

**Dr Kinga Kamieniarz-Gdula**

**AUTOREFERAT**

**Mechanizmy procesu terminacji transkrypcji  
oraz jego znaczenie w regulacji ekspresji genów**

**1. Imię i Nazwisko:** Kinga Kamieniarz-Gdula (nazwisko rodowe: Kamieniarz)

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

- 01/2011      **Doktor nauk przyrodniczych** (doctor rerum naturalium)  
Praca doktorska pt. "Functional analysis of linker histone H1 modifications and variants", promotorzy: Dr Robert Schneider oraz Prof. Rudolf Grosschedl, Uniwersytet im. Alberta Ludwiga we Fryburgu i. Br., Niemcy
- 03/2007      **Licencjat biologii, specjalność: bioinformatyka**  
Praca licencjacka pt. "Analiza *in silico* funkcji zewnątrzkomórkowej domeny podjednostki GluR2 receptora AMPA w rozwoju kolców dendrytycznych", promotor: prof. dr hab. Wojciech Karłowski, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- 05/2006      **Magister biotechnologii**  
Praca magisterska pt. "Identyfikacja infekcji *Leptotrichia amnionii* i *Gardnerella vaginalis* w wymazach z szyjki macicy", promotor: prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- 07/2004      **Licencjat biotechnologii**  
Praca licencjacka pt. "Zastosowanie AAV jako wektorów w terapii genowej", promotor: prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

06/2012 – obecnie

Postdoc, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, Wielka Brytania

02/2011-05/2012

Postdoc, Max-Planck-Institute of Immunobiology and Epigenetics, Fryburg, Niemcy

10/2006-01/2011

Doktorant, International Max Planck Research School for Molecular and Cellular Biology (IMPRS-MCB), Max-Planck-Institute of Immunobiology and Epigenetics, Fryburg, Niemcy

**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:**

*Mechanizmy procesu terminacji transkrypcji oraz jego znaczenie w regulacji ekspresji genów*

**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu publikacji, których sumaryczny impact factor wynosi 73.974.

1: White E, **Kamieniarz-Gdula K**, Dye MJ, Proudfoot NJ. *AT-rich sequence elements promote nascent transcript cleavage leading to RNA polymerase II termination*. Nucleic Acids Res. 2013 Feb 1;41(3):1797-806. IF 2013 = 8.808

2: Skourti-Stathaki K, **Kamieniarz-Gdula K**, Proudfoot NJ. *R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators*. Nature. 2014 Dec 18;516(7531):436-9. IF 2014 = 41.456

3: Volanakis A\*, **Kamieniarz-Gdula K<sup>#</sup>**, Schlackow M, Proudfoot NJ. *WNK1 kinase and the termination factor PCF11 connect nuclear mRNA export with transcription*. Genes Dev. 2017 Nov 1;31(21):2175-2185. IF 2017 = 9.462

4: **Kamieniarz-Gdula K<sup>#</sup>**, Gdula MR\*, Panser K, Nojima T, Monks J, Wiśniewski JR, Riepsaame J, Brockdorff N, Pauli A, Proudfoot NJ. *Selective Roles of Vertebrate PCF11 in Premature and Full-Length Transcript Termination*. Mol Cell. 2019 Apr 4;74(1):158-172.e9. IF 2017 (latest available) = 14.248

5: **Kamieniarz-Gdula K<sup>#</sup>**, Proudfoot N. *Transcriptional control by premature termination: a forgotten mechanism*. PeerJ 2019 Mar <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27590v1> (Preprint of review article in press in August 2019 issue of Trends in Genetics)

\* dzielone pierwsze autorstwo

# Autorstwo korespondencyjne habilitantki

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

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu publikacji, które powstały w wyniku mojego stażu podoktorskiego w laboratorium profesora Nicholasa Proudfoota na Uniwersytecie Oxfordzkim pomiędzy czerwcem 2012 a kwietniem 2019.

**Celem naukowym prac było uzyskanie lepszego zrozumienia mechanizmów prowadzących do terminacji transkrypcji, jak również wskazanie roli, jaką terminacja transkrypcji odgrywa w regulacji ekspresji genów.**

Transkrypcja za pośrednictwem RNA polimerazy II (Pol II) odbywa się w cyklu inicjacji, elongacji i terminacji. Terminacja transkrypcji zatrzymuje syntezę RNA poprzez uwolnienie Pol II oraz RNA z matrycy DNA. Proces ten jest niezbędny dla wydajnej i prawidłowej ekspresji genów z kilku powodów. Po pierwsze, terminacja zaznacza końce jednostek transkrypcyjnych i uwalnia transkrypty, aby mogły spełnić swoje biologiczne zadania. Po drugie, zapewnia dostępność Pol II dla kolejnych rund syntezy RNA. Po trzecie, terminacja ogranicza też zasięg niekodującej transkrypcji (Jensen et al., 2013; Porrua et al., 2016; Proudfoot, 2016). Terminacja jest mechanistycznie powiązana z obróbką 3' końca pre-mRNA. Pol II staje się zdolna do terminacji po transkrybowaniu sygnału poliadenylacji (ang. polyadenylation signal, poly(A) signal). Sygnał poliadenylacji w rodzącym się RNA jest rozpoznawany przez maszynę obróbki 3' końca RNA, która powoduje cięcie i poliadenylację RNA (ang. cleavage and polyadenylation, CPA) 10-30 nukleotydów poniżej, w tzw. miejscu poliadenylacji (ang. polyadenylation site, PAS) (Proudfoot, 2011). Chociaż cięcie i poliadenylacja RNA (CPA) zachodzi w określonych miejscach (PAS), to Pol II może kontynuować transkrypcję dalszych sekwencji

odłączając się od DNA (tj. terminując transkrypcję) w szerokim oknie genomowym za PAS. Większość ssaczych genów zawiera wiele alternatywnych sygnałów poliadenylacji, wytwarzane są więc RNA o różnych 3' końcach, co nazywane jest alternatywną poliadenylacją (APA) (Tian and Manley, 2017).

