

Recenzja

pracy habilitacyjnej Pani dr Magdaleny Masłoń wykonana na zlecenie rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Uchwała nr 4/10/22 z dnia 21. 10.2022.

Praca habilitacyjna Pani dr Magdaleny Masłoń zatrudnionej jako kierownik grupy badawczej w Zakładzie Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu została wykonana przez dr Magdalenę Masłoń w celu uzyskania stopnia doktora habilitowanego nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych. Praca habilitacyjna zatytułowana „Rola ko-transkrypcyjnego i post-transkrypcyjnego metabolizmu RNA w regulacji ekspresji genów i w rozwoju embrionalnym” stanowi cykl trzech prac doświadczalnych:

1. **Publikacja 1: Maslon *i* wsp. eLife 2014;3: e02028;**
2. **Publikacja 2: Haward, Maslon, *i* wsp. eLife 2021;10: e65104;**
3. **Publikacja 3: Maslon *i* wsp. The EMBO Journal 2019 38: e101244. |**

w których Pani dr Magdalena Masłoń jest pierwszą autorką (w pracy 1, M. Masłoń jest pierwszą współautorką wraz z Sarą Heras, w pracy 2 z Fioną Howard swoją doktorantką oraz z Patricią Yeyati), co w dyscyplinie biologii świadczy o indywidualnym i znaczącym wkładzie w powstanie tych prac.

Przed opublikowaniem przez dr Magdalenę Masłoń cyklu trzech prac złożonych jako praca habilitacyjna nasze wiadomości na temat procesu alternatywnego składania pre-mRNA (ang. splicing) były rozbudowane (m. in. Nagroda Nobla w 1993 dla Phillipa Sharp'a). Wiadomo było między innymi, że ten wieloetapowy proces jest regulowany na etapie wiązania specyficznych białek SR (bogatych w Serynę i Argininę, do rodziny tej m.in. należy białko SRSF1) do specyficznych sekwencji RNA, metylacji DNA, struktury i modyfikacji chromatyny a także od szybkości transkrypcji rejonów DNA, na podstawie których syntetyzowane jest pre-mRNA. Transkrypcja ta jest katalizowana przez polimerazę RNA typu II (RNAPII). Białko SRSF1 (inne nazwy tego białka to: ASF, SF2, SF2P33, SFRS) jest wielofunkcyjnym białkiem wiążącym RNA, zaangażowanym w konstytutywnym i alternatywnym składaniu pre-mRNA do mRNA w jądrze

Prof. Maciej Żylicz

Prezes

komórkowym oraz aktywacji translacji mRNA w cytoplazmie. Jak te dwa procesy, czyli składanie pre-mRNA i translacja mRNA, które zachodzą w różnych przedziałach komórkowych są regulowane przez to samo białko, SRSF1, nie było wyjaśnione na poziomie molekularnym. Wiadomo było jedynie, że SRSF1 przemieszcza się w sposób ciągły z jądra do cytoplazmy. To sugeruje, że SRSF1 może pełnić istotną funkcję nie tylko w procesie składania pre-mRNA, lecz również w eksporcie mRNA do cytoplazmy, w translacji tego mRNA lub procesach kontroli jakości i stabilności RNA w cytoplazmie. Zanim dr Magdalena Mastoń dołączyła do laboratorium prof. Javier F Cáceres (MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh), grupa ta wykazała, że ufosforylowane białko SRSF1 wiąże się z poliribosomami i może stymulować translację lucyferazy posiadającej sekwencje wiązania białka SRSF1. To znaczące odkrycie stymulowało badania naukowe prowadzone przez dr Magdalenę Mastoń.

