

Załącznik 2

Autoreferat

**Identyfikacja nowych klas i nowych funkcji
cząsteczek krótkich niekodujących RNA.**

Dr Marek Żywicki

1. Imię i Nazwisko

Marek Żywicki

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Tytuł magistra biotechnologii – Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Biologii, 07.2002.

Stopień doktora nauk chemicznych z zakresu biochemii – Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, 11.2008. Tytuł: Identyfikacja nowych mechanizmów regulacji ekspresji genów

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

05.2008-11.2008: asystent, Institute of Molecular Genetics, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

12.2008-09.2012: post-doc, Institute of Molecular Genetics, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

09.2012: specjalista, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, Polska

10.2012-obecnie: adiunkt, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, Polska

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. nr 65, poz. 595 ze zm.):**a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

Identyfikacja nowych klas i nowych funkcji cząsteczek krótkich niekodujących RNA.

b) Publikacje naukowe wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

[1] **Marek Żywicki*** (2010) Transkryptomika niekodujących RNA. *Biotechnologia*. 3(90):191-201 (MNiSW 2010: 6)

[2] **Marek Żywicki***, Kamilla Bąkowska-Żywicka, Norbert Polacek* (2012) Revealing stable processing products from ribosome-associated small RNAs by deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 40:4013-4024 (IF 2012: 8,278; MNiSW 2012: 40)

- [3] Andreas Pircher, Kamilla Bąkowska-Żywicka, Lukas Schneider, **Marek Żywicki**, Norbert Polacek* (2014) An mRNA-derived noncoding RNA targets and regulates the ribosome. *Mol Cell*. 54:147-155 (IF 2014: 14,018; MNiSW 2014: 50)
- [4] Konstantinia Skreka, Simon Schaffner, Irina-Roxana Nat, **Marek Żywicki**, Ahmad Salti, Galina Apostolova, Matthias Griebel, Mathieu Rederstorff, Georg Dechant, Alexander Hüttenhofer* (2012) Identification of differentially expressed non-coding RNAs in embryonic stem cell neural differentiation. *Nucleic Acids Res*. 40:6001-6015 (IF 2012: 8,278; MNiSW 2012: 40)
- [5] Jennifer Gebetsberger, **Marek Żywicki**, Andrea Künzi, Norbert Polacek* (2012) tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloflex volcanii*. *Archaea*. 2012:260909 (IF 2012: 2,545; MNiSW 2012: 25)
- [6] Leander Wyss, Melanie Waser, Jennifer Gebetsberger, **Marek Żywicki**, Norbert Polacek* (2018) mRNA-specific translation regulation by a ribosome-associated ncRNA in *Haloflex volcanii*. *Scientific Reports*. 8:12502 (IF 2017: 4,122; MNiSW 2018: 40)
- [7] Roger Fricker, Rebecca Brogli, Hannes Luidalepp, Leander Wyss, Michel Fasnacht, Oliver Joss, **Marek Żywicki**, Mark Helm, André Schneider, Marina Cristodero, Norbert Polacek* (2019) A tRNA half modulates translation as stress response in *Trypanosoma brucei*. *Nature Communications*. 10:118 (IF 2017: 12,353; MNiSW 2019: 45)
- [8] Kamilla Bąkowska-Żywicka*, Anna M Mleczko, Marta Kasprzyk, Piotr Machtel, **Marek Żywicki**, Tomasz Twardowski (2016) The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Open Bio*. 6:1186-1200 (IF 2016: 2,143; MNiSW 2016: 20)
- [9] **Marek Żywicki**, Joanna Gracz, Wojciech Karłowski, Tomasz Twardowski, Agata Tyczewska* (2015) Expression of miRNAs involved in phosphate homeostasis and senescence is altered in glyphosate-treated maize. *Acta Physiologiae Plantarum*. 37:265 (IF 2015: 1,563; MNiSW 2015: 25)

(*) autor korespondencyjny

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

Przez wiele lat uważano, że funkcje regulatorowe w komórce pełnione są wyłącznie przez białka. Stanowisko to zaczęło ulegać zmianie pod koniec XX wieku wraz z odkryciem pierwszych cząsteczek RNA zdolnych do regulacji ekspresji genów, które nie posiadały otwartej ramki odczytu. Cząsteczki te nazwano regulatorowymi niekodującymi RNA (ang. *noncoding RNA*, *ncRNA*). W chwili obecnej są one uważane za jeden z najistotniejszych komórkowych elementów regulatorowych. Potwierdzony został ich udział w regulacji podstawowych procesów takich jak replikacja DNA, transkrypcja, translacja,

dojrzewanie mRNA, utrzymywanie struktury chromatyny czy obrona przed infekcjami (Cech and Steitz, 2014; Szymański et al., 2003).

Cząsteczki regulatorowych niekodujących RNA obserwowane są we wszystkich domenach organizmów żywych. Najlepiej zbadane są u eukariontów, gdzie podzielić je można na dwie główne grupy: długie ncRNA (ang. *long noncoding RNA*, *lncRNA*), które podlegają analogicznemu do mRNA dojrzewaniu (wycinanie intronów, poliadenylacja) oraz krótkie ncRNA (*short RNA*, *sRNA*), które mogą być niezależnymi produktami transkrypcji bądź powstawać poprzez wycinanie z dłuższych prekursorów. Najlepiej poznaną klasą eukariotycznych krótkich RNA są RNA o długości od 18-26 nukleotydów (nt), takie jak mikroRNA (miRNA), krótkie interferujące RNA (siRNA) czy krótkie RNA oddziałujące z białkami PIWI (piRNA). Ich cechą wspólną jest biogeneza poprzez wycinanie z dłuższych prekursorów za pomocą enzymów z rodziny DICER oraz funkcjonowanie w postaci kompleksów rybonukleoproteinowych zawierających białko Argonaut. Co istotne, kanoniczne krótkie ncRNA są wycinane z transkryptów prekursorowych (ang. *host genes*) bądź z rejonów pre-mRNA nie pełniących funkcji w biosyntezie białka (intronów) (Cech and Steitz, 2014).

Cząsteczki krótkich RNA obserwowane są również w organizmach prokariotycznych. Zarówno ich biogeneza jak i mechanizmy funkcjonowania znacząco różnią się od cząsteczek eukariotycznych. U bakterii krótkie RNA powstają zazwyczaj jako produkty niezależnej transkrypcji i charakteryzują się długością od kilkudziesięciu do nawet kilkuset nukleotydów. Mechanizm ich działania polega najczęściej na regulacji ekspresji genów poprzez oddziaływanie antysensowe z docelowymi mRNA bądź poprzez interakcje z białkami istotnymi dla procesów komórkowych (Cech and Steitz, 2014).

