukopenii i neutropenii oraz częstymi infekcjami układu oddechowego [15-17]. Dodatkowo w innych jednostkach chorobowych o podobnym obrazie klinicznym: syndromie Rothmunda–Thomsona (RTS) oraz *Dyskeratosis congenita* (DC) również wykazano częste występowanie mutacji w genie *C16orf57*. Z kolei delecja drożdżowego genu *YLR132C* jest letalna, co dodatkowo wskazuje na jego udział w podstawowych procesach metabolicznych.

Skonstruowaliśmy szczep drożdży wyrażający gen *YLR132C* pod kontrolą regulowanego promotora GAL, i wykazaliśmy, że deplecja białka powoduje zahamowanie wzrostu komórek. Następnie przeprowadziliśmy przeszukanie wysokokopijnej biblioteki genomowej *S. cerevisiae* w celu znalezienia supresorów fenotypu wzrostowego. Sekwencjonowanie zidentyfikowanych klonów z przywróconym fenotypem wzrostowym wykazało, że nadekspresja U6 snRNA prowadzi do przywrócenia wzrostu komórek po deplecji białka. Następnie wykorzystując technikę Northern blot wykazaliśmy, że deplecja *YLR132C* prowadzi do specyficznego spadku poziomu U6 snRNA oraz akumulacji prekursorowych cząsteczek RNA z niewyciętymi intronami. Obserwacje te świadczyły o

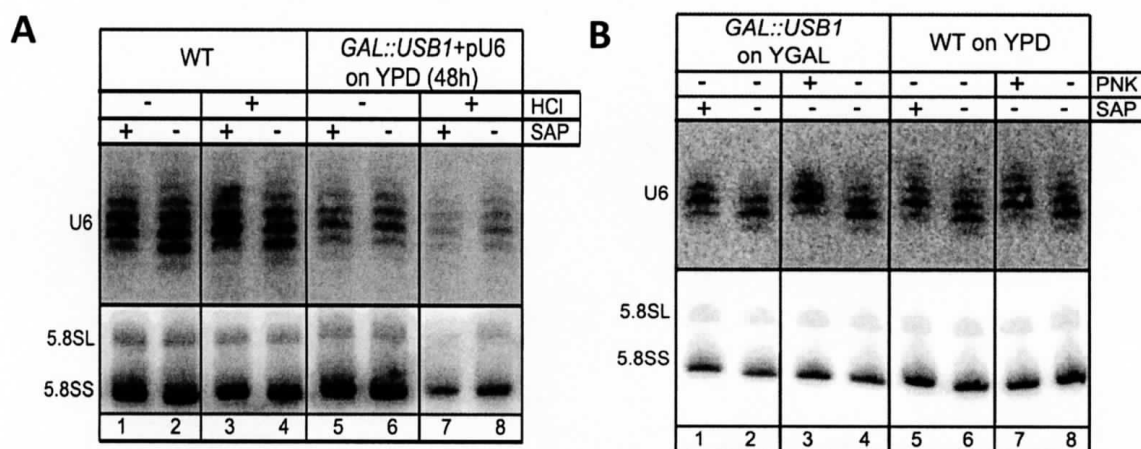
istotnych zaburzeniach składania pre-mRNA w tych komórkach, co potwierdziłem później technikami *in vitro*, wykorzystując znakowane radioaktywnie pre-mRNA inkubowane z jądrowymi ekstraktami z komórek WT oraz po deplecji białka Usb1. Co ciekawe aktywność ekstraktów była częściowo przywracana przez dodanie oczyszczonego U6 snRNA.

Następnie wykazałem, stosując specyficzne inhibitory transkrypcji polimerazy RNA III, że U6 snRNA w komórkach pozbawionych Usb1 ma znacznie obniżoną stabilność i skrócony czas półtrwania z 10 do 2,5 godzin (Rysunek 2). Dodatkowo analizy typu wydłużania startera wykazały, że 5'-koniec U6 snRNA jest stabilny, zatem jest ono degradowane od 3'-końca.



Rysunek 2. Analiza typu northern blot, RNA wyizolowanego ze szczepu GAL::USB1 rosnącego na podłożu permissywnym (YPGAL) oraz restrykcyjnym (YPD) po traktowaniu komórek tiolutyką. 5.8S rRNA wykorzystano jako kontrolę ilości RNA, a pre-tRNA (Leu, CAA) jako marker odpowiedzi komórek na inhibitor transkrypcji. Analizy ilościowe eksperymentów typu northern blot dla U6 snRNA (normalizowane do 5.8S rRNA) przedstawionych na panelu A i B. Wykresy pokazują względny poziom transkryptu U6 snRNA w komórkach kontrolnych oraz po traktowaniu tiolutyką, normalizowanych do 5.8S rRNA. Na wykresie zaznaczono linie trendu oraz wartości współczynnika korelacji (R). Źródło – publikacja własna [13].

Szukając przyczyn niestabilności tego RNA przeprowadziłem analizy porównawcze U6 snRNA z wykorzystaniem wysokorozdzielczej techniki Northern blot. RNA wyizolowane z komórek WT oraz po deplecji USB1 poddałem działaniu enzymów usuwających reszty fosforanowe z 3'-końca: SAP (alkalicznej fosfatazy - usuwającej fosforan przy węglu 2' oraz 3'), PNK (kinazy polinukleotydowej - usuwającej fosforan przy węglu 3') oraz HCl (w celu otworzenia potencjalnego cyklicznego fosforanu), a następnie po rozdziale w żelu sekwencyjnym było analizowane techniką Northern blot (Rysunek 3A, B). Te doświadczenia pozwoliły na odkrycie, że aktywność Usb1 jest konieczna do obecności reszty fosforanowej na 3' końcu RNA, a w komórkach pozbawionych tego białka jest ono zakończone grupami hydroksylowymi w pozycjach 2' i 3' (Rysunek 3A, B).



Rysunek 3. Analiza statusu fosforylacji 3'-końców U6 snRNA. **(A)** Całkowite RNA wyizolowane ze szczepu WT (ścieżki 1-4) oraz GAL::USB1+pU6 rosnącego na podłożu restrykcyjnym (YPD; ścieżki 5-8) traktowano HCl (w celu otwarcia potencjalnego cyklicznego fosforanu) oraz SAP (w celu usunięcia 3' fosforanów), a następnie poddano rozdziałowi w żelach sekwencyjnych oraz analizie typu Northern blot. **(B)** Całkowite RNA wyizolowane ze szczepu GAL::USB1 rosnącego na podłożu YGAL (ścieżki 1-4) oraz WT (ścieżki 5-8) rosnącego na podłożu restrykcyjnym YPD; traktowano enzymami SAP (w celu usunięcia 3' fosforanów) oraz PNK (usuwającej fosforan przy węglu 2' oraz 3'), a następnie poddano rozdziałowi w żelach sekwencyjnych oraz analizie typu Northern blot. Źródło – publikacja własna [13].

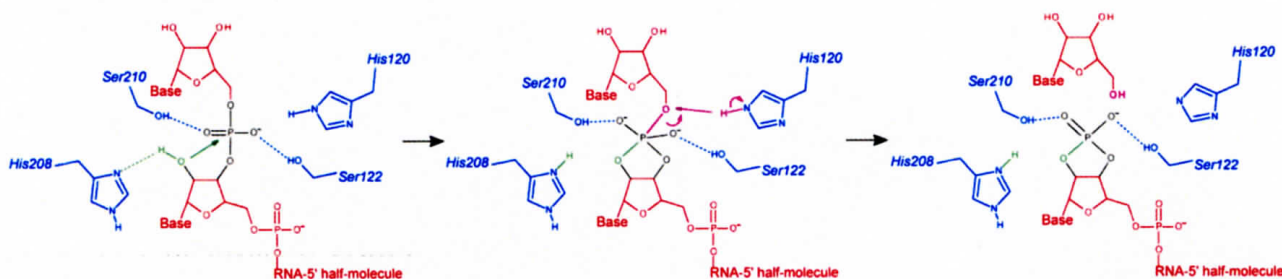
Kolejnym modelem badawczym, który zastosowałem były komórki ludzkie. Wykazałem, że ludzkie białko Usb1 lokalizuje się w jądrze komórkowym. Następnie, wykorzystując siRNA, wyciszyłem ekspresję Usb1 i przeanalizowałem fenotypy U6 snRNA. Zauważyliśmy, że brak białka Usb1 powoduje zwiększenie heterogenności U6 snRNA, zaś dalsze analizy biochemiczne statusu fosforylacji 3'-końca RNA wykazały, że jest on niezbędny do formowania reszty cyklicznego fosforanu. W komórkach ludzkich, istnieje dedykowana niekanoniczna polimeraza poli(U) (ncPUP) TENT1 (TUT1), której główną funkcją jest urydylacja nowopowstałych cząsteczek U6 snRNA, zakończonych grupami -OH, co w konsekwencji prowadzi do wydłużenia i stabilizacji tych

transkryptów [18, 19]. Dzięki temu mechanizmowi, w odróżnieniu od komórek drożdży w komórkach ludzkich, deplecja białka hUsb1, nie skraca znacząco okresu półtrwania tego RNA, co sprawdziłem za pomocą znakowania tiourydyną *in vivo*, a następnie biotynylacji, oczyszczenia RNA z użyciem złoża ze streptawidyną i jego dalszej ilościowej analizy techniką northern blot.

