

AUTOREFERAT

Odkrycie nowej klasy krótkich regulatorowych niekodujących RNA
oddziałujących z rybosomem,
powstających przez przetworzenie funkcjonalnych RNA (mRNA, tRNA, snoRNA)

Kamilla Bąkowska-Żywicka

14.11.2016, POZNAŃ

1. Imię i nazwisko: **Kamilla Bąkowska-Żywicka**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:
 - a) Tytuł magistra biotechnologii (2002) Wydział Biologii, Kierunek Biotechnologia, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Tytuł pracy magisterskiej: "Genetyczna różnorodność populacji dębu omszonego (*Quercus pubescens* Willd.) w odniesieniu do innych gatunków rodzimych (*Quercus petraea* Matt. Lieb and *Quercus robur* L).
 - b) Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii (2007) Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Tytuł rozprawy doktorskiej: "Korelacja struktury i funkcji wybranych fragmentów rRNA w regulacji biosyntezy polipeptydów w układzie roślinnym"
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:
 - a) staż podoktorski (2008 - 2011) Division of Genomics and RNomics, Medical University, Innsbruck, Austria
 - b) adiunkt (2012 – obecnie) Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):
 - a) tytuł osiągnięcia naukowego

Odkrycie nowej klasy krótkich regulatorowych niekodujących RNA oddziałujących z rybosomem, powstających przez przetworzenie funkcjonalnych RNA (mRNA, tRNA, snoRNA)

- b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie obejmuje monotematyczny cykl ośmiu prac, w tym pięciu eksperymentalnych i trzech przeglądowych. łączny współczynnik IF (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi 29.216, sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dn. 31.12.2014) wynosi 183. W sześciu pracach figuruję jako autor korespondencyjny*, z czego w dwóch jestem dodatkowo pierwszym autorem.

1. M. Zywicki, **K. Bakowska-Zywicka**, N. Polacek*. Revealing stable processing products from ribosome-associated small RNAs by deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(9): 4013-4024, IF₂₀₁₂ **8.278**, punkty MNiSW – **40**
2. A. Pircher, **K. Bakowska-Zywicka**, L. Schneider, M. Zywicki, N. Polacek*. An mRNA-derived noncoding RNA targets and regulates the ribosome. *Molecular Cell*, 2014, 54(1): 147-155, IF₂₀₁₄ **14.018**, punkty MNiSW – **50**

3. **K. Bąkowska-Żywicka***, A. M. Mleczo, M. Kasprzyk, P. Machtel, M. Żywicki, T. Twardowski. The widespread occurrence of tRNA-derived fragments in *Saccharomyces cerevisiae*, FEBS OpenBio, 2016, Published online 21.10.2016, DOI: 10.1002/2211-5463.12127, **IF₂₀₁₅ 2.101, punkty MNiSW – 15**
4. **K. Bąkowska-Żywicka***, M. Kasprzyk, T. Twardowski. tRNA-derived short RNAs bind to *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes in a stress-dependent manner and inhibit protein synthesis *in vitro*. FEMS Yeast Research, 2016, Published online 7.09.2016, DOI: 10.1093/femsyr/fow077, **IF₂₀₁₅ 2.479, punkty MNiSW – 30**
5. A.M. Mleczo, P. Celichowski, **K. Bąkowska-Żywicka***. Ex-translational function of tRNAs and their fragments in cancer, Acta Biochimica Polonica, 2014, 61(2), 211-216, **IF₂₀₁₄ 1.153, punkty MNiSW – 15**
6. M. Kasprzyk, A. Mleczo, P. Celichowski, **K. Bąkowska-Żywicka***. Przetwarzanie RNA – Niezwykły mechanizm powstawania nowych klas niekodujących RNA z funkcjonalnych RNA, Postępy Biochemii, 2014, 60(3), 295-304, **Punkty MNiSW – 5**
7. A.M. Mleczo, **K. Bąkowska-Żywicka***. When small RNAs become smaller: non - canonical functions of snoRNAs and their derivatives, Acta Biochimica Polonica, 2016, Published online 26.10.2016, DOI: 10.18388/abp.2016_1330, **IF₂₀₁₅ 1.187, punkty MNiSW – 15**
8. M. Walkowiak, A. M. Mleczo, **K. Bąkowska-Żywicka***. Evaluation of methods for the detection of low-abundant snoRNA-derived small RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*, BioTechnologia, 2016, 97(1): 19-26, **Punkty MNiSW – 13**

Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe znajdują się w Załączniku nr 4, natomiast oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku nr 5.

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

Podstawowym dogmatem biologii molekularnej jest układ, w którym informacja genetyczna zapisana w DNA jest przekazywana do RNA, a za ich pośrednictwem do białek pełniących funkcje enzymatyczne, transportowe i regulatorowe. Ten prosty podział został mocno skomplikowany i wzbogacony w wyniku odkryć z lat 70-tych, 80-tych i 90-tych XX wieku. Na ich podstawie trzeba było uzupełnić wiedzę o nowe funkcje RNA. Wyodrębniono bowiem grupę funkcjonalnych transkryptów, które nie kodują białek. Takie cząsteczki nazwano niekodującymi RNA (ncRNA, ang. noncoding RNAs). W grupie niekodujących RNA znajdują się zarówno powszechnie występujące w komórkach transferowe RNA (tRNA), rybosomalne RNA (rRNA) czy jąderkowe snoRNA ale również pełniące regulatorowe funkcje krótkie RNA (np. mikro RNA, interferujące RNA – siRNA czy krótkie RNA oddziałujące z białkami PIWI - piRNA) lub długie RNA (np. Xist lub HOTAIR). Dziś wiadomo, że cząsteczki regulatorowych niekodujących RNA pełnią kluczowe role w procesach regulacji ekspresji genów na wielu etapach, np.: modulują strukturę chromatyny, regulują bezpośrednio transkrypcję bądź translację, uczestniczą w składaniu i redagowaniu RNA. Głównym wyzwaniem w badaniach

nad niekodującymi RNA jest określenie funkcji poszczególnych transkryptów. Obecnie znamy mechanizm działania około 1% ncRNA. Dotyczy to głównie dobrze opisanych klas takich jak mikroRNA czy snoRNA. W przypadku pozostałych setek tysięcy transkryptów znana jest jedynie sekwencja. Naglące zatem wydają się być badania prowadzące do ustalenia warunków, w jakich ulegają one ekspresji oraz procesów, w które mogłyby być zaangażowane.