Od początków odkrycia krótkich RNA podstawową metodą badawczą stosowaną w celu ich identyfikacji było sekwencjonowanie cDNA. Początkowo przeprowadzane było ono klasyczną metodą Sangera, jednak dopiero upowszechnienie technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA (ang. *next generation sequencing*, *NGS*) pozwoliło na dogłębne badanie repertuaru krótkich RNA. Metody NGS zrewolucjonizowały badania nad RNA poprzez możliwość kompleksowego poznania składu zarówno ilościowego jak i jakościowego krótkich RNA podczas pojedynczego eksperymentu.

Moje zainteresowanie krótkimi RNA zrodziło się już podczas realizacji pracy doktorskiej. Nawiązałem wtedy kontakt z laboratorium prof. Hüttenhofera w Innsbrucku, które jako jedno z nielicznych zajmowało się na początku lat 2000 wielkoskalową identyfikacją nowych niekodujących RNA z zastosowaniem sekwencjonowania techniką Sangera. Już w tamtym okresie, w analizowanych przeze mnie odczytach pochodzących z sekwencjonowania bibliotek cDNA uzyskanych z przepisania krótkich RNA wyizolowanych z archeona *Sulfolobus solfataricus*, obserwowałem krótkie sekwencje pochodzące z dłuższych funkcjonalnych RNA, takich jak mRNA, tRNA czy snoRNA (Tang et al., 2005). Liczba

uzyskiwanych wówczas sekwencji nie pozwalała jednak na jednoznaczne określenie czy są one stabilnymi komórkowymi RNA czy też artefaktami.

Obserwacja ta zaintrygowała mnie na tyle, że po ukończeniu doktoratu wyjechałem na staż podoktorski do laboratorium prof. Polacka w Innsbrucku, gdzie zająłem się obliczeniową analizą wyników sekwencjonowania bibliotek cDNA uzyskiwanych we współpracy z grupami badawczymi wchodzącymi w skład konsorcjum GenAu (10 grup badawczych skupionych wokół tematyki niekodujących RNA, głównie z Innsbrucku, Wiednia oraz Gratz). W ten sposób miałem możliwość inicjacji własnych badań nad identyfikacją nowych typów cząsteczek ncRNA, które miałem nadzieję odkryć w analizowanych bibliotekach cDNA. Specyfika tej współpracy pozwalała mi połączyć moje zainteresowania bioinformatyczne z możliwością skupienia się na bezpośrednim badaniu zjawisk biologicznych, do czego zawsze dążyłem. W zdecydowanej większości realizowanych projektów byłem jedynym bioinformatykiem odpowiedzialnym za całość prac nad zaprojektowaniem i przeprowadzeniem analiz danych sekwencyjnych. Dzięki nabytemu doświadczeniu, szybko zacząłem również uczestniczyć w planowaniu eksperymentów sekwencjonowania wysokoprzepustowego mających na celu identyfikację krótkich ncRNA.

W trakcie prowadzonych przeze mnie prac nad analizą pierwszych wysokoprzepustowych bibliotek cDNA uzyskanych z krótkich RNA udało mi się ponownie zaobserwować fragmenty takich cząsteczek jak mRNA, tRNA, rRNA czy snoRNA (Rederstorff et al., 2010). Głównym wyzwaniem było wskazanie, które z obserwowanych fragmentów pochodzą od stabilnych funkcjonalnych cząsteczek RNA a które są artefaktami indukowanymi przez komórkową degradację RNA lub powstającymi podczas przygotowywania próbki do sekwencjonowania. W grupach prof. Polacka oraz prof. Hüttenhofera opracowywano metody eksperymentalne mające na celu przygotowanie bibliotek cDNA wzbogaconych w funkcjonalne ncRNA. W pierwszej z prac składających się na zgłoszone osiągnięcie (Żywicki, 2010), będącej pracą przeglądową, opisałem stosowane w naszym oraz innych laboratoriach metody konstrukcji bibliotek cDNA w oparciu o krótkie cząsteczki ncRNA oraz problemy związane z ich analizą obliczeniową. Praca to odzwierciedla aktualny na przełomie roku 2009/2010 stan wiedzy, który stanowił dla mnie motywację do dalszych badań.

W celu realizacji postawionego sobie celu naukowego polegającego na identyfikacji nowych klas ncRNA, postanowiłem opracować nową metodę obliczeniowej analizy bibliotek cDNA opartych o cząsteczki krótkich RNA. Wynikiem było opracowanie programu APART opisanego w drugiej z prac składających się na zgłoszone osiągnięcie (Żywicki et al., 2012). Program ten pozwala na kompleksową analizę bibliotek cDNA nakierowanych na identyfikację i profilowanie ekspresji cząsteczek krótkich ncRNA. Jako dane wejściowe użyte mogą być surowe dane sekwencyjne w formacie FASTQ, natomiast

jako wynik generowane są tabele w formacie html oraz pliki tekstowe zawierające kompleksowe informacje na temat zidentyfikowanych ncRNA. Analiza składa się z następujących etapów: usuwanie z odczytów sekwencji adaptorów, mapowanie do genomu referencyjnego, składanie zmapowanych odczytów w kontigi wraz z wyznaczaniem poziomów ekspresji, identyfikacja potencjalnych produktów wycinania RNA z dłuższych prekursorów, klastrowanie, adnotacja, oraz generowanie końcowych tabel z wynikami. Wszystkie powyższe etapy mogą zostać uruchomione sekwencyjnie w trybie automatycznym bądź też każdy z etapów może zostać uruchomiony ręcznie.

Program APART zawiera kilka innowacyjnych rozwiązań ułatwiających pracę z bibliotekami cDNA opartymi o małe ncRNA. Identyfikacja nowych stabilnych ncRNA opiera się w głównej mierze na odróżnieniu ich od produktów niespecyficznego rozpadu RNA, który może być wynikiem działania pewnych nukleaz bądź innych czynników fizykochemicznych mających kontakt z RNA podczas jego izolacji oraz procedur związanych z przygotowaniem próbki do sekwencjonowania. W tym celu w mojej metodzie zdecydowałem się na zastosowanie analizy rozkładu pokrycia prekursorów przez odczyty. Wyszukiwane są miejsca nagłego „skoku” głębokości pokrycia sugerujące występowanie w próbce wielu cząsteczek RNA o dokładnie tych samych końcach. W przypadku niespecyficznego degradacji oczekiwanym sygnałem jest losowy rozkład końców cząsteczek. Rejony otoczone sygnaturami charakterystycznymi dla miejsc specyficznego cięcia RNA są adnotowane jako potencjalne produkty wycinania. Drugim innowacyjnym rozwiązaniem jest zaproponowany przeze mnie sposób oznaczania poziomu ekspresji kontigów oraz potencjalnych produktów wycinania na podstawie maksymalnego pokrycia przez odczyty. Ponieważ procedura eksperymentalnego przygotowania próbek do sekwencjonowania krótkich RNA nie zawiera etapu losowej fragmentacji RNA, jedna cząsteczka RNA obecna w próbce generuje jeden odczyt (pomijając duplikaty związane z reakcją PCR). Dlatego jeśli w ramach kontigu obserwujemy nienachodzące na siebie odczyty, powinniśmy je interpretować jako dwa produkty degradacji/wycinania a nie jako odczyty uzyskane z jednej cząsteczki RNA. Stąd, zamiast standardowej sumy odczytów składających się na kontig, zaproponowałem zastosowanie maksymalnego pokrycia kontigu jako miary jego ekspresji.