Brak Usb1 nie wpływa też znacząco na obniżenie aktywności splicingowej ekstraktów jądrowych *in vitro*. Dodatkowo wysokoprzepustowe analizy typu RNA-seq (Illumina) wykazały brak akumulacji pre-mRNA w komórkach po wyciszeniu hUsb1 za pomocą siRNA (Mroczek, Dziembowski, dane niepublikowane).

Moje badania dotyczyły również innych enzymów potencjalnie zaangażowanych w formowanie dojrzałego 3'-końca cząsteczki U6 snRNA takich jak TENT1 oraz RTCD1 (cyklaza 3' końcowego fosforanu RNA). Wykazałem, że dodawanie reszt urydynowych do 3'-końców U6 snRNA nie ma znaczenia dla formowania reszt cyklicznego fosforanu (U>P), a także wykluczyliśmy udział RTCD1 w tym procesie, który był wcześniej postulowany przez innych badaczy [20]. Były to pierwsze eksperymentalne dane, wykluczające udział tych enzymów w forowaniu 3'-końca U6 snRNA.

Uzyskane dane eksperymentalne pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu reakcji przeprowadzanej przez 3'-5' egzorybonukleazę Usb1, który okazał się bardzo zbliżony do działania RNazy A (Rysunek 4). Podczas reakcji dochodzi do nukleofilowego ataku reszt histydynowych na grupę fosforanową, co prowadzi do wytworzenia struktury cyklicznego fosforanu, który ulega stabilizacji w centrum aktywnym przez oddziaływanie z konserwowanymi serynami. W konsekwencji prowadzi to do przecięcia wiązania P-O^{5'} i usunięcia ostatniej urydyny. W następnym etapie (zachodzącym tylko w komórkach drożdży) struktura 2'3'-cyklicznego fosforanu ulega hydrolizie z utworzeniem reszty fosforanowej 3' w reakcji podobnej do tej przeprowadzanej przez 2H_fosfodiesterazy.



Rysunek 4. Proponowany mechanizm reakcji katalizowany przez hUSB1. Atak nukleofilowy na grupę fosforanową powoduje utworzenie reszty cyklicznego fosforanu. Grupy zaangażowane w pierwszy i drugi etap reakcji są pokazane odpowiednio w kolorze zielonym i karmazynowym, z kolei reszty katalityczne są oznaczone na niebiesko. Źródło – publikacja własna [13].

Prace innych grup badawczych potwierdziły uzyskane przez nas wyniki, w tym zaproponowany model aktywności katalitycznej [21, 22]. Poprawność zaproponowanego modelu białka Usb1 została potwierdzona przez struktury krystaliczne uzyskane przez niezależne laboratoria [22, 23]. Co ciekawe, obecność grupy fosforanowej na 3'-końcu U6 snRNA ma kluczowe znaczenie nie tylko dla stabilności tych cząsteczek, co wykazały nasze badania, ale również działa hamująco na aktywność enzymu Usb1, chroniąc 3'-koniec przed nadmierną degradacją. Dodatkowo badania *in vitro* wykazały, że obecność grup cyklicznego fosforanu (w komórkach ludzkich) oraz 3'-fosforanu (w drożdżach) zwiększa powinowactwo i preferencyjne wiązanie kompleksu białek Lsm2-8 do 3'-końca U6 snRNA, co w dalszej kolejności umożliwia powstanie U4/U6 di-snRNP oraz trimeru U4/U6.U5 tri-snRNP [23, 24]. Jednocześnie 3'-końcowy fosforan blokuje ponowne wiązanie białek Lhp1/La. Oznacza to, że cząsteczki RNA niezwiązane przez białka Lsm, są ostatecznie bardziej narażone na egzonukleolityczną degradację 3'->5', wykonywaną najprawdopodobniej przez system kontroli jakości RNA przez system TRAMP oraz główną egzorybonukleazę, kompleks egzozomu. Co ciekawe, zaobserwowano, że w komórkach pacjentów chorujących na PN dochodzi do akumulacji cząsteczek U6 snRNA poliadenylowanych na 3'-końcach, które mogą być degradowane przez kompleks egzozomu [17, 22]. Dotychczas nie poznano molekularnych mechanizmów wiążących białko Usb1 z chorobą PN czy innymi jednostkami chorobowymi, w których identyfikuje się mutacje w tym genie. Uważa się, że przyczyną mogą być subtelne zmiany poziomów U6 snRNA prowadzące do zaburzenia składania pre-mRNA w określonych tkankach na pewnych etapach rozwoju. Inną alternatywą jest to, że USB1 wpływa na poziomy innych cząsteczek RNA posiadających cykliczny fosforan na 3'-końcu (SRP lub MRP RNA) [22].

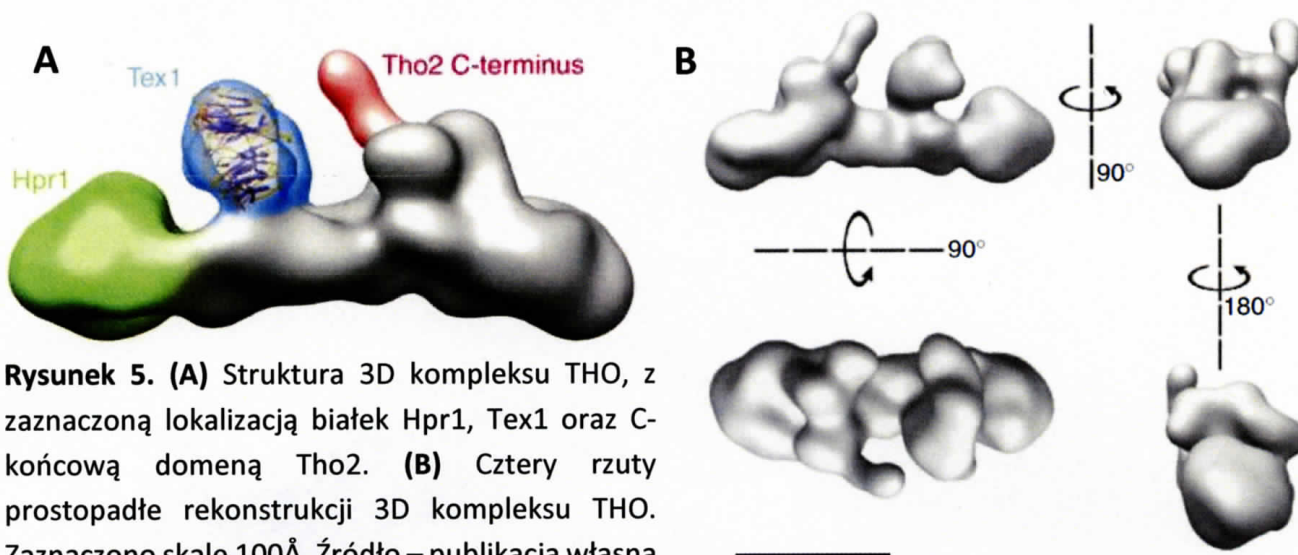
Podsumowując, moje badania pozwoliły na identyfikację 3'-5' egzorybonukleazy Usb1 (*U Six - biogenesis 1*) zaangażowanej w usuwanie ostatniego nukleotydu z 3'-końca U6 snRNA. Od 2012 Usb1 jest nową, oficjalną nazwą ludzkiego genu *C16orf57* (HGNC:25792) oraz drożdżowego genu *YLR132C*.