Moje zainteresowanie możliwością regulacji ekspresji genów przez krótkie kwasy nukleinowe na poziomie translacji zrodziło się podczas realizacji pracy doktorskiej, gdzie przy pomocy antysensownych oligonukleotydów komplementarnych do wybranych fragmentów rybosomalnych RNA, modulowałam funkcjonowanie eukariotycznych rybosomów. Stosowane przeze mnie krótkie oligonukleotydy były projektowane *in silico* i wprowadzane do systemu translacji *in vitro*. W warunkach laboratoryjnych obserwowałam, że istnieje możliwość regulacji poziomu biosyntezy białka przez krótkie cząsteczki kwasów nukleinowych bezpośrednio oddziałujące z rybosomem [1-3]. Wówczas zadałam sobie pytanie, czy w naturze również występują takie mechanizmy regulacji działania rybosomu. W związku z tym, po ukończeniu doktoratu wyjechałam na staż podoktorski do laboratorium prof. Norberta Polacka w Innsbrucku (Institute of Molecular Genetics, Innsbruck Medical University), gdzie rozpoczęłam pracę nad poszukiwaniem krótkich niekodujących RNA bezpośrednio oddziałujących z rybosomem na skalę genomową. Wyniki tego projektu zostały opisane w pierwszej z prac składających się na zgłoszone osiągnięcie **[publikacja 1]**. Jako organizm badawczy zastosowałam drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, jako najprostszego ale przy tym modelowy organizm eukariotyczny. Wybór tego organizmu był podyktowany również faktem, że *S. cerevisiae* utraciły w toku ewolucji elementy maszynierii odpowiadającej za powstawanie i funkcjonowanie mikroRNA. Stąd, organizm ten wydał nam się idealnym systemem do nowych badań nad mechanizmami regulacji genów z udziałem krótkich RNA, niezależnymi od szlaku miRNA. Ponadto, ze względu na stosunkowo niską wiedzę (w tamtym okresie rozwiązywane były struktury krystaliczne wyłącznie rybosomów prokariotycznych), zgłębianie funkcjonowania rybosomu eukariotycznego było dodatkowym wyzwaniem. Do moich analiz zastosowałam drożdże hodowane w kilkunastu warunkach wzrostu. Sądziłam, że zmienne warunki środowiskowe mogą wpłynąć na powstawanie krótkich RNA i/lub ich asocjację z rybosomami. W celu identyfikacji jak najpełniejszego repertuaru krótkich RNA ko-migrujących z rybosomami, zaprojektowałam i przygotowałam wyspecjalizowane biblioteki cDNA, w których unikałam stosowania standardowych ale jednocześnie dość brutalnych metod izolacji rybosomów, optymalizując i kładąc nacisk na delikatne warunki izolacji możliwie wszystkich kompleksów ncRNA/rybosom. Przygotowane przeze mnie biblioteki cDNA zostały poddane wysokoprzepustowemu sekwencjonowaniu. Po przeprowadzeniu analizy bioinformatycznej z użyciem stworzonego w ramach projektu programu APART, wyodrębniłam ponad 200 niekodujących RNA oddziałujących z rybosomami. Co ciekawe, zaobserwowałam istnienie przetwarzania prawie wszystkich typów transkryptów obecnych w *S. cerevisiae*, włącznie z mRNA, tRNA, snoRNA i rRNA, do krótszych cząsteczek. W następnym kroku wyniki analizy bioinformatycznej zweryfikowałam eksperymentalnie przy użyciu techniki hybrydyzacji typu northern, która potwierdziła obecność przewidzianych przez APART produktów wycinania w

większości analizowanych przypadków, w szczególności powstających z tRNA, rRNA oraz snoRNA. Co więcej, z analiz biochemicznych okazało się, że wycinanie zachodzi wyłącznie w ściśle określonych warunkach wzrostu *S. cerevisiae*, specyficznych dla konkretnej cząsteczki. Potwierdzone eksperymentalnie wyniki analizy obliczeniowej zasugerowały istnienie nowego typu mechanizmu powstawania stabilnych w komórce cząsteczek RNA. Było to jednocześnie pierwsze doniesienie wskazujące na możliwość regulacji działania rybosomów poprzez bezpośrednie wiązanie krótkich niekodujących RNA.

W następstwie odkrycia istnienia krótkich RNA oddziałujących z rybosomami w *S. cerevisiae*, moja uwaga skupiła się zgłębieniu przyczyn i potencjalnych efektów oddziaływań ncRNA/rybosom. Najbardziej zainteresował mnie 18-nukleotydowy (ncRNA_18) fragment mRNA kodującego enzym modyfikujący tRNA - metylotransferazę tRNA TRM10. Był to RNA występujący w największej ilości w porównaniu do pozostałych fragmentów mRNA obecnych w bibliotece cDNA. Wyniki analiz funkcjonalnych ncRNA_18 przedstawione są w drugiej z prac składających się na zgłoszone przeze mnie osiągnięcie **[publikacja 2]**. Przy użyciu standardowych technik detekcji wykazałam obecność ncRNA_18 w drożdżach jak i jego oddziaływanie z rybosomami, głównie z nieaktywnymi translacyjnie monosomami. Ponadto, przy użyciu szeregu testów translacji *in vitro* oraz *in vivo* zarówno w drożdżach jak i innych modelowych organizmach wykazałam, że ncRNA_18 obniża biosyntezę białka poprzez oddziaływanie z rybosomem. W warunkach stresu osmotycznego obserwowaliśmy za to migrację ncRNA_18 do aktywnych translacyjnie polisomów i obniżenie wydajności translacji. Dodatkowo wykazaliśmy, że obserwowany efekt inhibitorowy jest specyficzny względem sekwencji ncRNA_18, gdyż wprowadzenie mutacji skutkowało zniesieniem efektu regulatorowego. Po przeanalizowaniu wszystkich obserwacji zaproponowaliśmy mechanizm, według którego redukcja aktywności translacyjnej drożdży przez ncRNA_18 ma zasadnicze znaczenie podczas odpowiedzi na stres zasolenia. Pozbawienie komórek tego fragmentu RNA powodowało również znaczne opóźnienie w obniżeniu poziomu metabolizmu w warunkach nieoptymalnych. Opóźnienie to jest istotne, ponieważ transkryptom *S. cerevisiae* zmienia się w 30-45 min. po ekspozycji na stres [4]. Po adaptacji programu transkrypcyjnego komórki do nowych warunków, obserwowaliśmy oddysocjowanie ncRNA_18 z polisomów, co umożliwiało tym samym translację nowego zestawu białek niezbędnych do przeżycia w warunkach stresu osmotycznego. Wyniki te sugerują, że krótki, 18-nt RNA pochodzący z mRNA może stanowić element systemu natychmiastowej odpowiedzi na stres osmotyczny, nie wymagający syntezy nowych cząstek regulatorowych. W ten sposób opisany przez nas ncRNA_18 jest pierwszym przykładem krótkiego regulatorowego ncRNA powstającego z części kodującej mRNA. Również mechanizm jego działania poprzez asocjacje z rybosomami jest bezprecedensowy.