W 2012 roku, kiedy dołączyłam do grupy prowadzonej przez prof. Proudfoota, wszystkie dotychczas opublikowane prace z jego grupy bazowały na analizie pojedynczych, modelowych genów. Było to istotnym ograniczeniem dla laboratorium zajmującego się transkrypcją, ponieważ w latach dwutysięcznych zsekwencjonowano ludzi genom oraz wprowadzono technologie sekwencjonowania nowej generacji, które umożliwiały badanie transkrypcji cało-genomowo. Byłam pierwszą osobą w laboratorium posiadającą umiejętności bioinformatyczne i doświadczenie w genomice, dlatego moja początkowa praca miała na celu poszerzenie istniejących eksperymentalnych danych w laboratorium przez meta-analizę opublikowanych przez inne grupy zestawów danych genomowych. To doprowadziło do czterech współautorskich publikacji (White et al., 2013; Skourti-Stathaki et al., 2014; White et al., 2014; Hatchi et al., 2015), z których dwie pierwsze prace wchodziły w skład osiągnięcia naukowego. **Publikacje 1** (White et al., 2013) i **2** (Skourti-Stathaki et al., 2014) były pracami mającymi na celu lepsze zrozumienie dwóch różnych mechanizmów terminacji transkrypcji u ssaków: terminacji typu współtranskrypcyjnego cięcia (ang. cotranscriptional cleavage, CoTC) (White et al., 2013) oraz terminacji zależnej od zatrzymania Pol II (Skourti-Stathaki et al., 2014). Wszystkie prace doświadczalne w tych dwóch publikacjach były wykonane przez, odpowiednio, dr Eleanor White oraz dr Konstantinę Skourti-Stathaki. Mój udział polegał na przeniesieniu wyników ich badań na jednym genie do poziomu genomowego przez analizę bioinformatyczną, głównie używając opublikowanych zestawów danych sekwencjonowania nowej generacji (NGS).

Terminacja Pol II zależna jest od sygnałów obróbki RNA jak również specyficznych elementów terminatorowych, zlokalizowanych poniżej miejsca poliadenylacji (PAS). Jedną z dwóch głównych klas terminatorów opisanych do tej pory jest element współtranskrypcyjnego cięcia CoTC. W **publikacji 1** (White, Kamieniarz-Gdula et al., 2013) pokazaliśmy, że obszary homopolimerów A/T znajdujące się w terminatorze ludzkiego genu  $\beta$ -globiny odgrywają decydującą rolę w terminacji Pol II. Wykorzystałam analizę mutacji przeprowadzoną przez dr White, jak również we wcześniejszej opublikowanej pracy o CoTC (Dye and Proudfoot, 2001) do zdefiniowania zbioru funkcjonalnych i niefunkcjonalnych terminatorów pochodnych od ludzkiej  $\beta$ -globiny. Komputerowa analiza tego zbioru pozwoliła mi zaproponować uproszczony motyw obszaru 9 AT (ang. 9 AT tract), który odpowiada dziewięciu rozproszonym obszarom AT o długości minimum 5 nukleotydów, przedzielonym przez co najmniej jeden nukleotyd G lub C. Dopasowanie wzorów ujawniło, że 70% regionów terminatorowych w genomie człowieka zawiera ten motyw, ale jest on też powszechny w innych rejonach genomu, np. 67% rejonów promotorowych również zawiera ten motyw. Sytuacja ta wygląda podobnie w przypadku motywu 'TATA box' (TATAAAA), który jest obecny w 37% rejonów promotorowych, jak również w 40% rejonów terminatorowych. Moja analiza sugeruje, że sama obecność motywu takiego jak 'TATA box' albo '9 AT tract' nie gwarantuje inicjacji/terminacji. Przewidujemy, że kiedy Pol II natrafia na motyw '9 AT tract' we właściwym kontekście, tj. za funkcjonalnym PAS, to wówczas motyw ten może prowadzić do terminacji transkrypcji. Żeby potwierdzić, że zidentyfikowane komputerowo motywy '9 AT tract' mają zdolność funkcjonowania jako elementy terminatorowe, dwa takie motywy zostały sklonowane i ich zdolność do wywoływania terminacji transkrypcji zweryfikowana eksperymentalnie. Podsumowując, nasze dane wspierają koncepcję, że terminacja transkrypcji typu CoTC może być szeroko rozpowszechnionym fenomenem.

Poza terminacją transkrypcji typu CoTC, inny opisany mechanizm działający w komórkach ssaczych to terminacja transkrypcji zależna od zatrzymania Pol II (ang. pause-type). W przypadku terminacji 'pause-type', cięcie RNA na PAS umożliwia dostęp dla egzonukleazy 5'-3' XRN2, która degradowuje

rodzący się RNA prowadząc do terminacji. Elementy zatrzymujące Pol II wspierają proces terminacji przez zwolnienie procesu elongacji, umożliwiając ‘dogonienie’ Pol II przez XRN2 (Gromak et al., 2006). Poprzednio wykazano, że pętle R (ang. R-loops, trzyniciowe struktury kwasów nukleinowych, składające się z hybrydy DNA:RNA oraz pojedynczo-niciowego DNA), ułatwiają zatrzymywanie się Pol II przed wydajną terminacją (Skourti-Stathaki et al., 2011), ale sposób w jaki się to odbywa nie był jasny. W **publikacji 2** (Skourti-Stathaki, Kamieniarz-Gdula i Proudfoot, 2014) opisaliśmy mechanizm terminacji transkrypcji odbywający się za pośrednictwem pętli R. Pokazaliśmy, że pętle R wywołują transkrypcję antysensowną na bogatym w guaniny elemencie terminatorowym genu  $\beta$ -aktyny. To prowadzi do rekrutacji białek wyciszających DICER, AGO1, AGO2 oraz metyltransferazy histonowej G9a, a następnie do ustanowienia represyjnego znacznika H3K9me2 oraz przyłączenia się białka heterochromatynowego HP1 $\gamma$ . Wspólnie te wydarzenia wspierają zatrzymanie się Pol II przed wydajną terminacją transkrypcji. Użyłam następnie dostępnych publicznie zestawów danych dla Pol II, G9a, HP1 $\gamma$  oraz pętli R i wykonałam meta-analizę genomową identyfikując 2299 rejonów terminatorowych, które jak przewidujemy związane są z terminacją transkrypcji ‘pause-type’ związanej z obecnością pętli R. To poszerzyło ciekawe wyniki z genu  $\beta$ -aktyny do kontekstu całogenomowego. Kilka ze zidentyfikowanych komputerowo nowych rejonów terminacji typu pause-type zostało zweryfikowane eksperymentalnie. Udało nam się też dodatkowo potwierdzić powszechność tego mechanizmu terminacji przez całogenomowy pomiar zatrzymywania się Pol II przy użyciu metody ChIP-seq, w warunkach zahamowania formowania się pętli R oraz H3K9me2. Podsumowując, ujawniliśmy nieoczekiwane połączenie między pętlami R a zależnym od interferencji RNA formowaniem się znacznika heterochromatynowego H3K9me2 na terminatorach ‘pause-type’ na ssaczyc genach kodujących białka. Przewidujemy, że pętle R wspierają tworzenie się struktury chromatynowej, która określa rejony terminatorowe dla znaczącego podzbioru ssaczyc genów.