2. Identyfikacja białka Tex1, jako nowej podjednostki kompleksu THO, zaangażowanego w eksport mRNA z jądra komórkowego oraz identyfikacja domeny białka Tho2 odpowiedzialnej za rekrutację tego kompleksu do aktywnej transkrypcyjnie chromatyny. Publikacja nr 3 – doświadczalna.

Eksport mRNA z jądra komórkowego jest jednym z kluczowych etapów ekspresji genów w komórkach eukariotycznych, umożliwiającym wyrażenie informacji genetycznej zakodowanej w

RNA syntetyzowanym w jądrze komórkowym w trakcie translacji odbywającej się na terenie cytoplazmy [25, 26]. Nowopowstałe cząsteczki mRNA w jądrze komórkowym ulegają licznym przemianom obejmującym formowanie 5' (dodanie czapeczki) i 3' końca (cięcie i poliadenylacja) czy usunięciu intronów. Podczas tych procesów cząsteczki mRNA podlegają dynamicznym zmianom struktury drugorzędowej determinowanym wiązaniem licznych białek, tworząc finalnie kompleksy rybonukleoproteinowe (mRNP), dzięki czemu mogą oddziaływać z podjednostkami kompleksu pora jądrowego NPC (ang. *Nuclear pore complexes*) i w konsekwencji ulec eksportowi na teren cytoplazmy [27]. Jednym z podstawowych czynników biorących udział w tym niezwykle złożonym procesie jest konserwowany ewolucyjnie kompleks THO [28]. W komórkach drożdżowych jego główna funkcja polega na kotranskrypcyjnym rekrutowaniu białek będących czynnikami eksportu mRNA - Yra1 (białko adaptorowe wiążące mRNA) oraz Sub2 (helikaza typu DEAD-box). W ten sposób, wraz z dodatkowymi białkami towarzyszącymi tworzy tzw. kompleks TREX (ang. *TRanscription EXport*) zaangażowany w funkcjonalne sprzężenie różnych etapów biogenezy mRNA [29].

Dodatkowo kompleks THO w drożdżach jest konieczny do wydajnej poliadenylacji 3'-końca RNA przez kanoniczną polimerazę poli(A) (PAP1) oraz może być zaangażowany w koordynację obróbki RNA oraz uwalniania nowego mRNA z genu. Badania, w których brałem udział wykazały, że kompleks THO jest w istocie heteropentamerem, a nie jak dotychczas uważano heterotetramerem, i oprócz podjednostek Tho2, Hpr1, Mft1 oraz Thp2, jego integralną część stanowi białko Tex1 [30, 31]. Wykorzystując technikę mikroskopii elektronowej w niskich temperaturach (ang: *cryo-EM with negative staining*), a także wyznaczanie struktury drugorzędowej białek metodą dichroizmu kołowego CD, immunomikroskopii oraz znakowania białkiem Dyn2/DID (*dynein light chain-interacting domain*) oraz mikroskopii elektronowej [32], określiliśmy kształt



Rysunek 5. (A) Struktura 3D kompleksu THO, z zaznaczoną lokalizacją białek Hpr1, Tex1 oraz C-końcową domeną Tho2. **(B)** Cztery rzuty prostopadłe rekonstrukcji 3D kompleksu THO. Zaznaczono skalę 100Å. Źródło – publikacja własna [31].

pięciokładnikowego kompleksu THO, w rozdzielczości około 15Å (Rysunek 5) [31]. Ma on wydłużony, pałeczkowaty kształt (długość: ~220 Å i szerokość: ~115 Å), z dwoma charakterystycznymi wypustkami pośrodku, z których jedną stanowi C-końcowa domena białka Tho2 istotna do pełnienia jego funkcji fizjologicznych. Dodatkowo zlokalizowaliśmy położenie podjednostek Tex1, Hpr1 [31]. Badania z wykorzystaniem technik biologii strukturalnej prowadzono we współpracy z Prof. José Maria Valpuestą (CSCN, Madryt).

W pracy wykazaliśmy również, że kompleks THO bezpośrednio oddziałuje z aktywną transkrypcyjnie chromatyną. W tym celu wykorzystaliśmy komórki drożdży wyrażające białka Hpr1, Thp2 i Mtf1 w fuzji ze znacznikiem TAP w szczepie WT oraz szczepie niosącym mutację Tho2Δ1408–1597 pozbawionym domeny oddziałującej z kwasami nukleinowymi. Do analizy rekrutacji kompleksu THO do aktywnej transkrypcyjnie chromatyny wykorzystaliśmy gen HSP104, którego ekspresja jest silnie aktywowana podczas indukcji szoku cieplnego. Co ważne poziom i kinetyka indukcji genu HSP104 były na podobnym poziomie we wszystkich badanych szczepach, co potwierdzono analizując ilość powstałego mRNA techniką northern blot oraz ilość i rozkład polimerazy RNA II (RNAPII) związanej wzdłuż genu podczas indukcji odpowiedzi na szok cieplny.

Wykorzystując technikę immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) wykazałem, że kompleks THO wiąże się do aktywnego transkrypcyjnie locus genu HSP104 i jest to zależne od obecności C-końcowej domeny podjednostki Tho2 i jego wiązanie zachodzi głównie w rejonie 3'-końca genu. Nasze dane są zgodne z danymi literaturowymi uzyskanymi w wysokoprzepustowych analizach oraz fizjologiczną funkcją tego kompleksu [33]. Co istotne wiązanie podjednostki Hrp1 jest zależne od RNA, co wykazały eksperymenty z wykorzystaniem RNazy. Brak wiązania kompleksu THO do chromatyny nie ma wpływu na kinetykę transkrypcji oraz tempo degradacji po powrocie komórek z warunków szoku cieplnego (42°C) do temperatury permissywnej (25°C).

Zdolność wiązania kwasów nukleinowych (RNA, ssDNA oraz dsDNA) przez C-końcową nieustrukturyzowaną domenę białka Tho2 (aminokwasy: 1408–1597) została potwierdzona eksperymentami *in vitro* polegającymi na sieciowaniu białek Tho2 (wariant o pełnej długości oraz ze skróconą domeną C-końcową) z radioaktywnie znakowanymi kwasami nukleinowymi z użyciem światła UV. Dodatkowo wykazaliśmy, że fragment 1271-1597 białka Tho2 pełni istotną rolę w umożliwieniu przeżycia komórkom drożdży w temperaturze restrykcyjnej (37°C). W dalszych testach fenotypowych stwierdziliśmy zależność pomiędzy funkcjonalnym kompleksem THO, a ekspresją genu reporterowego β-galaktozydazy, którego aktywność była znacząco obniżona we wszystkich badanych szczepach z mutacjami w genach kodujących podjednostki kompleksu THO (Tho2Δ_{1408–}

1597, Tho2 Δ _{1271–1597}, Δ Tex1 oraz Δ Tho2). Dodatkowo stwierdziliśmy, że aktywność genu reporterowego zależy głównie od białka Tho2. W dalszej kolejności opisaliśmy podwyższony poziom częstości rekombinacji związanej z transkrypcją w mutantach kompleksu THO.