Publikacja 1

Pani dr Magdalena Mastoń postanowiła zidentyfikować mRNA, których translacja wzrasta po nadprodukcji SRSF1. Stosując wysokoprzepustową metodę selekcji zidentyfikowano 1500 mRNA, które są translacyjnie regulowane przez SRSF1. Stymulacja translacji może zachodzić pośrednio lub bezpośrednio przy udziale białka SRSF1, dlatego grupę 1500 mRNA ograniczono do 505 mRNA, które mają miejsce wiązania białka SRSF1. Te mRNA, bezpośrednio oddziałujące z SRSF1, kodują białka zaangażowane między innymi w: regulację cyklu komórkowego, regulację transkrypcji, organizację chromosomów, procesowanie RNA, ubikwitylację białek, remodelowanie chromatyny, składanie mRNA oraz w segregację chromosomów w czasie mitozy. Zaburzenie działalności tych kluczowych dla komórki procesów może skutkować transformacją nowotworową. Od lat wiadomo było na przykład, że w wyniku alternatywnego składania pre-mRNA i następnie translacji tak powstałych mRNA syntetyzowane są różne izoformy białek, z których niektóre mogą mieć onkogenną aktywność a inne aktywność hamującą transformację nowotworową. W tym kontekście ciekawym odkryciem dr Magdaleny Mastoń była obserwacja, że nadprodukcja SRSF1 powoduje nie tylko wzmożone składanie pre-mRNA ale także wzmożoną syntezę (w polisomach) izoform białkowych w ten sposób zaprogramowanych. Te wyniki sugerują, że jądrowe i cytoplazmatyczne funkcje SRSF1 są sprzężone.

Opublikowanie przez dr Magdalenę Mastoń pracy w 2014 roku (Publikacja 1) stymulowało wielu uczonych do proponowania nowych kierunków badań z zakresu udziału

Prof. Maciej Żylicz

Prezes

SRSF1 w transformacji nowotworowej, w tym stanowiło podstawę naszych prac z zakresu składania mRNA VEGFA w komórkach raka piersi. W naszym zespole (we współpracy z włoskim zespołem kierowanym przez Giulie Fontemaggi) wykazaliśmy, że dzięki długiemu niekodującemu RNA (lncRNA), MALAT1, białko SRSF1 oddziałuje ze zmienionym onkogenym białkiem p53 (mutacja w genie *TP53*) i białkiem ID4 w komórkach raka piersi. Ten kompleks białek z RNA lokalizuje się na chromatynie, gdzie hamuje tworzenie się w czasie alternatywnego składania mRNA VEGFA antyangiogennej izoformy VEGFA_{xxx}b. W rezultacie następuje stymulacja angiogenezy i rozwój raka piersi (Prusko *i wsp.* EMBO Rep. 2017). Praca ta opisuje jeden z mechanizmów molekularnych rozwoju nowotworu raka piersi zachodzący przy udziale SRSF1.

Doświadczenia dr Magdaleny Mastoń zawarte w Publikacji 1 wskazują na to, że nadprodukcja SRSF1 powoduje wzrost translacji mRNA zaangażowanych w mitozę. Wyselekcjonowane mRNA wiążące SRSF1, których produkty białkowe ulegają wzmożonej translacji przy nadprodukcji SRSF1 są zaangażowane w tworzenie wrzeciona mitotycznego i kinetochoru. W kontrolnych doświadczeniach dr Magdalena Mastoń wykazała, że wyciszenie ekspresji genu *SRSF1* powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w metafazie co wskazuje, że SRSF1 jest niezbędny do prawidłowego przejścia do mitozy. W komórkach HeLa z wyciszoną ekspresją *SRSF1* dr Magdalena Mastoń zaobserwowała liczne defekty wrzeciona, takie jak wielobiegunowość, nieprawidłowe ustawienie chromosomów. Aby zbadać, która z funkcji SRSF1, cytoplazmatyczna czy jądrowa, przyczyniła się do zaobserwowanego fenotypu wykonała szereg doświadczeń, w których użyła plazmidów kodujących białko SRSF1 (niezmienione) lub białko chimeryczne, gdzie do *SRSF1* przyłączono sygnał retencji jądrowej (NRS), tym samym białko to nie mogło ulegać translacji w cytoplazmie. Okazało się, że tylko przywrócenie ekspresji niezmienionego *SRSF1*, ale nie *SRSF1^{NRS}* (który nie może ulec translacji), prowadzi do przywrócenia dwubiegunowego wrzeciona w komórkach ludzkich z wyciszonym endogennym *SRSF1*. Wynik ten wskazuje na to, że normalny poziom białka SRSF1 jest wymagany do utrzymania dwubiegunowego wrzeciona warunkującego normalną mitozę i to funkcja translacyjna SRSF1 jest niezbędna dla tej aktywności. Jest to, wg moich informacji, pierwsze doniesienie naukowe wskazujące na udział SRSF1 w mitozie.