Następną innowacyjną cechą APART jest możliwość klastrowania zidentyfikowanych cząsteczek ncRNA. W wielu genomach, szczególnie u organizmów eukariotycznych, geny ncRNA występują w wielu kopiach, np. tRNA, snoRNA. W wielu przypadkach poszczególne loci kodujące powtórzenia genu są identyczne, co nie pozwala na ich rozróżnienie na podstawie sekwencji odczytów. Efektem jest przeszacowanie liczby zidentyfikowanych ncRNA oraz utrudniona wysoką redundancją analiza wyników. APART posiada możliwość połączenia ncRNA zidentyfikowanych na podstawie tej samej grupy odczytów w jeden rekord. Odbywa się to poprzez porównanie list odczytów przynależących do

poszczególnych ncRNA. Dzięki temu klastrowanie jest bardzo czułe i obejmuje wyłącznie ncRNA zidentyfikowane na podstawie wielokrotnego mapowania grup odczytów do genomu referencyjnego.

W tej samej pracy zastosowałem opracowane przeze mnie, opisane powyżej metody obliczeniowe do analizy wyników sekwencjonowania wysokoprzepustowej biblioteki cDNA uzyskanej z krótkich ncRNA oddziałujących z rybosomami. Badania te przeprowadzone zostały w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* hodowanych w 12 różnych warunkach środowiskowych. Ponieważ byłem zainteresowany identyfikacją nowych klas ncRNA wycinanych z dłuższych prekursorów, badania przeprowadzone zostały w organizmie, który nie posiada mechanizmów molekularnych umożliwiających powstawanie i funkcjonowanie klasycznych cząsteczek krótkich ncRNA takich jak siRNA, mikroRNA czy piRNA. Jednocześnie pragnęliśmy zweryfikować tezę na temat możliwości regulacji aktywności rybosomu przez niekodujące RNA. W wyniku przeprowadzonej przeze mnie analizy uzyskałem 174 reprezentatywne kontigi (po zastosowaniu klastrowania). Dla 131 z nich udało mi się wykryć obecność co najmniej jednego potencjalnego produktu wycinania. Co więcej, potencjalne produkty wycinania pochodziły z prawie wszystkich typów transkryptów obecnych w *S. cerevisiae*, włącznie z mRNA (zarówno z eksonów jak i intronów), tRNA, snoRNA czy rRNA. Najwyższy wskaźnik wycinania zaobserwowałem dla kontigów międzygenowych oraz pochodzących z tRNA, snoRNA i dojrzałych mRNA. W następnym kroku, wyniki analizy poddane zostały weryfikacji eksperymentalnej (northern blot, stem-loop RT-PCR), która potwierdziła obecność przewidzianych przez APART produktów wycinania w większości analizowanych przypadków, w szczególności tych powstających z tRNA, rRNA oraz snoRNA. Co więcej, okazało się, że wycinanie zachodzi wyłącznie w ściśle określonych warunkach wzrostu *S. cerevisiae*, specyficznie dla konkretnej cząsteczki. Potwierdzone eksperymentalnie wyniki analizy obliczeniowej sugerowały istnienie nowych mechanizmów powstawania stabilnych cząsteczek RNA, które poprzez asocjację z rybosomami, mogą mieć potencjalny wpływ na translację.

Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników wyodrębniłem kilka cząsteczek ncRNA o wysokim potencjale funkcjonalnym, powstałych w wyniku wycinania z innych funkcjonalnych RNA. Jedną z najbardziej interesujących cząsteczek był 18-nukleotydowy fragment mRNA kodującego enzym modyfikujący tRNA - metylotransferazę tRNA (TRM10). Był to RNA ulegający najwyższej ekspresji spośród pochodzących z mRNA krótkich RNA zasocjowanych z rybosomami. Po wykonaniu przeze mnie dodatkowych analiz okazało się, że bardzo podobna do 18-meru sekwencja znajduje się w 26S rRNA *S. cerevisiae*. Co więcej, 18-mer okazał się występować w wielu innych organizmach, jednak nigdy w podobnym kontekście genomowym. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie analiz został on wybrany do dalszych prac badawczych. Ich wyniki przedstawione zostały w kolejnej z prac składających się na zgłoszone przeze mnie osiągnięcie (Pircher et al., 2014). Wykazaliśmy, że zidentyfikowany przeze mnie 18-mer ulega asocjacji z podjednostką 60S w obrębie rybosomu oraz powoduje prawie całkowitą

inhibicję translacji zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Co więcej, obserwowany efekt był specyficzny względem sekwencji 18-meru. Wprowadzenie mutacji w obrębie tej cząsteczki skutkowało zniesieniem efektu regulatorowego. W wyniku serii przeprowadzonych eksperymentów zaproponowaliśmy mechanizm, według którego 18-mer ulega rekrutacji do rybosomów natychmiast po wystąpieniu stresu osmotycznego, powodując spowolnienie biosyntezy białka. Po adaptacji programu transkrypcyjnego komórki (około 30-45 minut) do nowych warunków, 18-mer oddysocjowuje pozwalając na translację nowego zestawu białek niezbędnych do przeżycia w warunkach stresu osmotycznego. Co więcej, brak 18-meru i indukowanego przez niego wstrzymania translacji w początkowej fazie stresu, znacząco zmniejsza przeżywalność komórek. Opisany 18-mer jest pierwszym przykładem funkcjonalnego krótkiego regulatorowego ncRNA wycinanego z części kodującej mRNA. Również mechanizm jego działania jest bezprecedensowy. Praca była na tyle nowatorska, że jej publikacja w *Molecular Cell* opatrzona została dodatkowym komentarzem redakcji (Lintner and Cate, 2014).