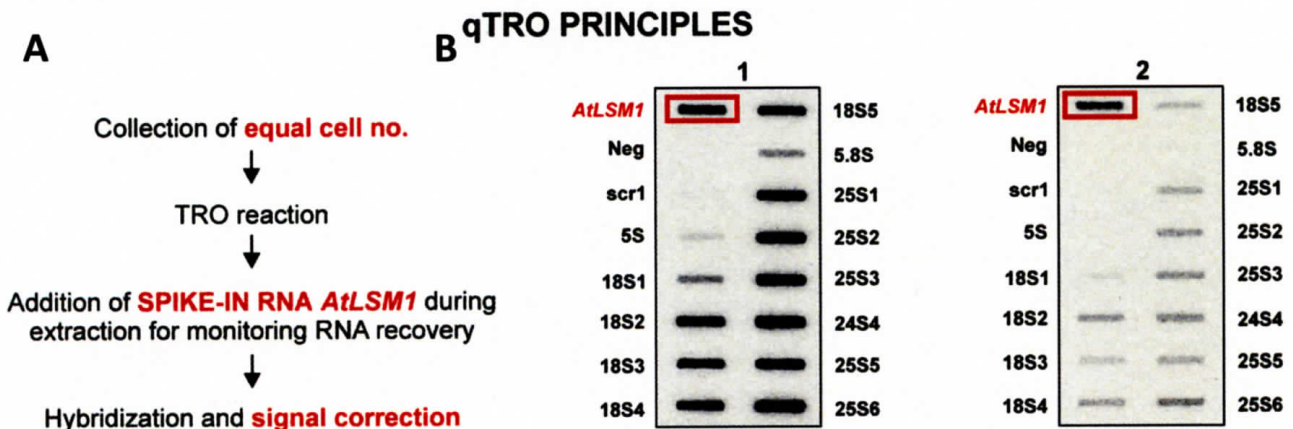
Podsumowując, wyniki opisane w pracy pozwoliły na lepsze zrozumienie mechanizmu eksportu mRNA oraz w znaczący sposób przyczyniły się do zrozumienia mechanistycznego działania kompleksu THO w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

3. Opracowanie metody ilościowego badania transkrypcji w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* – qTRO (transcriptional run-on). Publikacja nr 4 - doświadczalna.

Porównawcze analizy transkrypcyjne wymagają odpowiednich i precyzyjnych metod aby być wiarygodnymi. W celu badania dynamiki transkrypcji genów kodujących rRNA opracowaliśmy modyfikacje jednej z podstawowych metod badania poziomu ekspresji genów w drożdżach tzw. *transcriptional run-on* (TRO) [34]. Udoskonaleniami, które wprowadziliśmy do klasycznego protokołu TRO są: zbieranie równej liczby komórek dla każdego warunku eksperymentalnego / szczepu; wprowadzenie nowej standaryzacji do etapów izolacji RNA i hybrydyzacji polegającej na dodawaniu egzogenego, transkrybowanego *in vitro* radioaktywnego mRNA (tzw. *spike-in*) do każdej próbki podczas homogenizacji komórek; zaprojektowaniu zestawu nowych, wystandaryzowanych sond oligonukleotydowych komplementarnych do transkryptów rRNA (Rysunek 6) [34]. Dzięki temu, technikę tę nazwaliśmy ilościowym TRO – qTRO (ang: *quantitative TRO*) i w powiązaniu z techniką immunoprecypitacji chromatyny (ChIP), która pozwala na ilościowe zbadanie rozkładu polimerazy RNA wzdłuż genu, może ona dostarczyć wiarygodnych danych dotyczących transkrypcji badanego genu.

Opracowana metoda została z powodzeniem przetestowana w badaniu transkrypcji genów rDNA w odpowiedzi na stres oksydacyjny i w dwóch mutantach *Saccharomyces cerevisiae* z zaburzoną syntezą rRNA: mutancie z delecją podjednostki kompleksu RNA Pol I (*rpa12 Δ*) oraz z delecją czynnika elongacji transkrypcji (*spt4 Δ*). Wykorzystując tę technikę wykazaliśmy, że tempo transkrypcji 35S rRNA nie jest równomierne i są dwa rejony w obrębie 18S i 25S rRNA o podwyższonej aktywności transkrypcyjnej RNAPI oraz region w obrębie 5.8S o znacznym spadku aktywności. Następnie zbadałem rozkład polimerazy RNA I wzdłuż genu rDNA wykorzystując technikę ChIP-qPCR, co pozwoliło na wykazanie profilu dystrybucji kompleksu polimerazy wzdłuż genu rDNA oraz wykazanie jego zmian ilościowych w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Pozwoliło to na stwierdzenie pozytywnej

korelacji pomiędzy ilością nowopowstałego transkryptu 35S rRNA, a profilem rozkładu polimerazy RNA I wzdłuż genu.



Rysunek 6. (A) Główne założenia techniki qTRO. **(B)** Przykładowy wynik hybrydyzacji wyznakowanego radioaktywnie RNA z sondami komplementarnymi do różnych rejonów immobilizowanymi na membranie. Sygnał uzyskany dla *AtLSM1* (zaznaczony czerwoną ramką) pozwala na normalizację hybrydyzacji pomiędzy różnymi membranami. Źródło – publikacja własna [34].

4. Eksperymentalna identyfikacja enzymatycznej aktywności oraz funkcji nowej ludzkiej niekanonicznej polimerazy poli(A) TENT5C (Fam46C), której mutacje prowadzą do rozwoju szpiczaka mnogiego (MM; multiple myeloma), nowotworu komórek plazmatycznych. Publikacje: nr 5 - doświadczalna i nr 6 – przeglądowa.

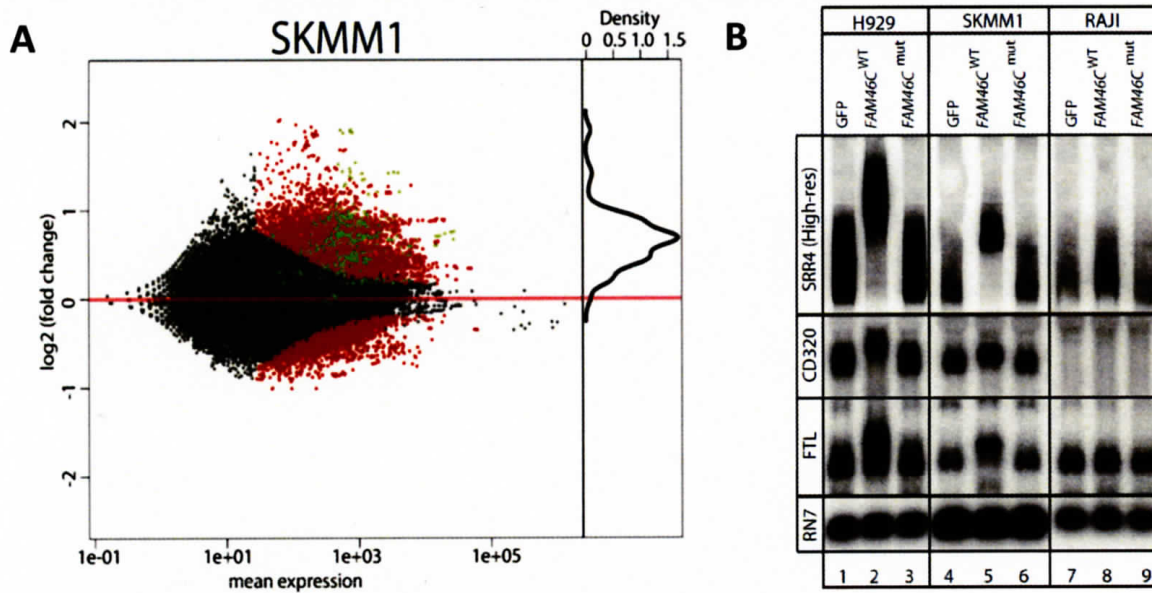
Poliadenylacja jest jednym z kluczowych procesów związanych z obróbką i formowaniem 3' końca RNA, mającym znaczenie dla jego stabilności. Zdecydowana większość mRNA jest modyfikowana przez kanoniczne polimerazy poli(A) (PAP), dodające niemetryczne reszty adenozyne do końca 3' cząsteczki RNA. Proces ten zachodzi na terenie jądra komórkowego i jest powiązany z terminacją transkrypcji. Okazuje się jednak, że taki rodzaj posttranskrypcyjnej modyfikacji 3'-końca RNA może zachodzić również na terenie cytoplazmy, jest to proces w stanie równowagi dynamicznej z deadenylacją, a oprócz adenin mogą być dodawane również reszty urydyny oraz guanin, co ma kluczowe znaczenie dla dalszych losów tego RNA w komórce. Najnowsze badania wykazały istnienie w komórkach ludzkich kilku niekanonicznych polimeraz poli(A) i poli(U) (ncPAP, ncPUP), których funkcje wskazują na ogromne znaczenie tych enzymów w regulacji ekspresji informacji genetycznej. Przykładami mogą być TENT2 (Gld2) pełniący rolę aktywatora translacji nieaktywnych matczynych transkryptów podczas wczesnego rozwoju zarodkowego *Xenopus laevis*

[35] lub TENT3A/3B (TUT4/7) odpowiedzialne za kierowanie transkryptów do degradacji poprzez ich urydylację oraz regulację procesu transpozycji LINE-1 w komórkach ludzkich [36, 37]. Z kolei dodawanie ogonów zawierających oprócz adenin reszty guanozyny przez TENT4A (PAPD7) oraz TENT4B (PAPD5) powoduje hamowanie procesu deadenylacji mRNA przez kompleks CCR4-NOT i wpływa na zwiększenie okresu półtrwania modyfikowanych cząsteczek [38].