Podczas gdy publikacje 1 i 2 skupiały się na mechanizmach prowadzących do terminacji transkrypcji, moja dalsza praca miała na celu lepsze zrozumienie roli, jaką terminacja transkrypcji odgrywa w regulacji ekspresji genów. W tym celu zdecydowałam się zbadać białko PCF11, o którym było wiadomo z badań nad drożdżami, że jest kluczowym czynnikiem nie tylko dla terminacji transkrypcji, ale również działającym na pograniczu kilku procesów jądrowych, tymczasem nie zostało ono dobrze scharakteryzowane u człowieka. PCF11 pełni ważną rolę w cięciu i poliadenylacji RNA (CPA) (Amrani et al., 1997; de Vries et al., 2000; Gross and Moore, 2001), terminacji transkrypcji (Sadowski et al., 2003; Zhang et al., 2005; Zhang and Gilmour, 2006; West and Proudfoot, 2008) oraz jądrowym eksporcie mRNA (Johnson et al., 2009).

Jednym z pierwszych doświadczeń, które poprowadziło do **publikacji 3** (Volanakis, Kamieniarz-Gdula et al., 2017) było ustalenie przeze mnie modyfikacji post-translacyjnych endogenego ludzkiego PCF11 przy pomocy spektrometrii mas. Moje zainteresowanie modyfikacjami post-translacyjnymi podyktowane było tym, że są one zaangażowane w przekazywanie sygnału i często pełnią funkcje regulatorowe. Spośród wielu modyfikacji, które wykryłam, moją uwagę zwróciło miejsce fosforylacji na serynie 120 i/lub treoninie 121 (S120/T121) znajdujące się w domenie PCF11 odpowiedzialnej za jego oddziaływanie z C-terminalną domeną (CTD) największej podjednostki Pol II. Powodem mojego zainteresowania było to, że domena PCF11 oddziałująca z CTD (ang. CTD-interacting domain, CID) u drożdży jest kluczowa dla procesu terminacji transkrypcji (Sadowski et al., 2003). Modelowanie struktury trzeciorzędowej ludzkiego PCF11 *in silico*, na bazie struktury krystalograficznej drożdżowego PCF11 znajdującego się w kompleksie z peptydem CTD (Meinhart and Cramer, 2004), pozwoliło mi przewidzieć, że fosforylacja w tym miejscu prawdopodobnie prowadzi do osłabienia oddziaływania między PCF11 a Pol II. W prowadzonych równolegle doświadczeniach wykryłam partnerów interakcyjnych ludzkiego PCF11 przy pomocy spektrometrii mas. W moich preparatach wykryłam tylko jedną kinazę, WNK1. Było to dla mnie zaskoczeniem, ponieważ dotychczas kinaza

WNK1 znana była jako regulator transportu jonowego, zlokalizowany w cytoplazmie (Shekarabi et al., 2017), i nie były znane żadne jądrowe funkcje tego enzymu. Tymczasem, w wyraźny i powtarzalny sposób wykrywałam interakcję pomiędzy PCF11 oraz WNK1 w ekstraktach z jądra komórkowego. Co ciekawe, kinazo-specyficzne przewidywanie *in silico* miejsc fosforylacji na PCF11, okazało się, że uzyskane przewidywania wskazały na to, że rodzina kinaz WNK jest przypuszczalnie zdolna do fosforylacji jednego miejsca w PCF11: T121, znajdującego się w domenie CID. Podsumowując, odkryłam, że WNK1 oddziałuje z białkiem PCF11 w ekstraktach z jądra komórkowego, i jest przewidywaną kinazą fosforylującą resztę aminokwasową ważną dla oddziaływania PCF11 z Pol II. W tym czasie do mojego projektu dołączył doktorant, Adam Volanakis, który pracował pod moją opieką naukową. Wspólnie potwierdziliśmy lokalizację WNK1 w jądrze komórkowym przy pomocy immunofluorescencji. Nieoczekiwanie wykryliśmy akumulację sygnału WNK1 na obrzeżu jądra komórkowego. To skłoniło nas do postawienia hipotezy, że WNK1 może być związany z jądrowym eksportem mRNA. Aby sprawdzić tą możliwość, zmierzaliśmy efekt obniżenia poziomu WNK1 na poziom mRNA w jądrze i cytoplazmie przy użyciu metod RT-qPCR oraz oligo-dT FISH. Obie metody wskazały, że obniżenie poziomu WNK1 skutkuje zwiększeniem się stosunku jądrowego do cytoplazmatycznego mRNA, w zgodzie z naszą hipotezą. Stwierdziliśmy, że defekt eksportu mRNA następuje na skutek zakłócenia w uwalnianiu cząsteczek mRNP z locus transkrypcyjnego, z równoczesnym formowaniem się „ciężkiej chromatyny” (Rougemaille et al., 2008; Jensen et al., 2013). Jądrowy eksport mRNA był również wadliwy gdy aktywność kinazy WNK1 była hamowana przy pomocy chemicznego inhibitora. To skłoniło nas do sprawdzenia, czy w procesie tym nie gra roli fosforylacja PCF11. Potwierdziliśmy przewidywanie, że WNK1 fosforyluje PCF11 na S120/T121. Następne, kluczowe eksperymenty wskazały, że wprowadzenie do komórek mutacji punktowych PCF11 S120/T121 wywoływało podobny do zmniejszenia poziomu WNK1 efekt: akumulację mRNA w jądrze, jak również nieprawidłowe przebywanie mRNA na chromatynie. Na końcu zweryfikowaliśmy eksperymentalnie, że fosforylacja PCF11 na S120/T121 rzeczywiście osłabia oddziaływanie między PCF11 a Pol II. Na tej podstawie przewidujemy, że WNK1 oraz wywoływana przez tą kinazę fosforylacja domeny CID PCF11 wspiera uwalnianie transkryptów od związanej z chromatyną Pol II. To z kolei ułatwia eksport mRNA do cytoplazmy.