Cząsteczki krótkich RNA powstające poprzez wycinanie z innych funkcjonalnych RNA udało mi się również zaobserwować podczas równolegle prowadzonej analizy danych pochodzących z sekwencjonowania całkowitej puli krótkich RNA wyizolowanych z komórek macierzystych myszy w różnych stadiach ich różnicowania do neuronów (czwarta praca składająca się na zgłoszone osiągnięcie (Konstantinia Skreka et al., 2012)). Okazało się, że w przeciwieństwie do drożdży, w komórkach zwierzęcych większość zidentyfikowanych stabilnych krótkich RNA należała do klasy mikroRNA. Obserwacja ta była spodziewana ze względu na powszechność występowania tego typu cząsteczek u zwierząt. Po odfiltrowaniu wszystkich znanych oraz nowych potencjalnych cząsteczek miRNA (identyfikacja charakterystycznych sygnatur programem miRDeep (Friedländer et al., 2012)) najczęściej obserwowanym przeze mnie typami cząsteczek ncRNA były nowe RNA pochodzące z rejonów międzygenowych, intronów pre-mRNA, tRNA oraz snoRNA . Ekspresja wybranych cząsteczek została poddana weryfikacji eksperymentalnej za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym. Rezultaty potwierdziły wynikające z analizy obliczeniowej obserwacje dotyczące znaczących zmian ekspresji tych cząsteczek zarówno pomiędzy poszczególnymi etapami różnicowania komórek macierzystych jak i dojrzałych neuronów i astrocytów. Specyficzna regulacja ich ekspresji sugeruje, że zidentyfikowane małe RNA mogą brać udział w procesach różnicowania. Co zaskakujące, podobnie jak w przypadku drożdży, udało mi się zaobserwować pewną niewielką liczbę krótkich (18-19 nt) RNA powstałych w wyniku wycinania z dojrzałych cząsteczek mRNA (eksonów).

Z powodu ograniczonego udziału cząsteczek ncRNA wycinanych z innych funkcjonalnych RNA w różnicowaniu neuronów u myszy, wraz z opiekunem mojego stażu podoktorskiego, prof. Norbertem Polackiem postanowiliśmy zbadać powszechność wycinania ncRNA z innych funkcjonalnych RNA u

archeonów i pierwotniaków. Zachęteni sukcesem badań przeprowadzonych w drożdżach postanowiliśmy skupić się na cząsteczkach ncRNA zasocjowanych z rybosomami, którym nadana została w międzyczasie nazwa rancRNA (ang. *ribosome-associated noncoding RNA*). Jako kolejny obiekt badań wybraliśmy archeona *Haloferax volcanii*, dla którego zasoby technik eksperymentalnych i wiedzy związanych z budową i funkcjonowaniem rybosomu w ówczesnym czasie były bardzo bogate. Uzyskane wyniki opublikowane zostały w piątej z prac składających się na zgłoszone osiągnięcie (Gebetsberger et al., 2012). Pomimo opracowanej już metodologii identyfikacji stabilnych RNA analiza danych z sekwencjonowania krótkich RNA z archeona stanowiła duże wyzwanie, głównie ze względu na specyfikę genomu (niepełna wiedza na temat występujących w nim krótkich RNA, splicing tRNA i inne) oraz metodę zastosowaną do konstrukcji biblioteki cDNA. Była ona oparta o wydłużanie 3' końca RNA o 8-12 cytozyn z użyciem polimerazy poli(A). Jako starter do reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystane zostały oligonukleotydy złożone z sekwencji adaptora, 8 guanin oraz nukleotydu kotwiczącego (A,C lub T). Niestety, takie podejście skutkowało inicjacją odwrotnej transkrypcji również w obrębie rejonów wewnętrznych RNA bogatych w cytozyny. W celu eliminacji tego typu artefaktów opracowałem metodę ich identyfikacji i odfiltrowywania. Po zastosowaniu zmodyfikowanej wersji programu APART okazało się, że w *H. volcanii* zdecydowanie największej ekspresji ulegają małe ncRNA stanowiące fragmenty tRNA. Moją uwagę najbardziej przykuł 26-nukleotydowy fragment tRNA-Val który zdominował całą bibliotekę cDNA. Po przebadaniu zidentyfikowanego przeze mnie fragmentu tRNA-Val w naszym laboratorium okazało się, że ulegał on zróżnicowanemu wycinaniu i asocjacji z rybosomami zależnie od warunków wzrostu *H. volcanii*. Potwierdziliśmy również jego zdolność do wiązania rybosomów *in vitro* oraz *in vivo*. Dalsze testy funkcjonalne wykazały, że cząsteczka ta posiada zdolność obniżania globalnego poziomu translacji poprzez inhibicję aktywności centrum peptydylotransferazy w rybosomie. Odkrycie to było jednym z pierwszych opisanych mechanizmów regulatorowych, które mogą pełnić fragmenty tRNA.

W trakcie wykonywanych analiz bibliotek cDNA z *Haloferax volcanii* moją uwagę przykuła również stosunkowo liczna grupa zidentyfikowanych ncRNA pochodzących z rejonów międzygenowych. Ze względu na skąpą adnotację genów ncRNA w genomach archeonów wydawało się, że obserwowane grupy odczytów mogą odpowiadać nowym cząsteczkom sRNA. Niestety ze względu na metodologię zastosowaną do konstrukcji biblioteki cDNA (opisana powyżej), w większości przypadków nie było możliwe dokładne określenie 3' końca obserwowanych ncRNA. Filtrowanie odczytów uzyskanych w wyniku błędnej inicjalizacji odwrotnej transkrypcji doprowadziło to do usunięcia większości zidentyfikowanych międzygenowych ncRNA. Dlatego do badań funkcjonalnych zdecydowaliśmy się wykorzystać wyniki moich analiz bioinformatycznych które wykonane zostały bez usuwania

artefaktów, mając świadomość, że prawdziwy 3' koniec zidentyfikowanych ncRNA będzie musiał zostać oznaczony eksperymentalnie za pomocą techniki 3' RACE.

Mając powyższe na uwadze, do analiz funkcjonalnych wybraliśmy trzy ncRNA o najwyższej wiarygodności, które ulegały najwyższej ekspresji oraz były obserwowane również we wcześniej opublikowanych bibliotekach cDNA. Uzyskane wyniki opublikowane zostały w szóstej z prac składających się na zgłoszone osiągnięcie (Wyss et al., 2018). Jeden z ncRNA (s194) okazał się specyficznym wiązaczem z aktywnymi translacyjnie rybosomami w obrębie podjednostki 50S. Udało się również zaobserwować jego aktywność inhibitorową na reakcję tworzenia wiązania peptydowego, jednak wyłącznie *in vitro*. W wyniku dalszych eksperymentów udało nam się wykazać, że ncRNA s194 reguluje poziom translacji mRNA CstA, kodującego białko uczestniczące w transporcie peptydów w warunkach głodu. Wykazaliśmy, że regulacja ta w przeciwieństwie do dotychczas poznanych mechanizmów nie polega na maskowaniu sekwencji mRNA wiążącej rybosom, tylko na kompetycji w wiązaniu do rybosomu. Jest to zupełnie nowy mechanizm regulatorowy, który wymaga dalszej dogłębnej charakteryzacji.