Analizy bioinformatyczne przeprowadzone przez grupę Profesora Krzysztofa Ginalskiego, pozwoliły na sklasyfikowanie ludzkich białek TENT5, wcześniej znanych jako Fam46 (*ang: Family with sequence similarity 46*), jako nukleotydylotransferaz (transferaz nukleotydów terminalnych), mogących mieć aktywność poli(A) lub poli(U) polimeraz [39, 40]. Rodzina TENT5 obejmuje u ludzi cztery różne paralogi TENT5A, B, C oraz D, których funkcja enzymatyczna nie była dotychczas poznana. Wszystkie białka tej rodziny mają taką samą architekturę i każde zawiera jedną domenę katalityczną i, w odróżnieniu od kanonicznych PAP, nie posiadają one domen wiążących RNA. Co ciekawe, mutacje mysiego ortologa powodują zaburzenia procesów erytropoezy (zaobserwowano fenotyp anemii) oraz spermatogenezy. Badania przeprowadzone w ramach studiów doktoranckich przez Meng Tian (laboratorium Prof. Marka Fleminga; Uniwersytet Harvarda) sugerowały, że białko to jest czynnikiem stabilizacji RNA poprzez oddziaływanie z białkiem wiążącym się do traktów poliadeninowych - PABC1 [41]. Zaproponowany w rozprawie doktorskiej model aktywności białka TENT5C wydawał się jednak mocno dyskusyjny. Sekwencjonowanie wyskoprzepustowe typu WGS (*ang: whole-genome sequencing*) oraz WES (*ang: whole-exome sequencing*) kilkuset genomów ludzkich komórek nowotworowych wykazały, że gen *TENT5C* jest jednym z najczęściej zmutowanych genów (po onkogenach *KRAS*, *NRAS*) w szpiczaku mnogim (MM), nowotworze krańcowo zróżnicowanych limfocytów B, charakteryzującym się klonalną proliferacją atypowych plazmocytów, zwykle produkujących znaczne ilości nieprawidłowych przeciwciał monoklonalnych [36, 42, 43]. Jest to drugi z najczęściej występujących nowotworów hematologicznych, który pomimo ogromnych postępów w metodach terapii, wciąż jest chorobą nieuleczalną. Dotychczas zidentyfikowano kilkadziesiąt różnego typu mutacji w *TENT5C* i zwykle są to mutacje powodujące utratę funkcji enzymu. Zaklasyfikowano je jako tzw. mutacje kierujące (*ang. driver mutation*), indukujące zmiany fenotypu, przyspieszające rozwój choroby oraz obniżające średni czas przeżycia pacjenta. Przeprowadzone przeze mnie analizy aktywności *in vitro* z użyciem substratu RNA oraz oczyszczonych rekombinowanych białek TENT5 wykazały, że TENT5C i D są aktywnymi polimerazami poli(A) w obecności ATP i kationów dwuwartościowych (Mn^{2+}) [44]. Analizy *in vitro* pozwoliły potwierdzić przewidziane bioinformatycznie aminokwasy odpowiedzialne za funkcje katalityczne.

Następnie, uzyskałem stabilne linie komórkowe Hek293 (system Flip-in) wyrażające białko TENT5C (WT oraz mutantu katalitycznego) w fuzji ze znacznikiem GFP, co pozwoliło na wykazanie jądro-cytoplazmatycznej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Dodatkowo wykorzystałem wspomniane linie komórkowe do identyfikacji interaktorów białek TENT5C za pomocą techniki immunoprecypitacji z użyciem złoża z immobilizowanymi przeciwciałami rozpoznającymi znacznik GFP, sprzężonej z analizą typu spektrometrii mas. Wykazaliśmy w ten sposób, że białka TENT5C potencjalnie mogą tworzyć heterodimery, nie wchodzą w skład stabilnych kompleksów oraz wytypowałem białka BCCIP oraz PABPC1 jako potencjalne interaktory. Dodatkowo wykorzystując sieciowanie białko-RNA za pomocą światła UV oraz immunoprecypitacji wykazałem, że TENT5C oddziałuje z RNA *in vivo* [44]. W celu stwierdzenia wpływu TENT5C na cząsteczki RNA, z którymi oddziałuje wykorzystałem tzw. *tethering assay*, polegający na wyrażeniu w komórkach genu reporterowego ze zmodyfikowanym UTR posiadającym sekwencje szpilek typu 5box oraz konstruktu badanego białka w fuzji z peptydem N (rozpoznającym struktury typu 5box), wymuszając w ten sposób jego oddziaływanie z RNA. Eksperymenty te wykazały, że TENT5C powoduje zwiększenie poziomu ekspresji genu reporterowego oraz wydłużenie długości jego ogona poli(A) [44]. W związku z tym, że TENT5C jest często zmutowany w szpiczaku mnogim sprawdziłem efekt jego reintrodukcji do komórek linii nowotworowych tego typu hodowanych *in vitro*. W tym celu opracowaliśmy we współpracy z Prof. dr hab. Dominiką Nowis (CENT), zmodyfikowane wektory lentiwirusowe i zoptymalizowaliśmy warunki transdukcji komórek (MM). Pozwoliło to na wykazanie, że ekspresja dzikiego TENT5C, a nie mutantu katalitycznego, jest dla komórek szpiczaka mnogiego nie tylko cytotoksyczna, ale prowadzi również do śmierci komórkowej na drodze apoptozy. Co istotne ekspresja innych niekanonicznych polimeraz poli(A) lub ekspresja TENT5C w innych typach komórek nie powodowała takiego efektu. Wykazałem w ten sposób, że TENT5C jest specyficznym supresorem tego typu nowotworu [44]. Badania te zostały później potwierdzone przez inną grupę badawczą [45]. Kluczowym problemem pozostawała identyfikacja substratów tego enzymu. W tym celu zastosowałem wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA z komórek szpiczaka mnogiego nadeksprymujących TENT5C WT oraz mutantu katalitycznego. Kolejnym krokiem, który zastosowałem było frakcjonowanie RNA w zależności od długości ogona poli(A) z wykorzystaniem zmodyfikowanych oligonukleotydów oraz buforów o różnej sile jonowej. Następnie przygotowałem biblioteki i zsekwencjonowałem RNA z frakcji wejściowej oraz dwóch frakcji zawierających RNA z najdłuższymi ogonami poli(A). Dzięki temu udało mi się zidentyfikować ok. 400 transkryptów, które ulegają poliadenylacji przez TENT5C

w dwóch liniach komórkowych MM, a następnie w wybranych przypadkach potwierdzić ten efekt z użyciem metod niskoprzepustowych takich jak cięcie RNazą H i Northern blot (Rysunek 7).



Rysunek 7. (A) Analiza zmian transkryptomu komórek szpiczaka mnogiego (MM) SKMM1 po nadekspresji dzikiej kopii genu TENT5C (Fam46C). Transkrypty zmienione w istotnie statystyczny sposób zaznaczono kolorem czerwonym, transkrypty zidentyfikowane jako substraty w eksperymencie opartym o frakcjonowanie RNA zgodnie z długością ogonów poli(A), zaznaczono na zielono. **(B)** Analiza typu northern blot wybranych transkryptów (SRR4, CD320, FTL, RN7) w komórkach MM - SKMM1, H929 oraz RAJI (chłoniak Burkitta) po wprowadzeniu dzikiej, katalicznie nieaktywnej kopii TENT5C oraz transgenu kodującego GFP. Źródło – publikacja własna [44].

Co ciekawe, analiza typu *functional annotation* zidentyfikowanych transkryptów mRNA wykazała, że kodują one białka przechodzące przez retikulum endoplazmatyczne (ER), a same mRNA są relatywnie krótkie oraz mają krótkie, bogate w motywy GpU i CpU, sekwencje 3' UTR.