Publikacja 2

Opisanie w modelu komórkowym, że białko SRSF1 wspomaga translację mRNA powinno być zweryfikowane w układzie *in vivo*. W tym celu dr Magdalena Mastoń wraz ze swoją doktorantką Fioną Haward, stosując technologię edytowania genów CRISPR/Cas9,

Prof. Maciej Żylicz
Prezes

skonstruowały myszy transgeniczne *Srsf1^{NRS/NRS}*, w których białko SRSF1 dzięki sekwencji NRS nie mogło być transportowane z jądra do cytoplazmy. Ten fenotyp *Srsf1^{NRS/NRS}* (nokauty *Srsf1^{-/-}* były letalne) wskazuje na to, że cytoplazmatyczne funkcje *Srsf1* nie są niezbędne do rozwoju embrionalnego. Jednakże po około 14 dniach po urodzeniu myszy *Srsf1^{NRS/NRS}* zaczynały zachowywać się nieprawidłowo. Zaobserwowano znaczne ograniczenie wzrostu, połowa zwierząt *Srsf1^{NRS/NRS}* rozwinęła wodogłowie spowodowane nieregularnym ruchem rzęsek wyściełających komory mózgu. Zaobserwowano w przypadku komórek myszy *Srsf1^{NRS/NRS}*, że chociaż brak cytoplazmatycznego *Srsf1* nie wpływa na samą produkcję rzęsek, znaczna ich część pozostaje nieruchoma lub nieprawidłowo się porusza. Podobnie, plemniki pobrane z jąder samców myszy *Srsf1^{NRS/NRS}* były nieruchome albo wykazywały nieprawidłowy ruch. Na podstawie tych obserwacji stwierdzono, że u myszy obecność *Srsf1* w cytoplazmie jest niezbędna do prawidłowej funkcji ruchliwych rzęsek.

W kontrolnych doświadczeniach dr Magdalena Mastoń wraz ze swoją doktorantką wykazała, że zatrzymanie *Srsf1* w jądrze komórkowym (*Srsf1^{NRS/NRS}*) nie wpływa na składanie pre-mRNA i powoduje stosunkowo niewielkie zmiany w eksporcie mRNA.

Dalsze badania na liniach komórkowych pobranych z myszy (linie pierwotne) wykazały, że utrata *Srsf1* w cytoplazmie wpływa na zahamowanie translacji wybranych mRNA oraz, że te zmiany translacyjne są bezpośrednią odpowiedzią na utratę *Srsf1* w cytoplazmie, a nie konsekwencją zmienionej transkrypcji lub eksportu mRNA. Co ciekawe, wyniki uzyskane przez dr Magdalenę Mastoń sugerują, że translacja zależna od *Srsf1* staje się ważniejsza w miarę różnicowania się komórek. Zatem *Srsf1* nie jest konstytutywnym elementem maszynarii translacyjnej, ale raczej stymuluje translację podczas różnicowania lub kiedy zmieniają się wymagania metaboliczne komórek. Dalsze badania na rzęskach w myszach *Srsf1^{NRS/NRS}* wykazały, że produkcja białek związanych z ruchliwością rzęsek (np. DNAAF i DNAH, Tektyny i N-DRC), była znacząco obniżona w stosunku do komórek typu dzikiego. Podsumowując, wyniki uzyskane przez dr Magdalenę Mastoń oraz jej doktorantkę, wskazują, że dysfunkcja rzęsek w opisanym modelu transgenicznym *Srsf1^{NRS/NRS}* jest spowodowana zaburzoną aktywnością cytoplazmatyczną *Srsf1* i wskazują na rolę cytoplazmatycznego *Srsf1* w regulacji procesów odpowiedzialnych za powstanie ruchomych rzęsek.