Kolejnym organizmem który obraliśmy jako obiekt badawczy w poszukiwaniu nowych mechanizmów regulacji ekspresji genów realizowanych przez cząsteczki krótkich ncRNA był świdrowiec *Trypanosoma brucei*. Świdrowce charakteryzują się bardzo specyficzną biologią RNA. tRNA tych organizmów podlega edycji i licznym modyfikacjom, rybosomowy RNA dużej podjednostki występuje jako kilka niezależnych łańcuchów RNA a mRNA transkrybowany jest w postaci policistronowej i ulega rozcinaniu w procesie trans-splicingu. Z tego względu organizm ten wydaje się wyjątkowo interesujący w aspekcie identyfikacji nowych klas krótkich ncRNA. Zgodnie z moimi sugestiami, w celu zwiększenia zakresu długości identyfikowanych ncRNA podczas konstrukcji biblioteki wyizolowane zostały RNA o długości < 300 nt a podczas sekwencjonowania zastosowaliśmy odczyty typu *paired-end* pozwalające na uzyskanie informacji o sekwencji 100 nt z każdego z końców cDNA. W przypadku ncRNA krótszych niż 200 nt powodowało to wzajemne nachodzenie odczytów pochodzących z pojedynczej cząsteczki cDNA, co skutkowało mogłoby zaburzonym rozkładem pokrycia ncRNA przez odczyty, uniemożliwiając prawidłową identyfikację stabilnych RNA przez program APART. W odpowiedzi na to wyzwanie opracowałem nową metodologię identyfikacji ncRNA z tego typu bibliotek. Nachodzące na siebie odczyty *paired-end* pochodzące z tego samego cDNA połączyłem w tzw. odczyty *pseudo-single-end*, które w pełni odpowiadały wyizolowanym cząsteczkom RNA. Aby efektywnie analizować dłuższe odczyty, oryginalną strategię zaimplementowaną w APART polegającą na identyfikacji kontigów na podstawie nakładających się odczytów, zastąpiłem identyfikacją grup nakładających się odczytów z użyciem programu blockbuster (Langenberger et al., 2009). W obrębie „bloków” zwracanych przez ten program identyfikowałem stabilne RNA za pomocą metodologii zaimplementowanej w moim

programie APART. Biblioteki cDNA przygotowane zostały z frakcji RNA zasocjowanych z rybosomami wyizolowanymi z *T. brucei* hodowanymi w różnych warunkach. Po raz pierwszy w naszych badaniach próbki uzyskane z poszczególnych warunków zsekwencjonowane zostały osobno a nie jako połączona pula. Umożliwiło mi to przeprowadzenie analizy różnicowej ekspresji ncRNA już na etapie analizy obliczeniowej wyników sekwencjonowania. Zadanie to okazało się być większym wyzwaniem niż na początku sądziliśmy. Większość metod normalizacji poziomów ekspresji genów uzyskiwanych na podstawie sekwencjonowania transkryptomu opiera się na założeniu, że ekspresja większości genów nie ulega zmianie. W przypadku krótkich ncRNA nie zawsze założenie to jest spełnione, przede wszystkim ze względu na obserwowane już wcześniej w naszych badaniach, zależne od stresu globalne zmiany w repertuarze krótkich ncRNA. Dlatego przeprowadziłem analizę porównawczą dostępnych metod normalizacji poziomów ekspresji w celu wyłonienia najodpowiedniejszej z nich. Do dalszych prac zastosowałem metodę *rlog* dostępną w pakiecie *EdgeR* jako najbardziej odporną na znaczne globalne wahania poziomów ekspresji ncRNA.

Dysponując zoptymalizowaną metodologią wykonałem analizę sekwencji uzyskanych z bibliotek cDNA *Trypanosoma brucei*. Ich wyniki opublikowane zostały w siódmej pracy składającej się na zgłoszone osiągnięcie (Fricker et al., 2019). Pierwszą obserwacją, która przykuła moją uwagę był istotny wzrost ekspresji krótkich ncRNA wycinanych z tRNA w świdrowcach hodowanych w warunkach stresu głodu. W przeważającej większości były to połówki tRNA, z miejscem cięcia zlokalizowanym w pętli antykodonu. Eksperymenty northern blot potwierdziły zarówno wielkość zidentyfikowanych przeze mnie połówek tRNA jak i ich zależne od warunków zmiany ilościowe. W przypadku niektórych 3' połówek, np. pochodzącej z tRNA-Thr, obserwowaliśmy również zależne od warunków hodowli dodatkowe fragmenty reprezentujące RNA o rozmiarze bardzo zbliżonym do pełnej długości tRNA. Ponieważ wcześniej obserwowano skracanie końca CCA w tRNA w stresie oksydacyjnym w komórkach ludzkich (Czech et al., 2013), postanowiłem przeprowadzić dodatkową analizę odczytów pokrywających 3' koniec tego tRNA. Uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, że 3' koniec tRNA-Thr w warunkach stresu głodu pozbawiony był końcówki CCA. W toku dalszych eksperymentów okazało się, że 3' połówka tRNA-Thr specyficznie asocjuje z rybosomami i powoduje globalną stymulację ich aktywności, natomiast brak końcówki CCA jest kluczowy dla tej aktywności. Co więcej, udało nam się wykazać, że stymulacja ta odbywa się poprzez maskowanie inhibitorowej aktywności innych komórkowych fragmentów tRNA. Zidentyfikowany przez nas proces stymulacji aktywności translacyjnej komórki poprzez krótki ncRNA wiążący się bezpośrednio z rybosomem jest pierwszym i jak do tej pory jedynym opisanym tego typu mechanizmem.

Jak wykazałem powyżej, zastosowanie technik opartych o sekwencjonowanie cDNA umożliwia identyfikację nowych, nie obserwowanych wcześniej klas ncRNA. Profilowanie ich ekspresji za pomocą

tych metod może być jednak obarczone błędami związanymi z obniżoną reprezentacją w bibliotekach cząsteczek, które zawierają modyfikacje potranskrypcyjne powodujące przedwczesną terminację odwrotnej transkrypcji. Zjawisko to jest szczególnie istotne w przypadku fragmentów tRNA. Aby przekonać się o skali tego zjawiska, wraz z grupą dr Kamilli Bąkowskiej-Żywickiej przeprowadziliśmy kompleksową analizę poziomów ekspresji fragmentów tRNA u drożdży *S. cerevisiae* z użyciem techniki northern blot, która jest niezależna od odwrotnej transkrypcji. Wyniki tych badań opisane zostały w ósmej z prac składających się na zgłoszone osiągnięcie (Bąkowska-Żywicka et al., 2016). Przeprowadzona przeze mnie analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że w przypadku *S. cerevisiae* zjawisko modyfikacji potranskrypcyjnych nie wpływa w istotny sposób na identyfikację nowych ncRNA, jednak ma znaczący wpływ na obserwowane poziomy ich ekspresji. Wyniki te potwierdziły wysoką skuteczność opracowanej przeze mnie metodologii analizy bibliotek cDNA w celu identyfikacji nowych klas ncRNA.