Aby badać fizjologiczną rolę TENT5C na poziomie organizmu skonstruowano w naszym laboratorium we współpracy z Prof. dr hab. Ewą Borsuk (Zakład Embriologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego) oraz Zwierzętarnią Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, za pomocą techniki CRISPR/Cas9 mutanty typu *knock-out* (KO) oraz *knock-in* (FLAG, 3xFLAG oraz GFP) genu TENT5C. Myszy TENT5C KO nie wykazują, żadnych szkodliwych fenotypów wzrostowych czy widocznych zmian morfologicznych. Fenotypowanie tych myszy wykazało nieprawidłowości hematologiczne polegające na lekkiej anemii mikrocytarnej (obniżony poziom hemoglobiny, MHC, MCHC oraz MCV), będącej efektem problemów z syntezą hemoglobiny, a nie wynikającej z niedoboru żelaza [44]. Obserwacje te są zgodne z wcześniej opisywanym w rozprawie doktorskiej Meng Tian (Uniwersytet Harvarda) fenotypem [41].

W dalszej kolejności, wykazałem że poziom ekspresji TENT5C wzrasta podczas aktywacji komórek B, a następnie potwierdziłem jego cytoplazmatyczną lokalizację używając technik opartych na frakcjonowaniu komórek. Analizy proliferacji aktywowanych limfocytów B oparte na barwieniu komórek CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) oraz ich pomiarach cytometrycznych ujawniły, że TENT5C w sposób negatywny reguluje tempo wzrostu [44]. Dodatkowo wyciszenie ekspresji TENT5C w komórkach MM posiadających endogenną dziką kopię tego genu, prowadzi do przyspieszenia ich tempa wzrostu. Obserwacja ta wyjaśnia po części, dlaczego ten gen jest tak istotny dla progresji szpiczaka mnogiego, a jego mutacje są sklasyfikowane jako tzw. mutacje kierujące w tym typie nowotworu.

Podsumowując, nasze badania pozwoliły na wykazanie enzymatycznej funkcji białka kodowanego przez genu *TENT5C (Fam46C)*, co doprowadziło do dyskusji, w rezultacie której nastąpiła zmiana nomenklatury genów kodujących niekanoniczne poli(A) polimerazy. Zaproponowane nowe nazwy - *TENT* (ang. *Terminal Nucleotidyltransferase*) odzwierciedlają funkcje enzymatyczne pełnione przez te białka oraz uporządkowały nomenklaturę w ramach tej grupy enzymów. Nazwa *TENT5C* zastąpiła *Fam46C*, a zmiany w nomenklaturze HUGO wprowadzono 12 kwietnia 2018 roku (ID: HGNC:24712). Moje badania pozwoliły na eksperymentalne potwierdzenie bioinformatycznych przewidywań i rozszerzenie listy ludzkich niekanonicznych poli(A) polimeraz z 7 białek (*PAPD4*, *U6* TUTaza, *mtPAP*, *GLD4*, *POLS*, *ZCCHC6* i *ZCCHC11*) do 11 (dodatkowo *TENT5A*, *TENT5B*, *TENT5C*, *TENT5D*).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

5.1 Dane bibliometryczne:

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) czasopism, w których ukazały się publikacje nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania – 59,446.

Sumaryczna liczba punktów MNiSW za publikacje nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – 160.

Liczba cytowań publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia 12.04.2019: wg bazy Web of Science – 151; wg Google Scholar – 197.

5.2 Lista publikacji niebędących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

1. Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. Wrobel L, Topf U, Bragoszewski P, Wiese S, Sztolsztener ME, Oeljeklaus S, Varabyova A, Lirski M, Chroscicki P, **Mroczek S**, Januszewicz E, Dziembowski A, Koblowska M, Warscheid B, Chacinska A. **Nature. 2015 Aug 27;524(7566):485-8.**

IF₂₀₁₅ – 38.138; IF_{5-letni} – 44.959; punktacja MNiSW₂₀₁₈ – 50; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 96; wg Google Scholar – 120.

2. A novel route for preparing 5'cap mimics and capped RNAs: phosphate-modified cap analogues obtained via click chemistry; Walczak S, Nowicka A, Kubacka D, Fac K, Wanat P, **Mroczek S**, Kowalska J, Jemielity J; **Chem Sci. 2017 Jan 1;8(1):260-267.**

IF₂₀₁₇ – 9.063; IF_{5-letni} – 8.757; punktacja MNiSW₂₀₁₈ – 40; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 11; wg Google Scholar – 12.

3. Increased levels of RNA oxidation enhance the reversion frequency in aging pro-apoptotic yeast mutants. Stirpe M, Palermo V, Ferrari M, Mroczek S, Kufel J, Falcone C, Mazzoni C.; **Apoptosis. 2017 Feb;22(2):200-206.**

IF₂₀₁₇ – 3.967; IF_{5-letni} – 3.812; punktacja MNiSW₂₀₁₈ – 30; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 2; wg Google Scholar – 4. Wyniki opublikowane w tej pracy uzyskano podczas wykonywania pracy doktorskiej.

4. Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast. Mroczek S, Kufel J. **Nucleic Acids Res. 2008 May;36(9):2874-88.**

IF₂₀₀₈ – 8.278; IF_{5-letni} – 10.235; punktacja MNiSW₂₀₁₈ – 40; liczba cytowań: wg bazy Web of Science – 42; wg Google Scholar – 61. Wyniki opublikowane w tej pracy uzyskano podczas wykonywania pracy doktorskiej.

5.3 Krótkie streszczenie osiągnięć naukowych niebędących podstawą wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

1. Opisanie nowego mechanizmu chroniącego komórki drożdży przed skutkami zaburzeń importu białek do mitochondriów - UPRam (ang. *Unfolded Protein Response activated by mistargeted proteins*). Publikacja nr 1.

Mitochondria to struktury wewnątrzkomórkowe odpowiedzialne za produkcję energii. Pomimo że posiadają własny relatywnie niewielki genom większość białek niezbędnych do ich prawidłowego funkcjonowania jest importowana z cytozolu. W pracy opisano po raz pierwszy istnienie mechanizmów broniących komórki przed akumulacją białek mitochondrialnych, które nie zostały dostarczone do *organellum*. Mechanizm ten nazwano UPRam (ang. *Unfolded Protein Response activated by mistargeted proteins*) i polega on na uruchomieniu systemu degradacji białek przez proteasom oraz obniżeniu tempa translacji w cytozolu. Wykazaliśmy zatem, że istnieje zależność pomiędzy stanem mitochondriów, a systemami utrzymującymi homeostazę białek w komórce, chroniącymi je przed toksycznym wpływem agregatów białkowych.

2. Synteza nowych analogów nukleotydów zawierających triazol w obrębie mostka oligofosforanowego jako mimiki czapeczki 5' mRNA - właściwości chemiczne i wbudowywanie do mRNA na końcu 5'. Publikacja nr 2.

Struktura 7-metyloguanozyny (m^7G) na 5'-końcu eukariotycznych mRNA zwana czapeczką jest modyfikacją odgrywającą zasadniczą rolę w regulacji jego stabilności oraz w transporcie i translacji. Poszukiwanie chemicznych analogów 5' czapeczki ma zatem ogromny potencjał jako narzędzie badawcze, diagnostyczne oraz potencjalne zastosowanie w terapiach opartych na bazie zmodyfikowanego RNA. W pracy opisano 34 warianty syntezy analogów czapeczki (5',5'-dinukleotydów) z wykorzystaniem reakcji cykloaddycji azydków do alkinów katalizowanej miedzią w warunkach redukujących, zgodnie z koncepcją tzw. *click chemistry* (CuCAA; *Cu-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*). Reakcje przeprowadzono w różnych wariantach, które polegały na łączeniu zmodyfikowanych 5'-mononukleotydów posiadających grupy alkinowe lub azydkowe z utworzeniem grupy 1,2,3-triazolowej w obrębie mostka oligofosforanowego. Przetestowano dodawanie wybranych analogów do 5'-końca RNA podczas reakcji transkrypcji *in vitro* oraz post-transkrypcyjnie. Następnie, oceniono powinowactwo analogów czapeczki do eukariotycznego czynnika inicjacji translacji 4E (eIF4E) oraz podatność na hydrolizę przez enzym usuwający czapeczkę - DcpS (*decapping scavenger*). Zbadano również, wpływ analogów czapeczki posiadających strukturę triazolową na wydajność translacji mRNA kodującego lucyferazę w ekstraktach

komórkowych. Finalnie pozwoliło to na identyfikację dwóch analogów m^7Gppp -triazol- C_2H_4NHpG oraz $m^7GpppCH_2$ -triazol- C_2H_4NHpG , mających zbliżone właściwości do niemodyfikowanego analogu czapeczki w mRNA (m^7GpppG).