Równocześnie z badaniami nad rolą fosforylacji PCF11 w eksporcie mRNA z jądra komórkowego, pracowałam nad określeniem funkcji PCF11 na poziomie transkrypcji RNA. Projekt prowadzący do **publikacji 4** (Kamieniarz-Gdula et al., 2019) rozpoczął od weryfikacji, czy PCF11 rzeczywiście funkcjonuje jako ogólny czynnik terminacji w komórkach ludzkich. W tym celu obniżyłam poziom PCF11 przy pomocy siRNA i zastosowałam trzy rodzaje pomiarów w celu sprawdzenia różnych aspektów terminacji transkrypcji. Dla wizualizacji wiązania się Pol II do chromatyny zastosowałam ChIP-seq. Transkrypcję mierzyłam przy pomocy analizy RNA związanego z chromatyną (chrRNA), które jest wzbogacone w powstające dopiero transkrypty. Użyłam również nowej techniki mNET-seq (Nojima et al., 2015, 2016), która wykrywa nowo powstałe transkrypty w aktywnym miejscu Pol II, wykrywając specyficzną dla rejonów terminatorowych formę Pol II CTD fosforylowaną na treoninie 4 (T4ph) (Heidemann et al., 2013; Schlackow et al., 2017). Jest to aktualnie najbardziej specyficzna metoda wykrywania terminacji transkrypcji w komórkach ludzkich. Zgodnie z oczekiwaniami, obniżenie poziomu PCF11 prowadziło do przeczytu transkrypcji, który jest cechą charakterystyczną wadliwej terminacji. Następnie ustaliliśmy wykorzystanie aktywnych PAS poprzez sekwencjonowanie 3' końców jądrowego poliadenylowanego RNA (3'mRNA-seq) z komórek kontrolnych i pozbawionych PCF11. To pozwoliło nam wykazać, że PCF11 generalnie sprzyja używaniu proksymalnych PAS w komórkach ludzkich. Równocześnie stwierdziliśmy, że opóźnienie terminacji zachodzące na skutek obniżenia poziomu PCF11 często zachodzi przy braku dystalnego przesunięcia APA. Stąd

wnioskujemy, że PCF11 usprawnia zarówno obróbkę 3' końca RNA, jak również niezależnie terminację transkrypcji.

Następnie ustaliliśmy genomowy profil PCF11 przy pomocy ChIP-seq. Wykryliśmy częste wiązanie się PCF11 na 3' końcach genów, poniżej PAS, w zgodzie z funkcją PCF11 w terminacji. Jednak wiązanie się w rejonach promotorowych było również bardzo rozpowszechnione. Choć obecność PCF11 była wykrywalna zarówno na kodujących jak i niekodujących jednostkach transkrypcyjnych, zaledwie połowa aktywnych, ulegających poliadenylacji genów kodujących białka wskazywała na istotne wzbogacenie PCF11 (4516/8389). Analiza danych ChIP-seq wskazała, że szczególnie wysoki poziom PCF11 występuje pomiędzy położonymi blisko siebie genami. Wzbogacenie PCF11 pomiędzy blisko położonymi jednostkami transkrypcyjnymi może służyć zapobieganiu transkrypcyjnego nakładania się pomiędzy sąsiadującymi genami, ograniczając zjawisko interferencji transkrypcji. W zgodzie z tą hipotezą, geny, których ekspresja była istotnie obniżona przy zniesionej ekspresji PCF11 miały średnio 5.5-krotnie mniejsze odstępną w stosunku do genów niewrażliwych na PCF11. Wykryliśmy interferencję transkrypcyjną przy zniesionej ekspresji PCF11 zarówno w przypadku genów w orientacji zbieżnej jak i tandemowej. Podsumowując, stwierdziliśmy, że przerywanie genów za pośrednictwem PCF11 jest istotne dla zapewnienia wydajnej ekspresji położonych blisko siebie genów.

Wybiórczy wzór wzbogacenia genomowego PCF11 zachęcił nas do sprawdzenia poziomu białka PCF11 w stosunku do Pol II oraz innych podjednostek maszynierii obróbki 3' końca RNA, używając do tego celu metody globalnej ilościowej proteomiki. Ku naszemu zaskoczeniu wykryliśmy, że poziom PCF11 jest sub-stechiometryczny w stosunku do innych podjednostek kompleksu CPA we wszystkich testowanych ludzkich komórkach i tkankach. PCF11 jest najmniej licznie występującym białkiem w tym kompleksie, średnio wykazując 10-20-krotnie niższą ilość molekuł na komórkę w stosunku do innych podjednostek CPA i Pol II. Sub-stechiometryczna natura białka PCF11 jest odzwierciedlona w poziomie jego mRNA, które jest jednym z mniej licznych i stabilnych mRNA kompleksu CPA. Niski poziom białka i mRNA PCF11 zasugerował nam, że może podlegać ono regulacji na poziomie transkrypcji. Zauważyłam wówczas, że gen PCF11 ma ewolucyjnie zachowany pierwszy intron. Najbardziej zachowany region tego intronu zawiera tandemowe heksamery AATAAA, oflankowane z obu stron przez elementy wspomagające rekrutację czynników CPA. Te sekwencje razem tworzą silny sygnał poliadenylacji, którego wysoką aktywność wykryliśmy w naszych zestawach danych 3'mRNA-seq. Nazwaliśmy ten element PAS1. Co ciekawe, PCF11 wykazywał nie tylko wiązanie do 3' końca własnego genu, ale również poniżej PAS1. Na tej podstawie postawiłam hipotezę, że PCF11 może autoregulować swój poziom przez APA i przedwczesną terminację.

Aby zweryfikować tą hipotezę, najpierw sprawdziłam wpływ obniżenia poziomu PCF11 na używanie PAS1. Użyłam siRNA, które specyficznie celowały w pełnej długości RNA PCF11 (ang. full-length PCF11, flPCF11), natomiast nie w krótką izoformę sPCF11 (ang. short PCF11), kończącą się na PAS1. W zgodzie z postawioną hipotezą, obniżenie poziomu białka PCF11, używanie PAS1 spadło silnie, skutkując obniżeniem poziomu mRNA sPCF11 4-krotnie bardziej niż flPCF11. Zgodnie z tym wynikiem, poziom znacznika terminacji transkrypcji, T4ph mNET-seq, obniżył się poniżej PAS1, natomiast podwyższył na 3' końcu genu PCF11. Również sygnał chRNA-seq podwyższył się na całym genie PCF11. Połączenie tych wyników sugeruje, że użycie PAS1 ściśle zależy od poziomu białka PCF11, oraz, że przedwczesna terminacja za pośrednictwem PAS1 reguluje transkrypcję mRNA flPCF11. Aby bardziej bezpośrednio zademonstrować rolę PCF11 PAS1 w autoregulacji, specyficznie usunęliśmy sekwencję PAS1 z pierwszego intronu PCF11 przy pomocy techniki CRISPR/Cas9. Zbadaliśmy cztery klony komórkowe z delecją PAS1 i stwierdziliśmy, że wszystkie one wykazywały zwiększony poziom zarówno mRNA, jak również białka PCF11. Podsumowując, PAS1 jest używany

preferencyjnie, gdy poziom białka PCF11 jest wysoki, natomiast jego użycie zmniejsza się gdy poziom PCF11 jest niski, utrzymując stały poziom PCF11. Dodatkowo, usunięcie PAS1 skutkuje podwyższeniem się transkrypcji PCF11 oraz poziomu jego mRNA i białka. Te wyniki wskazują na to, że zależna od PAS1 przedwczesna terminacja transkrypcji pozwala na precyzyjne utrzymywanie ekspresji PCF11 pozwalając na homeostazę PCF11.