Mając nadzieję na identyfikację kolejnych nowych typów krótkich ncRNA podjąłem się również analizy RNA uwikłanych w oporność kukurydzy na glifosat – herbicyd zawarty w jednym z najpopularniejszych środków ochrony roślin, Roundup®. Jest to herbicyd systemiczny, który swą popularność zawdzięcza obecności na rynku roślin GMO z wprowadzoną na niego odpornością. Od pewnego czasu pojawia się jednak coraz więcej doniesień o spontanicznym nabywaniu odporności na glifosat przez chwasty oraz rośliny uprawne (Heap, 2015). Aby zbliżyć się do wytłumaczenia tego fenomenu konieczne jest pełne zrozumienie zmian jakie zachodzą w roślinach w odpowiedzi na stres herbicydowy. W moich badaniach wykorzystałem biblioteki cDNA z siewek kukurydzy nakierowane na małe ncRNA uzyskane z roślin kontrolnych oraz traktowanych preparatem Roundup®, udostępnione przez grupę prof. Tomasza Twardowskiego z IChB PAN. Niestety, przeprowadzona przeze mnie analiza z wykorzystaniem mojego programu APART wykazała, że poziomy ekspresji krótkich RNA wycinanych z innych funkcjonalnych RNA wykazywały bardzo duże wahania pomiędzy zreplikowanymi próbami, uniemożliwiając wysunięcie wiarygodnych kandydatów do badań funkcjonalnych. Zidentyfikowałem jednak grupę cząsteczek miRNA, które wykazywały wspólny wzorzec ekspresji w odpowiedzi na traktowanie glifosatem. Ponieważ repertuar znanych miRNA w kukurydzy wydaje się być niepełny (w blisko spokrewnionym ryżu znanych jest prawie trzykrotnie więcej miRNA), postanowiłem go uzupełnić poprzez opracowanie nowej metody profilowania ekspresji ewolucyjnie zachowawczych miRNA. Polega ona na mapowaniu odczytów z sekwencjonowania do znanych prekursorów miRNA z analizowanego organizmu oraz z organizmów spokrewnionych. Jeśli grupa odczytów mapuje do znanego miRNA z analizowanego organizmu, mierzony jest jego poziom ekspresji. Jeśli jednak zidentyfikowana zostanie grupa odczytów, która posiada większe podobieństwo do miRNA z

organizmu innego niż analizowany, wskazuje to na odkrycie nowego, ewolucyjnie zachowawczego miRNA.

Stosując to podejście zidentyfikowałem 13 miRNA wykazujących statystycznie istotną różnicową ekspresję w odpowiedzi na traktowanie glifosatem. Uzyskane wyniki opisane zostały w dziewiątej z prac składających się na zgłoszone osiągnięcie (Żywicki et al., 2015). Spośród zidentyfikowanych miRNA, 12 ulegało aktywacji, natomiast 1 - represji. Co więcej, 5 miRNA stanowiły cząsteczki wcześniej nie obserwowane w kukurydzy. Pośród mRNA potencjalnie regulowanych przez te cząsteczki najliczniejszą grupę stanowiły mRNA kodujące liczne regulatory transkrypcji. Najciekawsze było jednak odkrycie, że dwa ze zidentyfikowanych przeze mnie miRNA (miR827-3p oraz miR444), jak wcześniej udowodniono, biorą udział w regulacji pobierania fosforu poprzez indukcję ekspresji białek transporterowych (Hackenberg et al., 2013; Yan et al., 2014). Ponieważ wcześniej zostało wykazane, że glifosat, który jest fosfonianem używa tych samych mechanizmów wnikania do komórek roślinnych co fosfor, odkryty mechanizm regulacyjny może mieć kluczowe znaczenie dla oporności roślin na działanie tego herbicydu.

Podsumowując, dzięki zaprojektowanym i zaimplementowanym przeze mnie metodom obliczeniowym oraz wykonanym przeze mnie analizom danych z sekwencjonowania bibliotek cDNA udało mi się zidentyfikować nową klasę funkcjonalnych cząsteczek ncRNA funkcjonujących poprzez regulację aktywności rybosomu i wpływających na komórkowy poziom translacji. Mechanizm ten wydaje się być szeroko rozpowszechniony wśród organizmów żywych i obejmuje zarówno cząsteczki krótkich ncRNA stanowiące niezależne jednostki transkrypcyjne (s149 w *Haloferax volcanii*) jak i ncRNA wycinane z innych funkcjonalnych cząsteczek, takich jak mRNA czy tRNA (18-mer w *Saccharomyces cerevisiae*, fragmenty tRNA w *Haloferax volcanii* i *Trypanosoma brucei*). W toku moich badań zidentyfikowałem również nowe cząsteczki krótkich RNA uwikłanych w procesy regulacji różnicowania neuronów u myszy oraz w odpowiedź kukurydzy na stres herbicydowy.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Oprócz przedstawionych w osiągnięciu prac, brałem również udział w innych projektach związanych z poszukiwaniami funkcjonalnych cząsteczek niekodujących RNA. Jednym z projektów było opracowanie metody eksperymentalnej identyfikacji funkcjonalnych ncRNA poprzez izolację cząsteczek RNA związanych z białkami (*ang. ribonucleoprotein particles, RNP*), zgodnie z założeniem że większość znanych funkcjonalnych ncRNA pełni swoje funkcje w kooperacji z kompleksami białkowymi (Rederstorff et al., 2010). W projekcie tym moją rolą była interpretacja uzyskanych wyników analizy bibliotek cDNA i re-adnotacja zidentyfikowanych ncRNA. W ramach innego projektu opracowałem

skuteczny sposób projektowania mikromacierzy DNA zawierających sondy nakierowane na ncRNA (K. Skreka et al., 2012a, 2012b). Opracowana przeze mnie macierz składała się z sond DNA oraz LNA zaprojektowanych tak, aby miały tę samą temperaturę topnienia umożliwiając hybrydyzację zarówno krótkich (20-25 nt) jak i długich (70-150 nt) ncRNA podczas jednego eksperymentu. Zgodnie z przedstawionymi w publikacjach wynikami udało się uzyskać bardzo wysoką specyficzność oraz czułość opracowanych przeze mnie sond.