Poznanie mechanizmu działania pierwszego funkcjonalnego ncRNA regulującego translację poprzez bezpośrednie interakcje z rybosomem utwierdziło mnie w przekonaniu, że również pozostałe wyłonione przez nas niekodujące RNA [publikacja 1] mogą mieć istotne znaczenie regulatorowe. Stąd, po powrocie ze stażu podoktorskiego, wprowadziłam tematykę krótkich RNA powstających z tRNA i snoRNA do Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii

Nauk w Poznaniu, gdzie od 2012 roku zostałam zatrudniona jako adiunkt w Zakładzie Biologii RNA, kierowanym przez prof. Tomasza Twardowskiego. Tutaj, rozpocząłam realizację kierowanego przeze mnie projektu Pomost, finansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej „*Revealing an unknown function of tRNA-derived small RNAs in Saccharomyces cerevisiae*”. W pierwszym etapie zajęłam się odpowiedzią na pytanie jak powszechne jest i od czego zależy powstawanie krótkich niekodujących RNA (potencjalnie oddziałujących z rybosomami) z cząsteczek tRNA. Wyniki tych analiz przedstawiam w trzeciej publikacji wchodzącej w skład osiągnięcia [publikacja 3]. Występowanie krótkich RNA pochodzących z cząsteczek tRNA (tRF, ang. tRNA-derived fragments) wykazano u wielu organizmów, zarówno prokariotów, jak i eukariotów, w tym także u ludzi [5]. Do tej pory powszechny był pogląd, że powstawanie fragmentów tRNA jest indukowane warunkami stresowymi [6]. Jak wiadomo, nieoptymalne warunki powodują szybkie i dynamiczne zmiany w komórkach. Dochodzi do globalnego obniżenia transkrypcji, a w następstwie również syntezy białek, a także do wzrostu ekspresji i translacji indukowanych stresem genów. Jakiegokolwiek zmiany w dostępności cząsteczek tRNA również mogą wywierać wpływ na poziom syntezy białek. Wcześniejsze badania z użyciem sekwencjonowania w drożdżach *S. cerevisiae* pokazały, że powstawanie fragmentów tRNA jest ograniczone do specyficznych warunków środowiskowych [7, 8]. Moje badania nacełowane były na identyfikację jak najszerszego repertuaru tRF powstających ze wszystkich izoform tRNA *S. cerevisiae* w dwunastu zróżnicowanych warunkach środowiskowych. Ze względu na fakt, że w dojrzałych tRNA zidentyfikowano ponad 100 różnych zmodyfikowanych nukleotydów, a niektóre z tych modyfikacji stanowią sygnał dla rybonukleaz (co skutkuje cięciem w specyficznych miejscach), do detekcji tRF zastosowałam metodę niezależną od występowania modyfikacji w RNA, czyli hybrydyzację typu northern. Sondy wykrywające tRF zostały przeze mnie tak zaprojektowane, aby odróżnić produkty przetwarzania niemal wszystkich izoform tRNA. W pracy tej wykazałam, że metoda izolacji RNA znacznie wpływa na możliwość detekcji krótkich fragmentów tRNA, co mogło mieć zdecydowany wpływ na wyniki wcześniejszych doniesień wskazujących na nieobecność pewnych tRF w określonych warunkach środowiskowych. W naszej pracy wykazaliśmy, że fragmenty pochodzące z tRNA występują w znacznych ilościach w drożdżach *S. cerevisiae*, jednak ich łączna ilość nie zmienia się pod wpływem warunków stresowych. Jest to ważne odkrycie pokazujące, że przetwarzanie tRNA do krótszych stabilnych fragmentów jest powszechne w *S. cerevisiae*. Wykazaliśmy jednak, że w określonych warunkach środowiskowych preferencyjnemu cięciu ulegają specyficzne izoformy tRNA. Dodatkowo, nasze badania jako pierwsze pokazały, że ogólna ilość fragmentów generowanych z części zarówno 3' jak i 5' cząsteczek tRNA jest zbliżona, w przeciwieństwie do wcześniejszych danych [9]. Dość zaskakująca wydała się przy tym obserwacja, że pomimo znacznej ilości powstających tRF, odsetek ciętych w czasie stresu tRNA jest bardzo niski i nie ma wpływu na obniżenie generalnej puli komórkowego tRNA. To spostrzeżenie skierowało moje dalsze zainteresowanie w kierunku próby skorelowania ilości poszczególnych krótkich RNA powstających w określonych warunkach środowiskowych z tRNA a ich oddziaływaniem z rybosomami. W rezultacie, przebadalam pięć wybranych tRF, które w warunkach *in vivo* (biblioteka cDNA, [publikacja 1]) najczęściej oddziaływały w rybosomami *S. cerevisiae*. Wyniki

tych analiz przedstawiłam w czwartej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia **[publikacja 4]**. Wykazałam, że tRF pochodzące zarówno z 5'-części pełnej długości tRNA jak i z 3'-części (odpowiednio, 5'-tRF i 3'-tRF), są zdolne do specyficznego oddziaływania z rybosomami *S. cerevisiae* w warunkach *in vitro*. Tym samym, jest to pierwsze doniesienie o możliwym działaniu regulatorowym tRF pochodzących z części 3' cząsteczek tRNA. Wcześniejsze badania krótkich tRNA w archea (grupa prof. Polacka) oraz w komórkach ludzkich wskazywały na wpływ jedynie 5'-tRF na proces translacji poprzez blokowanie syntezy wiązań peptydowych [10] lub na etapie rekrutacji czynników inicjatorowych [11]. Ponadto wykazałam, że 5'-tRF oddziałują z rybosomem w miejscu innym niż 3'-tRF i nie jest to żadne z klasycznych miejsc wiązania pełnej długości tRNA w rybosomie. Analizując profile interakcji pięciu tRF z rybosomami pozyskiwanymi z drożdży hodowanych w dwunastu zróżnicowanych warunkach i konfrontując je z moimi wcześniejszymi danymi [publikacja 3] wyciągnęłam wniosek, że nie powstawanie, ale asocjacja tRF z rybosomami jest ściśle regulowana przez warunki środowiskowe. Zależne od stresu interakcje tRF/rybosom w konsekwencji prowadzą do inhibicji biosyntezy białka. W tym aspekcie należy traktować drożdżowe 3'-tRF jak i 5'-tRF jako drugi zidentyfikowany i opisany przykład reprezentujący nowopowstałą klasę krótkich niekodujących RNA oddziałujących z rybosomami (rancRNA, ang. ribosome-associated noncoding RNAs), po ncRNA_18 [publikacja 2].