Publikacja 3

Transkrypcja genów kodujących białka jest katalizowana przez RNA Polimerazę II (RNAPII). Proces ten jest regulowany na poziomach: inicjacji, elongacji i zakończenia

Prof. Maciej Żylicz
Prezes

transkrypcji DNA. Szybkość elongacji transkrypcji rejonów DNA, odgrywa ważną rolę w kontroli alternatywnego składania pre-mRNA, jednakże konsekwencje *in vivo* zmienionej szybkości działania polimerazy RNA w tym procesie przed ukazaniem się publikacji 3 nie były nieznane. Zmiany w kinetyce transkrypcji DNA mogą na przykład spowodować, że w czasie syntezy pre-mRNA inne białka regulatorowe wiążące RNA (np. SRSF1) będą miały zwiększony lub zmniejszony dostęp do cząsteczki syntetyzowanego RNA, co może w konsekwencji doprowadzić do tego, że powstałe mRNA będzie zawierało inne eksony. To oznacza, że kinetyka transkrypcji DNA może modyfikować skład transkryptomu.

Aby sfalsyfikować tę hipotezę dr Magdalena Mastroń, stosując technologię CRISPR/Cas9, wprowadzała mutację Polr2a R749H w genie kodującym podjednostkę polimerazy II. Mutacja ta powoduje znaczące zmniejszenie szybkości procesu transkrypcji DNA. Niestety, nawet w przypadku heterozygotyczności, mutacja Polr2a R749H powoduje wady rozwojowe zarodków myszy. Kontrolne doświadczenia wskazały, że mutacja Polr2a R749H powoduje śmiertelność myszy na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. Dlatego dalszą pracą dr Magdalena Mastroń kontynuowała izolując embrionalne komórki macierzyste wczesnych embrionów myszy (ESC), które dzięki wprowadzeniu mutacji Polr2a R749H obniżają szybkość elongacji syntezy pre-mRNA dokonywanej przez zmienioną polimerazę II. Komórki macierzyste ESC z „wolną” Polr2a były w stanie dać początek wszystkim trzem listkom zarodkowym. Koncentrując się na różnicowaniu komórek macierzystych ESC do neuronów, dr Mastroń zaobserwowała, że powolna transkrypcja rejonów DNA, które mają ulegać składaniu upośledza rozwój linii neuronalnej z ESC, czemu towarzyszą zmiany w alternatywnym składaniu pre-mRNA i w poziomie końcowej ekspresji złożonych już genów. Co ciekawe, geny których ekspresja jest zmniejszona w neuronach *Polr2^{slow/slow}* są znacznie dłuższe niż te, których ekspresja nie uległa zmianie lub się zwiększyła. Niższa prędkość transkrypcji DNA wpłynęła na obniżenie ekspresji prawie wszystkich długich genów w neuronach, przy czym odsetek genów wyciszanych w neuronach *Polr2^{slow/slow}* stopniowo wzrastał od około 40% dla genów o długości do 10 kb do ponad 80% dla genów wyjątkowo długich. Niewątpliwie zaskakującym odkryciem dr Magdaleny Mastroń jest wykazanie, że szybkość transkrypcji rejonów DNA, które mają być składane w etapie pre-mRNA, jest szczególnie ważna w przypadku transkrypcji i składaniu wyjątkowo długich genów neuronalnych zaangażowanych w sygnalizację synaps. Co ciekawe, wpływ sprzężenia kinetycznego szybkości syntezy pre-mRNA dokonywanej przez polimerazę II i samego alternatywnego składania mRNA jest większy w neuronach zróżnicowanych z ESC niż w komórkach pluripotencjalnych. Przedstawione przez dr Mastroń wyniki wskazują, że aby zapewnić właściwą ekspresję genów i regulować proces alternatywnego składania pre-mRNA podczas rozwoju embrionalnego myszy wymagana jest odpowiednia szybkość elongacji transkrypcji DNA. Uzyskane przez dr Magdaleny Mastroń wyniki mogą mieć także znaczenie przy

Prof. Maciej Żylicz
Prezes

interpretacji wyników innych zespołów naukowych pracujących nad chorobami neurodegeneracyjnymi u ludzi, gdzie rozregulowanie ekspresji długich genów w neuronach leży u podstaw szeregu schorzeń neurodegeneracyjnych i psychiatrycznych.