PAS1 PCF11 jest ewolucyjnie niezmienny u kręgowców i stwierdziliśmy jego aktywne używanie u wielu gatunków, włączając w to danio pręgowanego. Dlatego skorzystaliśmy z tego modelu zwierzęcego, żeby ocenić rolę PCF11 w rozwoju kręgowców. Najpierw uzyskaliśmy knock-out rybiego PCF11 (zebrafish PCF11, zPCF11<sup>null</sup>). Embriony zPCF11<sup>null</sup> -/- umierały pomiędzy pierwszą a drugą dobą po zapłodnieniu, na skutek nekrozy mózgu. Te dane stanowią pierwszy dowód na to, że PCF11 jest niezbędny dla rozwoju kręgowców. Żeby ocenić czy PAS1 odgrywa rolę w rozwoju danio pręgowanego, następnie specyficznym usunęliśmy PAS1. Mutanty zPCF11<sup>PAS1</sup> -/- wykazywały fenotyp utraty sprawności. Aby ustalić, czy autoregulacja PCF11 za pomocą PAS1 zachodzi u danio pręgowanego, wykonaliśmy 3'mRNA-seq na embrionach dzikich i zmutowanych zPCF11<sup>null</sup> i zPCF11<sup>PAS1</sup>. Doświadczenia te wykazały, że brak funkcjonalnego białka zPCF11 prowadzi do ponad 4-krotnego obniżenia używania PAS1, i równoczesnego 2-krotnego podwyższenia poziomu mRNA flPCF11. Embriony mutantów zPCF11<sup>PAS1</sup> -/- również wykazywały ok 1.5-krotnie podwyższony poziom mRNA flPCF11. Podsumowując, zarówno w hodowanych komórkach ludzkich, jak również podczas rozwoju ryb danio pręgowany, przedwczesna terminacja transkrypcji zależna od PAS1 umożliwia autoregulację PCF11 oraz jego homeostazę. Nasze dane sugerują również, że autoregulacja PCF11 przy pomocy PAS1 zwiększa sprawność zwierząt.

W pracy tej pokazaliśmy, że PCF11 reguluje własną ekspresję poprzez przedwczesną terminację, oraz, że sprzyja wczesnemu CPA oraz wczesnej terminacji w obrębie całego genomu. To wskazało możliwość, że PCF11 może powstrzymywać transkrypcję również innych genów. Aby zweryfikować tę hipotezę, przeszukaliśmy nasze zestawy danych z komórek ludzkich pod kątem genów kodujących białka, których ekspresja zwiększała się istotnie po obniżeniu poziomu PCF11, i które równocześnie wykazywały obniżony poziom wewnątrzgenowego CPA i/lub obniżony poziom wewnątrzgenowej terminacji. W ten sposób ustaliliśmy zbiór 218 genów regulowanych przez przedwczesną terminację zależną od PCF11. Co ciekawe, analiza ontologii tych genów wskazała na to, że są one wzbogacone w geny regulujące ekspresję innych genów, zarówno na poziomie transkrypcji jak i obróbki RNA. Powtórzyliśmy następnie analizę dla zestawu danio pręgowanego i zidentyfikowaliśmy 108 genów potencjalnie regulowanych przez PCF11-zależną przedwczesną terminację. Geny te również wykazywały wzbogacenie regulatorów transkrypcji. Co istotne, zaobserwowaliśmy PCF11-zależną wczesną terminację na tych samych genach u ludzi i ryb, w szczególności na genach kodujących czynniki obróbki 3' końca RNA. Tak więc, zarówno w ludzkich komórkach jak również podczas rozwoju danio pręgowanego, PCF11 negatywnie reguluje podzbiór genów przy pomocy przedwczesnej terminacji.

Na koniec ustaliliśmy czy zPCF11 u ryb pozytywnie reguluje blisko położone geny, tak jak ma to miejsce w ludzkich komórkach. Analiza dystansu genów ujawniła, że geny, których ekspresja obniżyła się po usunięciu zPCF11 były istotnie bliżej położone od genów niewrażliwych na zPCF11. Podsumowując, przeciwstawne działania PCF11 wzmacniające ekspresję blisko położonych genów, przy równoczesnym hamowaniu transkrypcji innego zestawu genów, wzbogaconych o geny regulujące ekspresję innych genów, jest zachowane ewolucyjnie u kręgowców od ryb do ludzi.

Najbardziej zaskakującym i ekscytującym odkryciem w publikacji 4 (Kamieniarz-Gdula et al., 2019) było wykazanie, że podzbiór ludzkich genów w normalnych warunkach podlega negatywnej regulacji na skutek wywoływanej przez PCF11 ich przedwczesnej terminacji. To skłoniło mnie do przeszukania



literatury naukowej pod kątem innych badań mogących świadczyć o roli przedwczesnej terminacji transkrypcji w kontroli transkrypcji u metazoa, oraz napisania artykułu przeglądowego na ten temat do czasopisma Trends in Genetics, **publikacja 5** (Kamieniarz-Gdula and Proudfoot, 2019). Rola przedwczesnej terminacji jako ważnego mechanizmu kontroli transkrypcji jest dobrze udokumentowana u bakterii i drożdży. Tymczasem rola tego mechanizmu w ekspresji genów u metazoa nie została do tej pory doceniona. Jest to związane z dwoma ograniczeniami: Po pierwsze, maszyna odpowiedzialna za przedwczesną terminację u organizmów niższych nie spełnia tej funkcji u metazoa. Po drugie wiele przedwcześnie terminowanych transkryptów jest wyjątkowo niestabilne, co utrudnia ich badanie. Jednak najnowsze postępy technologiczne dają nowy wgląd w przedwczesną terminację transkrypcji. Przedwczesna terminacja okazuje się być częsta jak również szeroko rozpowszechniona genomowo, i może następować albo w pobliżu promotora albo wewnątrzgenowo. Stabilne, przedwcześnie terminowane transkrypty przyczyniają się do złożoności transkryptomu, jako szczególne przypadki alternatywnej poliadenylacji wewnątrzgenowej. Niezależnie od stabilności transkryptu i jego funkcji, przedwczesna terminacja przeciwdziała tworzeniu pełnej długości transkryptów, w ten sposób negatywnie regulując ekspresję genów. W szczególności w ten sposób kontrolowana jest ekspresja wielu regulatorów transkrypcyjnych. W zależności od kontekstu, przedwczesna terminacja może być korzystna lub szkodliwa dla organizmu. W rezultacie zapewne istnieje wiele czynników kontrolujących ten proces, w publikacji 5 przedstawiam propozycję czynników, które mogą pełnić taką rolę.