Warto w tym miejscu wspomnieć, że cząsteczki tRNA są bardzo zachowawcze ewolucyjnie, co może sugerować, że powstałe z nich fragmenty mogą reprezentować najbardziej prymitywne ścieżki funkcjonowania krótkich RNA. Zarówno moje odkrycia jak i znaczna ilość doniesień dotyczących różnorodności możliwych funkcji tRNA, publikowanych systematycznie począwszy od 2012 roku, skłoniła mnie do próby usystematyzowania dotychczasowej wiedzy. Wnikliwa analiza dostępnych danych literaturowych dotyczących niekanonicznych funkcji cząsteczek tRNA zaowocowała powstaniem pracy przeglądowej **[publikacja 5]**. W pracy tej przyjrzelśmy się funkcji biologicznej zarówno pełnej długości tRNA jak i krótkich RNA pochodzących z tRNA. Poziom poszczególnych izoform tRNA w komórkach jest ściśle regulowany i specyficzny dla określonego typu komórek czy tkanek a także podczas każdego stadium rozwojowego. Jakiegokolwiek zaburzenia fizjologicznego poziomu mogą zatem prowadzić do procesów patologicznych, w tym nowotworzenia. Już w latach '70 ubiegłego wieku obserwowano zależności między wzmożoną proliferacją komórek a metabolizmem i biosyntezą białek. Biorąc pod uwagę ten istotny problem, duża część naszej pracy została poświęcona opisaniu zależności pomiędzy ilością tRNA i ich pochodnych a procesami nowotworowymi.

Jednocześnie, rozpoczęłam próbę usystematyzowania dotychczasowej wiedzy na temat fenomenu z udziałem wielu komórkowych niekodujących RNA, które mogą w określonych warunkach stać się prekursorami krótszych RNA. Tego typu obróbkę RNA, obejmującą cięcie stabilnych niekodujących („rodzicielskich”) RNA zaproponowałam nazywać „przetwarzaniem RNA” i ujęłam w pracy przeglądowej **[publikacja 6]**. Temat jest niezwykle istotny, ale i dość nowy - pierwsze dowody na istnienie funkcjonalnych fragmentów pochodzących z

komórkowych RNA pojawiły się w 2008 roku, kiedy Ender wraz ze współpracownikami potwierdził obecność fragmentu pochodzącego ze snoRNA, który działa jak miRNA [12]. Od czasu tego odkrycia opublikowano wyniki wielu badań, które potwierdzały istnienie fragmentów RNA pełniących specyficzne funkcje, niezależne od funkcji pełnionych przez rodzicielskie RNA. Podczas gdy spora część krótkich RNA jest znajdowana w niewielkich ilościach i stanowi produkt degradacji RNA, tak fragmenty RNA pełniące własne funkcje znajdują się w ilościach często przekraczających ilości miRNA [publikacja 1, publikacja 3 oraz 13, 14]. W artykule przeglądowym [publikacja 6] przybliżyliśmy obecny stan wiedzy obrazujący kilka lat intensywnych badań, których wyniki w krótkim czasie wykazały istnienie wielu nieznanych dotąd mechanizmów regulujących istotne funkcje komórek, jak odpowiedź na stres, regulacja metabolizmu czy cyklu komórkowego.

Zainspirowana najnowszymi doniesieniami na temat przetwarzania komórkowych RNA [publikacja 6] jak i możliwością systematycznego wyłaniania nowych cząsteczek rancRNA, dla których udowadniałam funkcjonalność, zadałam sobie pytanie czy również inne cząsteczki RNA wyodrębnione w naszych pierwszych badaniach [publikacja 1] mają właściwości regulatorowe. Stąd, moja uwaga skupiła się na krótkich RNA powstających z małych jąderkowych RNA (snoRNA), czyli sdRNA (ang. snoRNA-derived RNAs). Badania prowadziłam w ramach kierowanego przeze mnie projektu Sonata, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki „W poszukiwaniu nowych mechanizmów kontroli ekspresji genów odmiennych od RNAi - krótkie RNA powstające ze snoRNA”. W pierwszym etapie zajęłam się próbą uporządkowania wiedzy i wszystkich doniesień przedstawiających możliwe role pełnione przez snoRNA jak i powstające z nich krótkie RNA. Wynikiem tych dociekliwych analiz była praca przeglądowa, ujęta w przedstawionym osiągnięciu **[publikacja 7]**. snoRNA kierują modyfikacjami RNA i zlokalizowane są w jąderkach i ciałkach Cajala w komórkach eukariotycznych. Nasze dane pochodzące z sekwencjonowania bibliotek RNA ko-precypitujących z rybosomami [publikacja 1] zasugerowały nieopisany wcześniej sposób działania snoRNA w drożdżach *S. cerevisiae*. Ta nowa ścieżka regulacyjna jest najprawdopodobniej aktywowana w odpowiedzi na określone warunki środowiskowe i obejmuje przetwarzanie snoRNA (po lub przed eksportem do cytoplazmy) i asocjację powstałych w ten sposób sdRNA z rybosomami. Mniej więcej w tym samym czasie miało miejsce odkrycie lokalizacji cytoplazmatycznej snoRNA również przez inne grupy badawcze [15] a także pojawiły się doniesienia o przetwarzaniu snoRNA w cytoplazmie do krótszych fragmentów, sdRNA. Jak dotąd, istnienie sdRNA wykazano w kilku organizmach eukariotycznych [12, 16-22] a także u jednego wirusa [23]. Warto również wspomnieć, że odkryte przez nas drożdżowe sdRNA są nietypowe w porównaniu z innymi opisywanymi w literaturze. Po pierwsze, ich długość waha się od 18 do 43 nt (nie są to typowe długości dla obserwowanych sdRNA pełniących funkcje miRNA). Ponadto, pozycja cięcia drożdżowych snoRNA może być zlokalizowana na całej długości cząsteczki: obserwowaliśmy sdRNA pochodzące z terminalnych części (zarówno 5' jak i 3') jak i środkowych części snoRNA, co również świadczy o unikatowości sdRNA w *S. cerevisiae*. Wszystkie znane sdRNA były identyfikowane poprzez wysokoprzepustowe sekwencjonowanie, również przez naszą grupę [publikacja 1] i w większości przypadków ich ilość w komórkach była niewielka. Należy jednak