3. Badanie metabolizmu rRNA w odpowiedzi na stres oksydacyjny w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Publikacje nr 3 i 4. Badania przeprowadzone w ramach studiów doktoranckich.

Prawidłowe działanie aparatu translacyjnego jest kluczowe dla funkcjonowania komórek i ulega precyzyjnej regulacji w trakcie cyklu komórkowego i ich wzrostu, zaś dojrzałe rybosomy oraz proces ich syntezy są jednym z pierwszych celów podczas różnego typu odpowiedzi stresowych. Podjęte przez mnie w ramach studiów doktoranckich badania pozwoliły rozszerzyć wiedzę w zakresie metabolizmu rRNA, w warunkach stresu oksydacyjnego i apoptozy. Jako organizm modelowy wykorzystałem drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, u których, w ostatnich latach, wykazano istnienie programowanej śmierci komórkowej (PCD, ang. *programmed cell death*) [46]. Proces ten ma w organizmach jednokomórkowych, takich jak drożdże, głównie funkcje adaptacyjne, pozwalające populacji na przetrwanie w trudnych i zmiennych warunkach środowiskowych. Apoptotyczne komórki drożdżowe wykazują typowe markery PCD, m.in. fragmentację DNA, eksternalizację fosfatydyloserynu w błonie komórkowej, kondensację chromatyny, czy uwalnianie białek z permeabilizowanych mitochondriów. Jednym z istotnych etapów śmierci komórek jest degradacja kwasów nukleinowych, co zostało najlepiej zbadane w przypadku fragmentacji DNA w komórkach ludzkich. Procesy degradacji RNA w czasie PCD były dotychczas słabo udokumentowane. Moje badania wykazały, że składniki RNA dużej podjednostki rybosomu, 25S i 5.8S rRNA są specyficznie degradowane w odpowiedzi na bodźce apoptotyczne. Produkty rozkładu rRNA wchodzi w skład mono- i polirybosomów, co najprawdopodobniej przyczynia się do dysocjacji podjednostek rybosomów z transkryptów mRNA i hamowania translacji. Prawdopodobny mechanizm specyficznego degradacji rRNA może obejmować rekrutowanie nukleaz do rybosomu i nacinanie dostępnych struktur w cząsteczce. Wykazałem, że zjawisko to jest skorelowane z poziomem wolnych rodników w komórce i jest zależne od enzymatycznych i nieenzymatycznych systemów antyoksydacyjnych, a także od aktywności mitochondriów. Co ciekawe, niektóre produkty rozkładu rRNA są stabilne i ulegają akumulacji, i nie można wykluczyć, że cząsteczki te pełnią funkcje regulatorowe w komórce, np. w procesach sygnałowych podczas przebiegu apoptozy, lub też są kierowane na ścieżkę degradacji. Opisałem również istnienie korelacji pomiędzy

początkowym poziomem komórkowego rRNA, który odzwierciedla ilość rybosomów, a przeżywalnością komórek w stresie oksydacyjnym i apoptozie.

Zidentyfikowałem ponadto enzymy biorące bezpośredni udział w apoptotycznym rozkładzie rRNA: mitochondrialną nukleazę Nuc1 (homolog ludzkiego EndoG, które jest istotnym czynnikiem degradacji DNA w apoptozie u wyższych eukariontów), cytoplazmatyczny kompleks egzozomu (katalityczna podjednostka Dis3 oraz kofaktor Ski7) oraz RNazę MRP (podjednostki Rrp2 i Pop1).

Analizując kinetykę zmian transkrypcji 35S pre-rRNA za pomocą metody „*transcription run-on*”, powiązanej z oceną rozkładu Pol I na genach rDNA przy pomocy immunoprecypitacji chromatyny (ChIP), wykazałem że wczesna odpowiedź komórek na stres oksydacyjny obejmuje bardzo szybkie zahamowanie syntezy transkryptów rRNA, poprzez spadek rekrutacji czynnika transkrypcyjnego Rrn3 odpowiedzialnego za składanie kompleksu polimerazy. Dodatkowo, posługując się metodą metabolicznego znakowania nowopowstających transkryptów ³H-uracylem (ang: *pulse chase*) pokazałem również, że wczesną odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny jest również zahamowanie obróbki cząsteczek prekursorów rRNA, a przez to syntezy dojrzałych rybosomów. Dodatkowo, we współpracy z Prof. Cristiną Mazzoni z Uniwersytetu Rzymskiego „La Sapienza”, zajmowałem się badaniem zjawiska oksydacji RNA (modyfikacja guanozyny do 8-oxo-7,8-dihydroguanozyny; 8OHG) oraz wpływem tego procesu na starzenie i śmierć komórek drożdży na drodze apoptozy [47].

Wyniki uzyskane w czasie studiów doktoranckich pozwalają rozpatrywać biosyntezę rybosomów jako jeden z kluczowych szlaków efektorowych odpowiedzi komórki na różne rodzaje stresu prowadzące do zaburzenia homeostazy procesów komórkowych i były pierwszym mechanistycznym opisem tego zjawiska w drożdżach.

5.4 Kierowanie i udział w projektach naukowych:

2018-2021 OPUS 14; Narodowe Centrum Nauki. „Rola FAM46C w fizjologii komórek B” nr (2017/27/B/NZ2/01234) - **kierownik projektu.**

2013-2016 Iuventus Plus Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego; IP2012 046272. „Rola 3' fosforanu w stabilności cząsteczki U6 snRNA w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*” - **kierownik projektu.**

2012-2017 - ERC starting grant („Ideas”) Projekt pt.: "Regulacja ekspresji genów przez niekanoniczne poli(A) i poli(U) polimerazy", Instytut Biochemii i Biofizyki PAN - **wykonawca projektu.**

2009-2013 TEAM\2008-2\1 "Macromolecular assemblies involved in RNA metabolism", Instytut Biochemii i Biofizyki PAN - **wykonawca projektu.**

2007-2009 NN301392733: „Badanie udziału mitochondrialnej nukleazy Nuc1p w degradacji RNA w apoptozie/stresie oksydacyjnym u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii – grant promotorski, **wykonawca projektu.**

2005-2008 140-501/62/F-205: **Wellcome Trust Grant** International Senior Fellowship in Biological Sciences for Central Europe 067504/Z/02/Z (pol.). "*Biogenesis of small stable RNAs in eukaryotic cells: 3' end processing, RNP assembly, degradation*", Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii - **wykonawca projektu.**

2005-2008 501/140000/78-518280: **European Commission Grant** (FP6, STREP), "Systems biology of RNA metabolism in yeast", Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii. - **wykonawca projektu.**

2005-2008 Projekty w ramach badań własnych, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii – **kierownik projektów.**

5.5 Udział i w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Byłem współautorem doniesień zjazdowych na następujących konferencjach:

11-16.06.2011; 25th INTERNATIONAL CONFERENCE ON YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY; Polska/Olsztyn; Structural and biochemical characterization of the THO complex reveals its architecture and mechanism of nucleic acids recognition. **Plakat.**

11-16.06.2011; 25th INTERNATIONAL CONFERENCE ON YEAST GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY; Polska/Olsztyn; Identification of the enzyme responsible for the essential modification of the U6 snRNA 3' end. **Prezentacja ustna i plakat.**

30.06-1.07.2011; EMBO Young Scientists Forum; Polska/Warszawa; Structural features of the THO complex enabling its chromatin recruitment for co-transcriptional mRNP formation. **Plakat.**

30.06-1.07.2011; EMBO Young Scientists Forum; Polska/Warszawa; Identification of the enzyme responsible for the essential modification of the U6 snRNA 3' end; **Plakat.**

11-16.06.2013; Degradation of ribosomal RNA and ribosomal proteins constitute separate pathways of ribophagy, RNA The 18th Annual Meeting of the RNA Society; Davos/Switzerland; **Plakat.**

26 - 28.04.2017; TERM15; Conference Sant Feliu de Guixols/Hiszpania; **Prezentacja ustna.**

10–13.09.2017; EMBO Workshop; To-B or not to-B: B-cells in health and disease; Girona/ Hiszpania; **Plakat.**