Podsumowując, najważniejsze wyniki mojego osiągnięcia naukowego to:

- opisanie powszechnego występowania motywu '9 AT tracts' oraz jego zdolności terminacji transkrypcji;
- opisanie nowego mechanizmu terminacji transkrypcji zależnej od zatrzymywania Pol II i pętli R;
- pokazania roli fosforylacji czynnika terminacji PCF11 oraz jego kinazy WNK1 w łączeniu transkrypcji z jądrowym eksportem mRNA;
- wykazanie, że PCF11 u kręgowców reguluje ekspresję genów poprzez wzmocnienie ekspresji blisko położonych genów, ale również obniżenie ekspresji podzbioru regulatorów transkrypcji poprzez przedwczesną terminację;
- przedstawienie pierwszego przeglądu literatury wykazującego dowody na rolę przedwczesnej terminacji transkrypcji w regulacji genów u metazoa.

Celem osiągnięcia naukowego nie były zastosowania praktyczne. Niemniej jednak, ponieważ badania te dotyczą bardzo fundamentalnych mechanizmów życia, jest prawdopodobne, że okażą się one istotne w wielu procesach chorobowych u ludzi.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Przed podjęciem pracy w grupie prof. Proudfoota w Oksfordzie, moja badania w czasie doktoratu oraz rocznego stażu podoktorskiego przeprowadziłam w **Max-Planck-Institute of Immunobiology and Epigenetics we Fryburgu, Niemczech** (w okresie październik 2006 – maj 2012), w grupie prof. Roberta Schneidera. Moje badania tam dotyczyły tematyki biologii chromatyny oraz epigenetyki. W tym czasie znacząco przyczyniłam się do kilku projektów, co doprowadziło do współautorstwa w czterech pracach badawczych (w dwóch z nich jestem dzielonym pierwszym autorem) oraz do napisania czterech artykułów przeglądowych. Dwa z moich głównych osiągnięć (prac pierwszo-autorskich) są zaprezentowane poniżej.

*Badania nad funkcją acetylacji histonu łącznikowego H1*

Modifikacje post-translacyjne chromatyny są szeroko badane, natomiast nadal mało wiadomo o modyfikacjach histonów łącznikowych, które odgrywają kluczową rolę w strukturze chromatyny wyższego rzędu. Celem mojego projektu doktorskiego było uzyskanie po raz pierwszy funkcjonalnego wglądu w acetylację histonu łącznikowego H1, skupiając się na szeroko rozpowszechnionym wariantcie H1.4. W tej pracy (**Kamieniarz et al., 2012**), wykazaliśmy, że ewolucyjnie zachowane miejsce acetylacji H1.4K34ac, modyfikowane przez acetyltransferazę GCN5, jest wzbogacone na promotorach aktywnych genów, gdzie stymuluje transkrypcję przez zwiększenie ruchliwości H1 oraz rekrutację ogólnego czynnika transkrypcji TFIID. Dalej, odkryliśmy, że H1.4K34ac jest dynamiczna podczas spermatogenezy oraz znakuje nieodróżniane komórki takie jak indukowane komórki pluripotencjalne oraz komórki nowotworowe nasieniaka. Na podstawie naszych wyników zaproponowaliśmy model, w którym H1.4K34ac jest regulatorem funkcji chromatyny zdolnym do zamiany represora na aktywatora transkrypcji. Chociaż badania te miały na celu zbadanie ważnego i niepoznanego dotychczas aspektu metabolizmu chromatyny, i miały już przez to dużą wartość naukową, dodatkowo wykryliśmy, że H1.4K34ac ma znaczenie medyczne i może stanowić marker molekularny nowotworów komórek zarodkowych. Projekt ten był kamieniem milowym w mojej naukowej edukacji, pozwalając mi nabyć ważne umiejętności badawcze, laboratoryjne, komputerowe, jak również zdolności dodatkowe. Po raz pierwszy rozpoczęłam i prowadziłam projekt badawczy od początku do końca, zyskałam szeroką wiedzę teoretyczną w dziedzinie epigenetyki, biologii chromatyny i transkrypcji, i nauczyłam się szerokiego wachlarza istotnych technik eksperymentalnych obejmujących biochemię, biologię molekularną i komórkową jak również wyspecjalizowane metody chromatynowe. Poszerzyłam również znacząco swoje kompetencje bioinformatyczne podczas analizy własnych danych genomowych, i rozwinęłam umiejętności interpersonalne pracując z kolaborantami z różnych dziedzin nauki (np. chemii i medycyny).

*Badania nad genomowym rozmieszczeniem kanonicznych wariantów histonu łącznikowego H1*

Warianty histonów to izoformy białkowe kodowane przez różne geny, które odgrywają kluczową rolę w zróżnicowaniu struktury chromatyny. Wykazano, że warianty histonów rdzeniowych mają decydujące znaczenie w tak różnorodnych procesach jak transkrypcja, segregacja chromosomów, naprawa i rekombinacja DNA, remodelowanie chromatyny czy specyficzne dla linii zarodkowej pakowanie i aktywacja DNA. Jednak poznanie funkcji wariantów histonu łącznikowego było dotychczas utrudnione poprzez brak przeciwciał specyficznych dla poszczególnych isoform. W tej pracy (**Izzo, Kamieniarz-Gdula et al., 2013**) użyliśmy niezależnej od przeciwciał metody DamID (ang. DNA adenine methyltransferase Identification) żeby systematycznie zmapować rozmieszczenie genomowe wszystkich kanonicznych podtypów H1 występujących w somatycznych komórkach ludzkich, tj. H1.1-H1.5. Ustaliliśmy, że ich rozmieszczenie jest regulowane na wielu poziomach, oraz że H1 może odgrywać kluczową rolę w regulacji ekspresji genów oraz organizacji chromatyny wyższego rzędu. Co więcej, nasze dane ujawniły wyraźnie odrębny profil wiązania się wariantu H1.1 do chromatyny, sugerujący jego aktywującą rolę w procesach regulowanych przez chromatynę. Co istotne, nasza praca dostarczyła ważnego źródła danych dla dalszych badań nad molekularnym mechanizmem regulacji wiązania się H1 do chromatyny, znaczenia różnorodności H1 u organizmów wyższych, oraz połączyły strukturę jednowymiarową z wyższego rzędu strukturą chromatyny, dlatego przewidujemy ich znaczące oddziaływanie naukowe. Prowadzenie badań w tym projekcie znacznie polepszyło moje kompetencje, dając mi znajomość zaawansowanej techniki DamID oraz pozwoliły mi rozwinąć umiejętności bioinformatyczne w dziedzinie analizy genomowej. Co więcej, ponieważ projekt ten prowadzony był równolegle do moich badań nad acetylacją histonu

łącznikowego, przyczynił się on do poprawy moich umiejętności organizacyjnych i zarządzania czasem.