mieć na uwadze, że ze względu na małą ilość nie można wykluczać ich regulatorowego potencjału, bowiem nasze wcześniejsze badania wykazały, że nawet stosunkowo niewielkie ilości ncRNA₁₈ (~27 000 cząsteczek na komórkę) są wystarczające do silnego efektu inhibitorowego w stosunku do bardziej powszechnego rybosomu (~200 000 rybosomów/komórkę) [publikacja 2]. Dlatego w kolejnych etapach mojej pracy nad sdRNA skupiłam się nad opracowaniem wiarygodnej metody eksperymentalnej potwierdzającej występowanie nielicznych sdRNA w *S. cerevisiae*. Wyniki te przedstawiłam w ostatniej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia [publikacja 8]. Wykazaliśmy w niej, że standardowe metody detekcji kwasów nukleinowych (takie jak hybrydyzacja typu northern) są w tym przypadku zawodne, ponieważ ich czułość jest niewystarczająca do wykrycia małej ilości sdRNA. Jednocześnie, bardziej liczne pełnej długości snoRNA były zawsze tą metodą przez nas wykrywane. Bazując na naszych wcześniejszych wynikach pokazujących ścisłą zależność możliwości detekcji tRF od użytej metody izolacji RNA [publikacja 3], zbadaliśmy czy taka korelacja występuje również w przypadku sdRNA. Uzyskane przez nas wyniki nie wskazywały jednak na istnienie takiego związku. Ponadto, standardowo stosowane do detekcji miRNA techniki amplifikacji mało licznych krótkich RNA nie mogły mieć zastosowania w przypadku sdRNA, ze względu na fakt, że sdRNA i ich cząsteczki prekursorowe, czyli pełnej długości snoRNA posiadają taką samą sekwencję terminalną. Dopiero zastosowanie zoptymalizowanej i zaadaptowanej przez nas metody pulsacyjnej odwrotnej transkrypcji krótkich RNA w połączeniu z amplifikacją z użyciem wyspecjalizowanych starterów o strukturze pnia i pętli (SL-RT-PCR, ang. stem-loop reverse transcription PCR, [24]) zaowocowało uzyskaniem pozytywnych rezultatów. Zaobserwowaliśmy występowanie sdRNA przy zastosowaniu 50-100 ng wyjściowego RNA. Skonkludowaliśmy, że pulsacyjna odwrotna transkrypcja połączona z techniką SL-PCR jest odpowiednią metodą do czułego wykrywania krótkich RNA (takich jak sdRNA *S. cerevisiae*) występujących w małych ilościach w komórkach.

Podsumowując, zwyczajowo cząsteczki niekodujących RNA dzielone były na ulegające stałej ekspresji i biorące udział w podstawowych procesach komórkowych transkrypty konstytutywne oraz indukowalne cząsteczki regulatorowe. W ostatnim czasie granice te uległy jednak zatarciu. Stało się to za sprawą doniesień na temat cząsteczek uznawanych za konstytutywne, które wykazywały aktywności nie związane ze swoją zasadniczą funkcją. Taka "dwufunkcyjność" została zidentyfikowana przeze mnie dla mRNA, tRNA i snoRNA. Za moje najważniejsze osiągnięcie uważam zatem odkrycie i opisanie nowej klasy regulatorowych RNA (przetworzonych z komórkowych RNA), które oddziałują z rybosomem. Dla rancRNA₁₈ poznaliśmy już dokładny mechanizm regulacji translacji poprzez oddziaływanie z rybosomem indukowane przez stres osmotyczny. Oddziaływanie krótkich RNA powstających z tRNA jest również zależne od warunków stresowych i w konsekwencji powoduje upośledzenie procesu biosyntezy białka. Z kolei sdRNA powstające ze snoRNA występują w bardzo małych ilościach w komórce, dlatego skupiłam się na opracowaniu metody ich rzetelnej detekcji. W najbliższej przyszłości zamierzam położyć nacisk na zgłębienie dokładnego mechanizmu regulacji ekspresji genów poprzez oddziaływania tRF/rybosom oraz sdRNA/rybosom. Jednakże już na

tym etapie, uważam, że moje badania w znaczący sposób poszerzyły wiedzę na temat krótkich regulatorowych RNA.

Zachowawczość mechanizmów molekularnych między drożdżami a człowiekiem pozwala na użycie komórek *S. cerevisiae* jako modelu do badań mechanizmów doprowadzających do wielu chorób człowieka. Około 30% znanych genów zaangażowanych w ludzkie choroby posiada drożdżowe ortologi. Obecnie drożdże z powodzeniem używane są do badań schorzeń neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy choroba Huntingtona [25]. Poza tym stres oksydacyjny został powiązany z procesami nowotworzenia i starzenia. Ze względu na uniwersalność reakcji na stres, szczegółowa analiza w *S. cerevisiae* pomaga lepiej zrozumieć mechanizmy obronne od mikroorganizmów począwszy do człowieka. W konsekwencji, stanowi niezbędne fundamenty praktycznych zastosowań eksploatacyjnych, szczególnie w piekarnictwie, gorzelnictwie, browarnictwie i winiarstwie. W odniesieniu do zastosowań przemysłowych, reakcja na stres jest kluczowa dla komórek drożdży. Zastosowanie przemysłowe naraża drożdże na wpływ niekorzystnych warunków. Nowe funkcjonalne krótkie RNA powinny ponadto stanowić potencjalne cele dla terapii przeciwgrybiczych. Uważam, że poprzez moje badania podstawowe z zakresu nowych mechanizmów regulacji ekspresji genów zależnych od stresu, będziemy mogli przyczynić się do rozwoju branży przemysłu wykorzystujących drożdże.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed przyznaniem stopnia doktora.