Doświadczenie i umiejętności zdobyte podczas prac nad identyfikacją nowych ncRNA wykorzystałem również w projektach związanych z analizą znanych już cząsteczek tego typu. Jednym z takich projektów była identyfikacja cząsteczek microRNA uwikłanych w procesy nowotworzenia w glejakach typu *glioblastoma multiforme* (Piwecka et al., 2015). Głównym celem było wyłonienie markerów molekularnych pozwalających na rozróżnienie poszczególnych stadiów tego nowotworu. Przeprowadzone przeze mnie analizy danych z sekwencjonowania pozwoliły na wyznaczenie 25 mikroRNA które ulegają znaczącej zmianie ekspresji pomiędzy stadium III i IV glejaka, które mogą być wykorzystane jako markery prognostyczne w terapii. W połączeniu z pozostałymi przeprowadzonymi eksperymentami uzyskane przeze mnie wyniki pozwoliły na powiązanie z GBM 30 nowych mikroRNA, mogących stanowić nowe biomarkery tej jednostki chorobowej.

Inny z realizowanych projektów poświęcony był analizie procesu dojrzewania cząsteczek tRNA u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Foretek et al., 2016). We wcześniejszych badaniach wykazano, że delecja genu *maf1*, kodującego represor transkrypcji realizowanej przez polimerazę III, powoduje nagromadzenie niedojrzałych cząsteczek tRNA w jądrze komórkowym podczas zmiany warunków hodowli (Karkusiewicz et al., 2011). W celu zbadania mechanizmu odpowiedzialnego za tę obserwację, wygenerowane zostały biblioteki cDNA nakierowane na uchwycenie zmian w dojrzewaniu końca 3' tRNA, uzyskane z komórek typu dzikiego oraz posiadających delecję genu *maf1*. W wyniku przeprowadzonych przeze mnie analiz udało mi się zaobserwować istotne różnice w obecności końcówki CCA, które zależne były od genotypu oraz od warunków hodowli. Po wykonaniu dodatkowych eksperymentów udało nam się potwierdzić powiązanie pomiędzy represją polimerazy III przez *Maf1* oraz procesem dodawania końcówki CCA do tRNA podczas dojrzewania. Mianowicie, w przypadku zbyt wysokiej transkrypcji tRNA (genotyp $\Delta maf1$) czynnikiem limitującym ilość tRNA dostępną w cytoplazmie staje się dodawanie końcówki CCA, prowadząc do obserwowanej akumulacji niedojrzałych tRNA w jądrze.

W trakcie swoich badań zajmowałem się również analizą struktury RNA. Dzięki przeprowadzonym przeze mnie symulacjom dynamiki molekularnej, połączonym z wynikami eksperymentów, udało nam się zaproponować mechanizm związany z utratą funkcji rybosomu po wprowadzeniu mutacji w jednej

z najsilniej zachowawczych ewolucyjnie par zasad w rybosomowym RNA 23S: A2450-C2063 (Chirkova et al., 2010). W innej z prac badałem możliwości wykorzystania metod wysokoprzepustowego próbkowania struktury drugorzędowej transkryptomu do oznaczania struktury cząsteczek krótkich RNA (Plucinska et al., 2016). Zgodnie z uzyskanymi wynikami, uwzględnienie więzów strukturalnych uzyskanych z eksperymentów próbkowania do modelowania struktury cząsteczek tRNA tylko nieznacznie zwiększyło dokładność tego procesu. Napisałem również pracę przeglądową podsumowującą możliwości wykorzystania ryboprzełączników jako celi terapeutycznych dla nowych klas antybiotyków (Machtel et al., 2016). Te regulatorowe struktury RNA występujące powszechnie u bakterii stanowią jeden z obecnych obszarów moich zainteresowań naukowych.

Ze względu na prowadzone prace nakierowane na identyfikację molekularnych podłoży nowotworów u człowieka oraz odporności na glifosat u roślin, zainteresowałem się również możliwościami wykorzystania nowoczesnych metod sekwencjonowania III generacji do sekwencjonowania genomów eukariotycznych. Metody te (PacBio SMRT oraz Oxford Nanopore) pozwalają na uzyskanie bardzo długich odczytów, jednak wykazują się one bardzo niską dokładnością uzyskiwanych sekwencji. W celu weryfikacji możliwości ich zastosowania wykonałem analizę porównawczą dostępnych metod korekcji uzyskiwanych sekwencji za pomocą krótszych, jednak bardzo dokładnych odczytów z sekwencjonowania Illumina (Mahmoud et al., 2017). Uzyskane wyniki wykazały, że jedno z testowanych narzędzi (HALC) umożliwiało uzyskanie wyników znacznie lepszych niż pozostałe.

Innym kierunkiem moich badań były badania repertuaru możliwości regulatorowych cząsteczek ncRNA z zastosowaniem techniki genomowej selekcji *in vitro* (*ang. genomic SELEX*) (Bannikova et al., 2013; Boots et al., 2014). Technika ta pozwala na identyfikację sekwencji RNA kodowanych w genomie, niezależnie od tego czy ulegają ekspresji, wiążących się do wybranego białka. W wyniku przeprowadzonych przeze mnie analiz obliczeniowych danych pochodzących z tego typu eksperymentów udało mi się zidentyfikować motyw RNA wiążący się do białka AtCyp59, będącego regulatorem aktywności RNA polimerazy II. RNA zawierające zaproponowany przeze mnie motyw i jego warianty podczas weryfikacji eksperymentalnej wykazywały zależne od stężenia wiązanie do badanego białka. Co więcej, wiązanie to powodowało inhibicję jego aktywności.