Podczas studiów na **Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**, uczestniczyłam w badaniach w Zakładzie Wirusologii Molekularnej pod kierownictwem pani prof. dr hab. Anny Goździckiej-Józefiak, jak również w **CNR Institute of Neuroscience w Mediolanie**, Włoszech, podczas pobytu w laboratorium dr Marii Passafaro w ramach programu Socrates Erasmus. Badania te przyczyniły się do mojego współautorstwa w trzech pracach badawczych oraz dwóch artykułach przeglądowych.

Jeśli chodzi o współczynniki bibliograficzne, mój raport cytowalności z bazy *Web of Science* wskazuje **16 publikacji, cytowanych 1062 razy, h-index = 11, oraz sumaryczny impact factor z bazy *Journal Citation Reports* równy 186.261.**

Mam również doświadczenie w pozyskiwaniu funduszy na badania. Pomagałam prof. Robertowi Schneiderowi oraz prof. Nicholasowi Proudfootowi w ich wnioskach grantowych, jak wyszczególniono w załączniku 5. Ponadto w trakcie stażu podoktorskiego zdobyłam stypendium Marie Skłodowska-Curie Intra-European Fellowship (€230,000). Niedawno zdobyłam dwa granty badawcze umożliwiające mój powrót do Polski i założenie własnej grupy badawczej: jeden z programu NAWA Polskie Powroty (2,174,996 PLN) oraz jeden z programu NCN Sonata Bis 8 (3,320,500 PLN).

Inne osiągnięcia wymienione są w załączniku 5.

#### *Przyszłe kierunki badawcze*

Długoterminową wizją mojego niezależnego laboratorium będzie lepsze zrozumienie znaczenia terminacji transkrypcji dla regulacji genów, oraz jego powiązań z innymi poziomami ekspresji genów – chromatyny, obróbki RNA oraz eksportu jądrowego. Jestem dobrze przygotowana, żeby prowadzić tego typu interdyscyplinarne badania, ponieważ podczas doktoratu i stażu podoktorskiego pracowałam najpierw w tematyce biologii chromatyny oraz epigenetyki (Kamieniarz et al., 2012; Izzo et al., 2013; Tropberger et al., 2013; Waldmann et al., 2011), a następnie mechanizmów transkrypcji i obróbki 3' końca RNA (Kamieniarz-Gdula et al., 2019; Skourti-Stathaki et al., 2014; White et al., 2013, 2014; Hatchi et al., 2015), zahaczając o eksport jądrowy (Volanakis et al., 2017). Co więcej, posiadam zarówno eksperymentalne jak i komputerowe umiejętności potrzebne dla zaproponowanych podejść genomowych.

W projekcie finansowanym przez NCN Sonata Bis, moim celem będzie ujawnienie roli i mechanizmu przedwczesnej terminacji transkrypcji w regulacji ekspresji genów w ludzkich komórkach. Projekt ma trzy specyficzne cele: 1. Wyjaśnienie mechanizmu przedwczesnej terminacji transkrypcji przez molekularną dysekcję różnych funkcji PCF11 u kręgowców (wiązania Pol II, wiązania RNA, oraz stymulacji cięcia RNA). 2. Określenie środowiska chromatynowego w rejonach genomowych, w których ma miejsce przedwczesna, normalna i zabezpieczająca (ang. failsafe) terminacja transkrypcji, oraz sprawdzenie zmian w chromatynie na skutek zaburzeń terminacji. 3. Zdefiniowanie częstości występowania przedwczesnej terminacji w warunkach fizjologicznych, oraz szukanie nowych czynników wywołujących przedwczesną terminację.

Ogólnym celem projektu finansowanego przez program NAWA Polskie Powroty jest ustalenie jak zmienia się normalna terminacja transkrypcji na końcach genów, jak również przedwczesna terminacja, podczas procesu nowotworzenia. Cele specyficzne są następujące: 1. Porównanie profili terminacji transkrypcji pomiędzy normalnymi a rakowymi komórkami. 2. Ustalenie związku między

poziomem białka czynników terminacyjnych a ich sposobem wiązania się do chromatyny. 3. Wykonanie meta-analizy danych pochodzących z guzów pierwotnych oraz otaczającej je zdrowej tkanki od pacjentów pod kątem występowania przedwczesnej terminacji.

Potencjał regulacyjny przedwczesnej terminacji transkrypcji nie został zbadany u organizmów wyższych, mimo, że znane jest jej kluczowe znaczenie u bakterii i drożdży. Zaproponowane projekty pozwolą na poznanie roli i mechanizmu przedwczesnej terminacji u kręgowców, jak również utworzą drogę nowej poddziedzinie badań transkrypcyjnych. Dodatkowym wymiarem badań będzie studiowanie tego mechanizmu podczas procesu nowotworzenia. Ta tematyka badawcza odnosi się do fundamentalnych mechanizmów regulacji genów, dlatego ma duże znaczenie naukowe.

### Literatura:

Amrani, N., Minet, M., Wyers, F., Dufour, M.E., Aggerbeck, L.P., and Lacroute, F. (1997). PCF11 encodes a third protein component of yeast cleavage and polyadenylation factor I. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1102–1109.

Dye, M.J., and Proudfoot, N.J. (2001). Multiple transcript cleavage precedes polymerase release in termination by RNA polymerase II. *Cell* 105, 669–681.

Gromak, N., West, S., and Proudfoot, N.J. (2006). Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3986–3996.

Gross, S., and Moore, C. (2001). Five subunits are required for reconstitution of the cleavage and polyadenylation activities of *Saccharomyces cerevisiae* cleavage factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6080–6085.

Hatchi, E., Skourti-Stathaki, K., Ventz, S., Pinello, L., Yen, A., Kamieniarz-Gdula, K., Dimitrov, S., Pathania, S., McKinney, K.M., Eaton, M.L., et al. (2015). BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for R-loop-driven DNA damage repair. *Mol. Cell* 57, 636–647.