Mój dorobek naukowy przed przyznaniem stopnia doktora nauk chemicznych obejmuje 8 prac, w tym 4 prace eksperymentalne [1-2, 25-26], trzy prace przeglądowe [27-29] i jeden rozdział w monografii [30].

Pracę naukową rozpoczęłam jeszcze jako studentka Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, gdzie pod opieką naukową prof. Marii Krzakowej realizowałam pracę magisterską „Genetyczna różnorodność populacji dębu omszonego (*Quercus pubescens* Willd.) w odniesieniu do innych gatunków rodzimych (*Quercus petraea* Matt. Lieb and *Quercus robur* L)”. Zajmowałam się wówczas profilowaniem zróżnicowania genetycznego wewnątrz- jak i między-populacyjnego rodzimych gatunków dębu z zastosowaniem analiz biochemicznych izoenzymów [25]. Ponadto, w ramach dodatkowego projektu, oszacowałam różnorodność dębu omszonego analizując cechy morfologiczne liści [26]. Temat zmienności genetycznej jest nadal ogromnie aktualny a współpraca z prof. Krzakową nawiązana podczas pracy magisterskiej jest przeze mnie kontynuowana. Obecnie, wspólnie realizujemy projekt dotyczący zmienności allozymów peroksydazy w populacji dębu omszonego a praca dotycząca tego tematu jest na etapie recenzji.

Pracę doktorską realizowałam w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk pod opieką prof. Tomasza Twardowskiego. W jej trakcie zajmowałam się głównie realizacją projektu promotorskiego, którego byłam kierownikiem, finansowanego przez Ministerstwo Szkolnictwa Wyższego i Edukacji „Korelacja struktury i funkcji wybranych fragmentów rRNA w regulacji biosyntezy polipeptydów w układzie roślinnym”. Z zastosowaniem technologii antysensowych oligonukleotydów (aDNA) badałam dostępność poszczególnych domen rybosomu łubinowego w zmiennych stanach konformacyjnych [1, 2]. Samodzielnie projektowałam cząsteczki krótkich aDNA, tak, aby badać miejsca opisywane w literaturze jako funkcjonalnie ważne w rybosomalnych RNA dużej i małej podjednostki. Udowodniłam, że krótkie cząsteczki kwasów nukleinowych mogą być w powodzeniem stosowane w modulowaniu procesu biosyntezy białka. Prace te są o tyle istotne, że w tamtym czasie poznano jedynie strukturę krystaliczną rybosomu prokariotycznego, więc nasze prace biochemiczne były jednymi z pierwszych wskazujących na zmiany konformacyjne rybosomów eukariotycznych. Podczas realizacji mojej pracy doktorskiej podjęłam próbę usystematyzowania wiedzy dotyczącej funkcjonowania rybosomów jak i możliwości potencjalnych zastosowań krótkich kwasów nukleinowych. W efekcie, powstały trzy prace przeglądowe, których jestem pierwszą autorką [27-29] oraz rozdział w monografii [30].

5.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze po przyznaniu stopnia doktora.

Mój dorobek naukowy po przyznaniu stopnia doktora nauk chemicznych (bez prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego) obejmuje 14 prac, w tym 3 prace eksperymentalne [31, 38, 40], siedem prac przeglądowych [32-37, 41] i cztery rozdziały w monografiach [3, 24, 39, 42]. W tym czasie byłam również ko-edytorem dwóch wydań kwartalnika Biotechnologia, poświęconych strukturze i funkcjonowaniu rybosomów (#1/2009) a także niekodującym RNA (#3/2010).

Główny nurt moich zainteresowań badawczych, będących kontynuacją zainteresowań rodzących się podczas realizacji pracy doktorskiej, obejmuje funkcjonowanie rybosomu a także możliwości regulacji jego działania poprzez krótkie niekodujące RNA. Tematyka funkcjonowania rybosomów prokariotycznych była przeze mnie badana w laboratorium prof. Norberta Polacka w Innsbrucku (Institute of Molecular Genetics, Innsbruck Medical University). Zajmowałam się wówczas rolą nukleotydu w pozycji A2602 w procesie terminacji translacji, jednym z dwóch (obok syntezy wiązania peptydowego) kluczowych reakcji podczas biosyntezy białka w rybosomie. Nasz zespół badawczy odkrył, że grupa 2'OH rybozy w pozycji A2602 jest elementem niezbędnym dla prawidłowego uwolnienia peptydylo-tRNA z rybosomu, przy czym nie ma wpływu na reakcję transpeptydacji, jak wcześniej sądzono [31]. Pozostając w tej tematyce, przeanalizowałam zarówno nasze dotychczasowe doniesienia jak i systematycznie pojawiające się dane literaturowe i przygotowałam artykuły przeglądowe dotyczące struktury i funkcjonowania rybosomów eukariotycznych [32] oraz samego procesu terminacji translacji [33]. W tym czasie pełniłam rolę edytora tematycznego zeszytu Biotechnologii, poświęconego rybosomowi (#1/2009), na potrzeby którego przygotowałam

komentarz dotyczący historii odkrycia i wczesnych badań rybosomów [34] a także kilka prac traktujących o najnowszych doniesieniach o rybofagii [35], ponownym wykorzystywaniu przez komórkę rybosomów eukariotycznych [36] i strukturze rybosomalnych mostków między podjednostkami [37].

Jednocześnie, moje zainteresowania kierowały się coraz bardziej od zgłębiania molekularnych mechanizmów funkcjonowania rybosomu ku możliwościom regulacji tego procesu. Jeszcze w laboratorium prof. Twardowskiego realizowałam projekt dotyczący mini-tRNA. Wykazałam wówczas, że minimalne cząsteczki tRNA, składające się jedynie z pętli antykodonowej i pnia akceptorowego lub jedynie z pętli DHU i pnia akceptorowego, są zdolne do wiązania się do rybosomalnych miejsc A i P, do których podczas biosyntezy białka w komórce przyłączane są odpowiednie tRNA [38]. Praca ta okazała się w późniejszym czasie niezwykle istotna przy interpretacji wyników dotyczących potencjału regulatorowego drożdżowych tRF [publikacja 4].