Spis literatury:

- Bąkowska-Żywicka, K., Mleczek, A.M., Kasprzyk, M., Machtel, P., Żywicki, M., Twardowski, T., 2016. The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Open Bio* 6, 1186–1200. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12127>
- Bannikova, O., Zywicki, M., Marquez, Y., Skrahina, T., Kalyna, M., Barta, A., 2013. Identification of RNA targets for the nuclear multidomain cyclophilin atCyp59 and their effect on PPIase activity. *Nucleic Acids Res.* 41, 1783–1796. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1252>
- Boots, J.L., Matylla-Kulinska, K., Zywicki, M., Zimmermann, B., Schroeder, R., 2014. Genomic SELEX, Handbook of RNA Biochemistry: Second, Completely Revised and Enlarged Edition. <https://doi.org/10.1002/9783527647064.ch53>
- Cech, T.R., Steitz, J.A., 2014. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157, 77–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008>
- Chirkova, A., Erlacher, M.D., Clementi, N., Zywicki, M., Aigner, M., Polacek, N., 2010. The role of the universally conserved A2450-C2063 base pair in the ribosomal peptidyl transferase center. *Nucleic Acids Res.* 38, 4844–4855.
- Czech, A., Wende, S., Mörl, M., Pan, T., Ignatova, Z., 2013. Reversible and Rapid Transfer-RNA Deactivation as a Mechanism of Translational Repression in Stress. *PLoS Genet.* 9, e1003767. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003767>
- Foretek, D., Nuc, P., Żywicki, M., Karłowski, W.M., Kudła, G., Boguta, M., 2016. Maf1-mediated regulation of yeast RNA polymerase III is correlated with CCA addition at the 3' end of tRNA precursors. *Gene* 1, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.033>
- Fricker, R., Brogli, R., Luidalepp, H., Wyss, L., Fasnacht, M., Joss, O., Zywicki, M., Helm, M., Schneider, A., Cristodero, M., Polacek, N., 2019. A tRNA half modulates translation as stress response in *Trypanosoma brucei*. *Nat. Commun.* 10, 118. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07949-6>
- Friedländer, M.R., Mackowiak, S.D., Li, N., Chen, W., Rajewsky, N., 2012. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* 40, 37–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr688>
- Gebetsberger, J., Zywicki, M., Künzi, A., Polacek, N., 2012. tRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*. *Archaea* 2012, 260909. <https://doi.org/10.1155/2012/260909>
- Hackenberg, M., Shi, B.-J., Gustafson, P., Langridge, P., 2013. Characterization of phosphorus-regulated miR399 and miR827 and their isomirs in barley under phosphorus-sufficient and phosphorus-deficient conditions. *BMC Plant Biol.* 13, 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-214>
- Heap, I., 2015. International Survey of Herbicide Resistant Weeds [WWW Document]. Internet. URL www.weedscience.com
- Karkusiewicz, I., Turowski, T.W., Graczyk, D., Towpik, J., Dhungel, N., Hopper, A.K., Boguta, M., 2011. Maf1 protein, repressor of RNA polymerase III, indirectly affects tRNA processing. *J. Biol. Chem.* 286, 39478–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253310>
- Langenberger, D., Bermudez-Santana, C., Hertel, J., Hoffmann, S., Khaitovich, P., Stadler, P.F., 2009. Evidence for human microRNA-offset RNAs in small RNA sequencing data. *Bioinformatics* 25, 2298–301. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp419>

- Lintner, N.G., Cate, J.H.D., 2014. Regulating the Ribosome: A Spotlight on RNA Dark Matter. *Mol. Cell* 54, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.042>
- Machtel, P., Bąkowska-Żywicka, K., Żywicki, M., 2016. Emerging applications of riboswitches - from antibacterial targets to molecular tools. *J. Appl. Genet.* 57, 531–541. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0341-x>
- Mahmoud, M., Zywicki, M., Twardowski, T., Karłowski, W.M., 2017. Efficiency of PacBio long read correction by 2nd generation Illumina sequencing. *Genomics.* <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.12.011>
- Pircher, A., Bakowska-Zywicka, K., Schneider, L., Zywicki, M., Polacek, N., 2014. An mRNA-Derived Noncoding RNA Targets and Regulates the Ribosome. *Mol. Cell* 54, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.024>
- Piwecka, M., Rolle, K., Belter, A., Barciszewska, A.M., Zywicki, M., Michalak, M., Nowak, S., Naskret-Barciszewska, M.Z., Barciszewski, J., 2015. Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues. *Mol. Oncol.* 9, 1324–1340. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.03.007>
- Plucinska, M., Bąkowska-Żywicka, K., Żywicki, M., 2016. Suitability of high-throughput DMS-probing data for constraining the secondary structure prediction of small RNAs. *Biotechnologia* 97. <https://doi.org/10.5114/bta.2016.62353>
- Rederstorff, M., Bernhart, S.H., Tanzer, A., Zywicki, M., Perfler, K., Lukasser, M., Hofacker, I.L., Hüttenhofer, A., 2010. RNPomics: Defining the ncRNA transcriptome by cDNA library generation from ribonucleo-protein particles. *Nucleic Acids Res.* 38, e113.
- Skreka, K., Karbiener, M., Zywicki, M., Hüttenhofer, A., Scheideler, M., Rederstorff, M., 2012a. Expression profiling of ncRNAs employing RNP libraries and custom LNA/DNA microarray analysis, *Regulatory RNAs: Basics, Methods and Applications.* https://doi.org/10.1007/978-3-642-22517-8_9
- Skreka, Konstantinia, Schafferer, S., Nat, I.-R., Zywicki, M., Salti, A., Apostolova, G., Griehl, M., Rederstorff, M., Dechant, G., Hüttenhofer, A., 2012. Identification of differentially expressed non-coding RNAs in embryonic stem cell neural differentiation. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gks311>
- Skreka, K., Zywicki, M., Karbiener, M., Hüttenhofer, A., Scheideler, M., Rederstorff, M., 2012b. Expression profiling of a heterogeneous population of ncRNAs employing a mixed DNA/LNA microarray. *J. Nucleic Acids* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/283560>
- Szymański, M., Barciszewska, M.Z., Zywicki, M., Barciszewski, J., 2003. Noncoding RNA transcripts. *J. Appl. Genet.* 44, 1–19.
- Tang, T.-H., Polacek, N., Zywicki, M., Huber, H., Brugger, K., Garrett, R., Bachellerie, J.P., Hüttenhofer, A., 2005. Identification of novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.* 55, 469–481.
- Wyss, L., Waser, M., Gebetsberger, J., Zywicki, M., Polacek, N., 2018. mRNA-specific translation regulation by a ribosome-associated ncRNA in *Haloferax volcanii*. *Sci. Rep.* 8, 12502. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30332-w>
- Yan, Y., Wang, H., Hamera, S., Chen, X., Fang, R., 2014. miR444a has multiple functions in the rice nitrate-signaling pathway. *Plant J.* 78, 44–55. <https://doi.org/10.1111/tpj.12446>
- Zywicki, M., 2010. Noncoding RNA transcriptomics | Transkryptomika niekodujących RNA. *Biotechnologia* 191–201.
- Zywicki, M., Bakowska-Zywicka, K., Polacek, N., 2012. Revealing stable processing products from ribosome-associated small RNAs by deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12.

<https://doi.org/10.1093/nar/gks020>

Żywicki, M., Gracz, J., Karłowski, W., Twardowski, T., Tyczewska, A., 2015. Expression of miRNAs involved in phosphate homeostasis and senescence is altered in glyphosate-treated maize. *Acta Physiol. Plant.* 37, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2022-5>