Heidemann, M., Hintermair, C., Voß, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 55–62.

Izzo, A., Kamieniarz-Gdula, K., Ramírez, F., Noreen, N., Kind, J., Manke, T., van Steensel, B., and Schneider, R. (2013). The genomic landscape of the somatic linker histone subtypes H1.1 to H1.5 in human cells. *Cell Rep* 3, 2142–2154.

Jensen, T.H., Jacquier, A., and Libri, D. (2013). Dealing with Pervasive Transcription. *Molecular Cell* 52, 473–484.

Johnson, S.A., Cubberley, G., and Bentley, D.L. (2009). Cotranscriptional recruitment of the mRNA export factor Yra1 by direct interaction with the 3' end processing factor Pcf11. *Mol. Cell* 33, 215–226.

Kamieniarz, K., Izzo, A., Dundr, M., Tropberger, P., Ozretic, L., Kirfel, J., Scheer, E., Tropel, P., Wisniewski, J.R., Tora, L., et al. (2012). A dual role of linker histone H1.4 Lys 34 acetylation in transcriptional activation. *Genes Dev.* 26, 797–802.

Kamieniarz-Gdula, K., and Proudfoot, N. (2019). Transcriptional control by premature termination: a forgotten mechanism (PeerJ Inc.).

Kamieniarz-Gdula, K., Gdula, M.R., Panzer, K., Nojima, T., Monks, J., Wiśniewski, J.R., Riepsaame, J., Brockdorff, N., Pauli, A., and Proudfoot, N.J. (2019). Selective Roles of Vertebrate PCF11 in Premature and Full-Length Transcript Termination. *Mol. Cell* 74, 158-172.e9.

Li, W., You, B., Hoque, M., Zheng, D., Luo, W., Ji, Z., Park, J.Y., Gunderson, S.I., Kalsotra, A., Manley, J.L., et al. (2015). Systematic Profiling of Poly(A)+ Transcripts Modulated by Core 3' End Processing and Splicing Factors Reveals Regulatory Rules of Alternative Cleavage and Polyadenylation. *PLoS Genet* 11, e1005166.

Meinhart, A., and Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3' prime-RNA-processing factors. *Nature* 430, 223–226.

Nojima, T., Gomes, T., Grosso, A.R.F., Kimura, H., Dye, M.J., Dhir, S., Carmo-Fonseca, M., and Proudfoot, N.J. (2015). Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell* 161, 526–540.

Nojima, T., Gomes, T., Carmo-Fonseca, M., and Proudfoot, N.J. (2016). Mammalian NET-seq analysis defines nascent RNA profiles and associated RNA processing genome-wide. *Nat Protoc* 11, 413–428.

Porrua, O., Boudvillain, M., and Libri, D. (2016). Transcription Termination: Variations on Common Themes. *Trends Genet.* 32, 508–522.

Proudfoot, N.J. (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* 25, 1770–1782.

Proudfoot, N.J. (2016). Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut. *Science* 352, aad9926.

Rougemaille, M., Dieppois, G., Kisseleva-Romanova, E., Gudipati, R.K., Lemoine, S., Blugeon, C., Boulay, J., Jensen, T.H., Stutz, F., Devaux, F., et al. (2008). THO/Sub2p Functions to Coordinate 3'-End Processing with Gene-Nuclear Pore Association. *Cell* 135, 308–321.

Sadowski, M., Dichtl, B., Hübner, W., and Keller, W. (2003). Independent functions of yeast Pcf11p in pre-mRNA 3' end processing and in transcription termination. *EMBO J.* 22, 2167–2177.

Schlackow, M., Nojima, T., Gomes, T., Dhir, A., Carmo-Fonseca, M., and Proudfoot, N.J. (2017). Distinctive Patterns of Transcription and RNA Processing for Human lincRNAs. *Mol. Cell* 65, 25–38.

Shekarabi, M., Zhang, J., Khanna, A.R., Ellison, D.H., Delpire, E., and Kahle, K.T. (2017). WNK Kinase Signaling in Ion Homeostasis and Human Disease. *Cell Metab.* 25, 285–299.

Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J., and Gromak, N. (2011). Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Mol. Cell* 42, 794–805.

Skourti-Stathaki, K., Kamieniarz-Gdula, K., and Proudfoot, N.J. (2014). R-loops induce repressive chromatin marks over mammalian gene terminators. *Nature* 516, 436–439.

Tropberger, P., Pott, S., Keller, C., Kamieniarz-Gdula, K., Caron, M., Richter, F., Li, G., Mittler, G., Liu, E.T., Bühler, M., et al. (2013). Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. *Cell* 152, 859–872.

Volanakis, A., Kamieniarz-Gdula, K., Schlackow, M., and Proudfoot, N.J. (2017). WNK1 kinase and the termination factor PCF11 connect nuclear mRNA export with transcription. *Genes Dev.* 31, 2175–2185.

de Vries, H., Rügsegger, U., Hübner, W., Friedlein, A., Langen, H., and Keller, W. (2000). Human pre-mRNA cleavage factor IIm contains homologs of yeast proteins and bridges two other cleavage factors. *EMBO J* 19, 5895–5904.

Waldmann, T., Izzo, A., Kamieniarz, K., Richter, F., Vogler, C., Sarg, B., Lindner, H., Young, N.L., Mittler, G., Garcia, B.A., et al. (2011). Methylation of H2AR29 is a novel repressive PRMT6 target. *Epigenetics Chromatin* 4, 11.

West, S., and Proudfoot, N.J. (2008). Human Pcf11 enhances degradation of RNA polymerase II-associated nascent RNA and transcriptional termination. *Nucleic Acids Res* 36, 905–914.

White, E., Kamieniarz-Gdula, K., Dye, M.J., and Proudfoot, N.J. (2013). AT-rich sequence elements promote nascent transcript cleavage leading to RNA polymerase II termination. *Nucleic Acids Res.* 41, 1797–1806.

White, E., Schlackow, M., Kamieniarz-Gdula, K., Proudfoot, N.J., and Gullerova, M. (2014). Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 552–559.

Zhang, Z., and Gilmour, D.S. (2006). Pcf11 Is a Termination Factor in *Drosophila* that Dismantles the Elongation Complex by Bridging the CTD of RNA Polymerase II to the Nascent Transcript. *Molecular Cell* 21, 65–74.

Zhang, Z., Fu, J., and Gilmour, D.S. (2005). CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11. *Genes Dev.* 19, 1572–1580.

Kinga Kamieniarz-Gdula