Obecnie, główny nurt moich prac badawczych oscyluje nadal wokół krótkich RNA regulujących działanie rybosomu. Badania realizowane są w ramach projektu Sonata NCN, którego jestem kierownikiem. W skład mojego zespołu badawczego realizującego projekt wchodzi doktorantka oraz dwóch magistrantów, których jestem opiekunem naukowym. Aktualnie skupiamy się nad poszukiwaniem zależności pomiędzy warunkami stresowymi a powstawaniem krótkich RNA ze snoRNA, umiejscowieniem procesu przetwarzania snoRNA do sdRNA w konkretnym kompartmentcie komórkowym a także poznaniem mechanizmu regulacji translacji z udziałem sdRNA w modelowych organizmach eukariotycznych. W perspektywie, chcielibyśmy zwrócić się ku badaniom chorób, które swoje podłoże mają w nieprawidłowym działaniu rybosomów (rybosomopatie). W tym temacie w ostatnim czasie opublikowaliśmy trzy rozdziały w monografiach [6, 24, 39].

Poza głównymi zainteresowaniami związanymi z niekodującymi RNA oddziałującymi z rybosomami, począwszy od 2012 roku włączyłam się w nurt badań dotyczący próby stworzenia uniwersalnej metody pozwalającej na dokładne oznaczenie katalogu stabilnych struktur drugorzędowych RNA dla całego transkryptomu ludzkiego w warunkach *in vivo* a także stworzenie rzetelnej metody oznaczania produktów przedwczesnej terminacji transkrypcji *in vivo*. Oba projekty realizowane są we współpracy z Zakładem Biologii Obliczeniowej Wydziału Biologii UAM w Poznaniu, gdzie zlokalizowany jest projekt Sonata finansowany przez Narodowe Centrum Nauki „Badania struktury drugorzędowej RNA *in vivo* z zastosowaniem metod wysokowydajnego sekwencjonowania” (kierownik projektu: dr Marek Żywicki). Aby osiągnąć zamierzony cel, połączone zostały metody eksperymentalne biologii molekularnej z bioinformatycznymi. W ogólnym zarysie, zaplanowaliśmy wykonanie modyfikacji rejonów jednoniciowych natywnych RNA w komórkach ludzkich oraz sekwencjonowanie z użyciem wysokowydajnych metod skróconych w wyniku modyfikacji cząsteczek cDNA, reprezentujących kompletny transkryptom. Zakładamy, że analiza obliczeniowa danych pochodzących z sekwencjonowania pozwoli na zidentyfikowanie

rejonów RNA wrażliwych na czynnik modyfikujący i finalnie na skonstruowanie map dostępności strukturalnej transkryptomu. Do tej pory wykazaliśmy, że zastosowanie ograniczeń w postaci danych z próbkowania chemicznego podczas przewidywania struktury drugorzędowej krótkich RNA w nikły sposób wpływa na jakość modelu. Natomiast wprowadzenie znanych pozycji modyfikacji nukleotydów wpływa na modele zarówno uwzględniające jak i nieuwzględniające dane z próbkowania chemicznego podczas przewidywania struktury drugorzędowej krótkich RNA [40]. Ponadto, zebraliśmy istniejące dane literaturowe dotyczące potencjału aplikacyjnego silnie ustrukturyzowanych cząsteczek RNA reagujących zmianą konformacyjną na dostępność niskocząsteczkowych ligandów (ryboprzełączniki) i przedstawiliśmy je w postaci artykułu przeglądowego [41] oraz rozdziału w monografii [42].

Wyniki swoich badań naukowych prezentowałam nie tylko w postaci publikacji naukowych ale również na prestiżowych konferencjach naukowych, krajowych i zagranicznych, zarówno w formie referatu jak i prezentacji posterowych. Od lat staram się spełniać swoją rolę dydaktyczną i popularyzować osiągnięcia naukowe. Stąd, obok znacznej ilości artykułów o charakterze przeglądowych byłam jak dotąd promotorem pięciu prac magisterskich i aktywnie uczestniczę w społeczności tworzącej towarzystwa naukowe – jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego a w Polskiej Federacji Biotechnologii dodatkowo pełnię funkcję kierownika Biura PFB. Jako mama trójki dzieci, chętnie włączałam się w organizację warsztatów przedstawiających w jasny sposób pracę w laboratorium dzieciom ze szkół podstawowych oraz uczestniczę w projekcie „Od laika do przyrodnika” skierowanym do młodzieży licealnej. Szczegółowe dane dotyczące mojego dorobku naukowego zostały zebrane w Załączniku nr 6 a informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki w Załączniku nr 7.

Literatura uzupełniająca:

- 1) Dudzińska-Bajorek B, **Bąkowska K**, Twardowski T (2006) Conformational changes of L-rRNA during elongation of polypeptide. *J Plant Physiol* 163: 463-474.
- 2) **Bąkowska-Żywicka K**, Twardowski T (2007) Correlation of the structure and conformational changes of selected fragments of plant small ribosomal RNA within the steps of polypeptide chain elongation. *J Plant Physiol* 164: 496-504.
- 3) **Bakowska-Zywicka K**, Kietrys AM, Twardowski T (2008) Antisense oligonucleotides targeting universally conserved 26S rRNA domains of plant ribosomes at different steps of polypeptide elongation. *Oligonucleotides* 18: 75-86.
- 4) Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257.
- 5) Gebetsberger J, Polacek N (2013) Slicing tRNAs to boost functional ncRNA diversity. *RNA Biol* 10: 1798-17806.
- 6) Tyczewska A, **Bąkowska-Żywicka K**, Gracz J, Twardowski T (2016) Stress Responsive Non-protein Coding RNAs, In book: *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, Edition: 1, Chapter: 7, Publisher: InTech - Open Access Publisher, Editors: Arun K. Shanker, Chitra Shanker, pp.153-181