18-21.09.2018; Congress BIO2018 "The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C regulates B-cells proliferation and acts as an onco-suppressor in multiple myeloma"; Gdańsk/Polska; **Prezentacja ustna.**

21–25.10.2018; EMBO Workshop: "Endoplasmic reticulum function in health and disease"; Lucca/Włochy; **Plakat.**

11-14.05.2019; ECTS Congress; A new mouse model for *Osteogenesis imperfecta* reveals a link between polyadenylation by TENT5A and the pathogenesis of the disease; Budapeszt/Węgry; **Plakat.**

22-24.05.2019; Nanopore London Calling; The non-canonical poly(A) polymerase TENT5C regulates B cells differentiation and immunoglobulins expression as revealed by modified Nanopore direct RNA Sequencing; Londyn/UK; **Plakat.**

11-16.06.2019; 24th RNA Meeting; Kraków/Polska; "Non-canonical poly(A) polymerase TENT5C regulates immunoglobulins expression and B cells differentiation"; **Plakat.**

6. Wykaz najważniejszej literatury dotyczącej problematyki wniosku.

1. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosome structure and function*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
2. Hoskins, A.A. and M.J. Moore, *The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(5): p. 179-88.
3. Turunen, J.J., et al., *The significant other: splicing by the minor spliceosome*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(1): p. 61-76.
4. Yean, S.L., et al., *Metal-ion coordination by U6 small nuclear RNA contributes to catalysis in the spliceosome*. Nature, 2000. **408**(6814): p. 881-4.
5. Raghunathan, P.L. and C. Guthrie, *A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles*. Science, 1998. **279**(5352): p. 857-60.
6. Mroczek, S. and A. Dziembowski, *U6 RNA biogenesis and disease association*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(5): p. 581-92.
7. Lund, E. and J.E. Dahlberg, *Cyclic 2',3'-phosphates and nontemplated nucleotides at the 3' end of spliceosomal U6 small nuclear RNA's*. Science, 1992. **255**(5042): p. 327-30.
8. Gu, J., et al., *Formation of 2',3'-cyclic phosphates at the 3' end of human U6 small nuclear RNA in vitro. Identification of 2',3'-cyclic phosphates at the 3' ends of human signal recognition particle and mitochondrial RNA processing RNAs*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 21989-93.
9. Ginalski, K. and L. Rychlewski, *Detection of reliable and unexpected protein fold predictions using 3D-Jury*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3291-2.
10. Ginalski, K., et al., *3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions*. Bioinformatics, 2003. **19**(8): p. 1015-8.
11. Ginalski, K., et al., *Detecting distant homology with Meta-BASIC*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W576-81.
12. Larizza, L., G. Roversi, and L. Volpi, *Rothmund-Thomson syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2010. **5**: p. 2.
13. Mroczek, S., et al., *C16orf57, a gene mutated in poikiloderma with neutropenia, encodes a putative phosphodiesterase responsible for the U6 snRNA 3' end modification*. Genes Dev, 2012. **26**(17): p. 1911-25.

14. Aravind, L. and E.V. Koonin, *DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(7): p. 1609-18.
15. Clericuzio, C., et al., *Identification of a novel C16orf57 mutation in Athabaskan patients with Poikiloderma with Neutropenia*. Am J Med Genet A, 2011. **155A**(2): p. 337-42.
16. Concolino, D., et al., *Clericuzio-type poikiloderma with neutropenia syndrome in three sibs with mutations in the C16orf57 gene: delineation of the phenotype*. Am J Med Genet A, 2010. **152A**(10): p. 2588-94.
17. Mason, P.J. and M. Bessler, *Poikiloderma with neutropenia: beginning at the end*. Blood, 2013. **121**(6): p. 872-4.
18. Trippe, R., et al., *Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase*. RNA, 2006. **12**(8): p. 1494-504.
19. Yamashita, S., et al., *Crystal structures of U6 snRNA-specific terminal uridylyltransferase*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15788.
20. Genschik, P., et al., *The human RNA 3'-terminal phosphate cyclase is a member of a new family of proteins conserved in Eucarya, Bacteria and Archaea*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2955-67.
21. Shchepachev, V., et al., *Mpn1, mutated in poikiloderma with neutropenia protein 1, is a conserved 3'-to-5' RNA exonuclease processing U6 small nuclear RNA*. Cell Rep, 2012. **2**(4): p. 855-65.
22. Hilcenko, C., et al., *Aberrant 3' oligoadenylation of spliceosomal U6 small nuclear RNA in poikiloderma with neutropenia*. Blood, 2013. **121**(6): p. 1028-38.
23. Didychuk, A.L., et al., *Usb1 controls U6 snRNP assembly through evolutionarily divergent cyclic phosphodiesterase activities*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 497.
24. Zhou, L., et al., *Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3' end sequence of U6 small nuclear RNA*. Nature, 2014. **506**(7486): p. 116-20.
25. Delaleau, M. and K.L. Borden, *Multiple Export Mechanisms for mRNAs*. Cells, 2015. **4**(3): p. 452-73.
26. Bjork, P. and L. Wieslander, *Mechanisms of mRNA export*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **32**: p. 47-54.
27. Beck, M. and E. Hurt, *The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016.

28. Jimeno, S. and A. Aguilera, *The THO complex as a key mRNP biogenesis factor in development and cell differentiation*. J Biol, 2010. **9**(1): p. 6.
29. Heath, C.G., N. Viphakone, and S.A. Wilson, *The role of TREX in gene expression and disease*. Biochem J, 2016. **473**(19): p. 2911-35.
30. Gewartowski, K., et al., *The yeast THO complex forms a 5-subunit assembly that directly interacts with active chromatin*. Bioarchitecture, 2012. **2**(4): p. 134-7.
31. Pena, A., et al., *Architecture and nucleic acids recognition mechanism of the THO complex, an mRNP assembly factor*. EMBO J, 2012. **31**(6): p. 1605-16.
32. Flemming, D., et al., *Precise mapping of subunits in multiprotein complexes by a versatile electron microscopy label*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(6): p. 775-8.
33. Gomez-Gonzalez, B., et al., *Genome-wide function of THO/TREX in active genes prevents R-loop-dependent replication obstacles*. EMBO J, 2011. **30**(15): p. 3106-19.
34. Koper, M. and S. Mroczek, *Analysis of rRNA synthesis using quantitative transcription run-on (qTRO) in yeast*. Biotechniques, 2018. **65**(3): p. 163-168.
35. Kim, J.H. and J.D. Richter, *Measuring CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation-deadenylation in Xenopus laevis oocytes and egg extracts*. Methods Enzymol, 2008. **448**: p. 119-38.
36. Labno, A., et al., *Perlman syndrome nuclease DIS3L2 controls cytoplasmic non-coding RNAs and provides surveillance pathway for maturing snRNAs*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(21): p. 10437-10453.
37. Warkocki, Z., et al., *Uridylation by TUT4/7 Restricts Retrotransposition of Human LINE-1s*. Cell, 2018. **174**(6): p. 1537-1548 e29.
38. Lim, J., et al., *Mixed tailing by TENT4A and TENT4B shields mRNA from rapid deadenylation*. Science, 2018. **361**(6403): p. 701-704.
39. Kuchta, K., et al., *Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(22): p. 7701-14.
40. Kuchta, K., et al., *FAM46 proteins are novel eukaryotic non-canonical poly(A) polymerases*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(8): p. 3534-48.
41. Tian, M., *The molecular cloning and characterization of Fam46c RNA stability factor*. Harvard University; PhD dissertation. 2010.

42. Chapman, M.A., et al., *Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 467-72.
43. Lohr, J.G., et al., *Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy*. Cancer Cell, 2014. **25**(1): p. 91-101.
44. Mroczek, S., et al., *The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma*. Nature Communications, 2017. **8**(1).
45. Zhu, Y.X., et al., *Loss of FAM46C Promotes Cell Survival in Myeloma*. Cancer Res, 2017. **77**(16): p. 4317-4327.
46. Carmona-Gutierrez, D., et al., *Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines*. Cell Death Differ, 2010. **17**(5): p. 763-73.
47. Stirpe, M., et al., *Increased levels of RNA oxidation enhance the reversion frequency in aging pro-apoptotic yeast mutants*. Apoptosis, 2017. **22**(2): p. 200-206.

Seweryn Mroczek