W podsumowaniu, przedstawione w pracy habilitacyjnej wyniki doświadczalne stanowią spektakularne osiągnięcia naukowe, które wnoszą znaczący wkład do rozwoju biologii, w szczególności neurobiologii. Na uwagę zasługuje także fakt, że aby dr Magdalena Mastoń mogła osiągnąć cel poznawczy swojej pracy habilitacyjnej: „*wyjaśnienie znaczenia ko-transkrypcyjnego i post-translacyjnego metabolizmu RNA w fizjologii i rozwoju ssaków*” musiała pracować na kilku modelach badawczych: modelu molekularnym, modelu komórkowym i badaniach *in vivo* w modelu mysim. Ponadto dr Magdalena Mastoń zastosowała nowoczesne metody analizy metabolizmu RNA w tym *in vivo* analizy transkrypcji DNA i translacji mRNA. Sukces osiągnęła także dzięki zastosowaniu analizy wyników z zastosowaniem nowoczesnego podejścia bioinformatycznego. Takie wielopłaszczyznowe podejście jest niezwykle rzadkie. Na uwagę zasługuje także niezwykła ostrożność habilitantki w interpretacji uzyskanych wyników i niezliczone kontrole, które wykonała aby falsyfikować swoje hipotezy badawcze. Cieszy mnie także umiar dr Mastoń w publikowaniu wyników. Publikuje tylko wtedy gdy uzyskane wyniki stanowią pewną całość. Wyniki tych trzech prac doświadczalnych, które przedstawiła jako swoją pracę habilitacyjną, w polskich warunkach w pogoni za tak zwanymi punktami ministerialnymi pewnie opublikowane byłyby w przeszło dziesięciu cząstkowych pracach.

Według recenzenta przedstawiona do recenzji praca habilitacyjna dr Magdaleny Mastoń spełnia w nadmiarze wymogi stawiane w ustawie *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 r (wraz z późniejszymi nowelizacjami)*. W szczególności zgodnie z paragrafem 219 tej ustawy dr Magdalena Mastoń:

1. posiada stopień doktora nauk przyrodniczych nadany w 2012 r. przez Uniwersytet w Edynburgu. Praca doktorska zatytułowana: “Regulation and function of AGR2 and p53 pathways” została wykonana w laboratorium prof. Teda Huppa w Edinburgh Cancer Research Centre, College of Medicine and Veterinary Medicine;
2. posiada osiągnięcia naukowe opublikowane w cyklu prac powiązanych tematycznie w prestiżowych czasopismach międzynarodowych. Osiągnięcia te stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny biologii (ocena osiągnięć i ich znaczenie powyżej). Pozostały dorobek naukowy uzyskany po doktoracie przez dr Magdalenę Mastoń jest także imponujący;
3. jest pierwszym autorem publikacji przedstawionych jako praca habilitacyjna. W przypadku dyscypliny biologii świadczy to o indywidualnym i znaczącym

Prof. Maciej Żylicz
Prezes

wkładzie dr Masłoń w powstanie tych osiągnięć naukowych. Załączone przez dr Magdalenę Masłoń oświadczenia współautorów publikacji świadczą o jej znaczącym udziale w powstawaniu tych prac. Współpraca ze swoją doktorantką nad wynikami zawartymi w pracy 2 świadczy o dojrzałości naukowej dr Masłoń jako samodzielnego nauczyciela akademickiego;

4. wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni w tym uczelni zagranicznych:
 - pracę magisterską ze specjalności biotechnologii medycznej dr Masłoń wykonała w Uniwersytecie Jagiellońskim;
 - doktorat z zakresu nauk przyrodniczych został wykonany przez dr Masłoń w Uniwersytecie w Edynburgu;
 - studia magisterskie z zakresu bioinformatyki zostały wykonane przez dr Masłoń w Uniwersytecie w Glasgow;
 - staż podoktorski, w czasie którego powstały wyniki przedstawione jako praca habilitacyjna dr Magdalena Masłoń odbyła w zespole prof. Javier F Cáceres (MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh).

Konkluzja

Moja ocena osiągnięć naukowych dr Magdaleny Masłoń jest pozytywna.



/prof. dr hab. Maciej Żylicz/

Warszawa, 15 grudnia 2022 r.