- 7) Thompson DM, Lu C, Green PJ, Parker R (2008) tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* 14(10): 2095-2103.
- 8) Thompson DM, Parker R (2009) The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 185(1): 43-50.
- 9) Kumar P, Anaya J, Mudunuri SB and Dutta A (2014) Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Biol* 1, 12–78.
- 10) 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.
- 11) Ivanov P, Emara MM, Villen J, Gygi SP, Anderson P (2011) Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell* 43(4): 613-23.
- 12) Ender C, Krek A, Friedlander MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, Pfeffer S, Rajewsky N, Meister G (2008) A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell* 32: 519–528.
- 13) Lee YS, Shibata Y, Malhotra A, Dutta A (2009) A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev* 23: 2639-2649.
- 14) Li Z, Kim SW, Lin Y, Moore PS, Chang Y, John B (2009) Characterization of viral and human RNAs smaller than canonical microRNAs. *J Virol* 83: 12751-12758.
- 15) Michel CI, Holley CL, Scruggs BS, Sidhu R, Brookheart RT, Listenberger LL, Behlke MA, Ory DS, Schaffer JE (2011) Small nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a are critical mediators of metabolic stress. *Cell Metab* 14: 33–44.
- 16) Bortolin-Cavaille ML, Cavaille J (2012) The SNORD115 (H/MBII-52) and SNORD116 (H/MBII-85) gene clusters at the imprinted Prader-Willi locus generate canonical box C/D snoRNAs. *Nucleic Acids Res* 40: 6800–6807.
- 17) Kishore S, Khanna A, Zhang Z, Hui J, Balwierz PJ, Stefan M, Beach C, Nicholls RD, Zavolan M, Stamm S (2010) The snoRNA MBII- 52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Hum Mol Genet* 19: 1153–1164.
- 18) Bai B, Yegnasubramanian S, Wheelan SJ, Laiho M (2014) RNA-Seq of the nucleolus reveals abundant SNORD44-derived small RNAs. *PLoS One* 9: e107519.
- 19) Brameier M, Herwig A, Reinhardt R, Walter L, Gruber J (2011) Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Res* 39: 675–686.
- 20) Burroughs AM, Ando Y, de Hoon MJ, Tomaru Y, Suzuki H, Hayashizaki Y, Daub CO (2011) Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol* 8: 158–177
- 21) Saraiya AA, Wang CC (2008) snoRNA, a novel precursor of micro-RNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* 4: e1000224.
- 22) Hutzinger R, Feederle R, Mrazek J, Schiefermeier N, Balwierz PJ, Zavolan M, Polacek N, Delecluse HJ, Huttenhofer A (2009) Expression and processing of a small nucleolar RNA from the Epstein-Barr virus genome. *PLoS Pathog* 5: e1000547.
- 23) Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Meth* 3: 12.
- 24) Walkowiak M, Bąkowska-Żywicka K (2016) Na co chorują drożdże - modelowanie chorób człowieka w *Saccharomyces cerevisiae*, w: Postęp medycyny w leczeniu i ochronie zdrowia, Tom II, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o. o., Lublin, Polska, Red: B. Drop, P. Kiciński, s. 55-66
- 25) Krzakowa M, Bąkowska K, Danielewicz W (2004) Genetic variation patterns in marginal population of pubescent oak (*Quercus pubescens* Willd.) at Bielinek, on the Odra River. *Ecological Questions* 4: 77-82.
- 26) Danielewicz W, Bąkowska K, Krzakowa M (2003) Variability of downy oak (*Quercus pubescens* Willd.) marginal population in Bielinek (north-western Poland) in morphological traits of leaves. *Rocznik Dendrologiczny* 50: 43-48.
- 27) Bąkowska K, Dudzińska-Bajorek B, Twardowski T (2004) Mini-tRNA jako narzędzie identyfikacji elementów struktury tRNA odpowiedzialnych za aminoacylację. *Postepy Biochem* 50: 2-10.

- 28) **Bąkowska K** (2005) Funkcja wybranych fragmentów 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej w procesie biosyntezy białka. *Biotechnologia* 2(69): 206-214.
- 29) **Bąkowska-Żywicka K**, Tyczewska A, Twardowski T (2006) Kontrowersje wokół mechanizmu syntezy wiązania peptydowego w rybosomie. *Postepy Biochem* 52(2): 166-172.
- 30) Tyczewska A, **Bąkowska-Żywicka K**, Twardowski T (2006) Terapeutyczne zastosowania aptamerów. *Na pograniczu chemii i biologii XIV*: 175-203.
- 31) Amort M, Wotzel B, **Bąkowska-Żywicka K**, Erlacher MD, Micura R, Polacek N (2007) An intact ribose moiety at A2602 of 23S rRNA is key to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis during translation termination. *Nucleic Acids Res* 35(15): 5130-40.
- 32) **Bąkowska-Żywicka K**, Twardowski T (2008) Struktura i funkcjonowanie rybosomu eukariotycznego, *Postepy Biochem* 54 (3): 251-263.
- 33) **Bąkowska-Żywicka K**, Sikora M, Twardowski T (2008) Błędy w odszyfrowywaniu informacji genetycznej - rola rybosomalnego miejsca E. *Postepy Biochem* 54 (4): 1-8.
- 34) **Bąkowska-Żywicka K**, Tyczewska A (2009) The structure of the ribosome - short history, *Biotechnologia* 1(84): 14-23.
- 35) **Bąkowska-Żywicka K**, Tyczewska A (2009) Ribophagy - the novel degradation system of the ribosome. *Biotechnologia* 1(84): 99-103.
- 36) Tyczewska A, **Bąkowska-Żywicka K** (2009) Recycling of eukaryotic ribosomes. *Biotechnologia* 1(84): 81-85.
- 37) Kietrys AM, Szopa A, **Bąkowska-Żywicka K** (2009) Structure and function of intersubunit bridges in procaryotic ribosome. *Biotechnologia* 1(84): 48-58.
- 38) **Bąkowska-Żywicka K**, Kietrys A, Twardowski T (2008) Antisense oligonucleotides targeting universally conserved 26S rRNA domains of plant ribosomes at different steps of polypeptide elongation. *Oligonucleotides* 18: 75-86.
- 39) Mleczko AM, **Bąkowska-Żywicka K** (2016) Ciemna strona rybosomu - choroby związane z powstawaniem i funkcją rybosomów, w: *Postęp medycyny w leczeniu i ochronie zdrowia*, Tom II, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o. o., Lublin, Polska, Red: B. Drop, P. Kiciński, s. 186-205
- 40) 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(3): 161-167.
- 41) Machtel P, **Bąkowska-Żywicka K**, Żywicki M (2016) Emerging applications of riboswitches - from antibacterial targets to molecular tools. *J Appl Genet* 57(4): 531-541.
- 42) Machtel P, **Bąkowska-Żywicka K**, Żywicki M (2016) Ryboprzełączniki w medycynie, w: *Postęp medycyny w leczeniu i ochronie zdrowia*, Tom II, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o. o., Lublin, Polska, Red: B. Drop, P. Kiciński, s. 206-219

14.11.2016 Kamille Bąkowska-Żywicka