

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Magdalena Masłoń

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

11/2021, **Magister bioinformatyki, z wyróżnieniem**

College of Medical, Veterinary & Life Sciences, **University of Glasgow**, Wielka Brytania

07/2012, **Doktor nauk przyrodniczych**

Edinburgh Cancer Research Centre, College of Medicine and Veterinary Medicine, **University of Edinburgh**, Wielka Brytania

Praca doktorska pt. “**Regulation and function of AGR2 and p53 pathways**”

06/2007, **Magister biotechnologii**, specjalizacja: biotechnologia medyczna

Uniwersytet Jagielloński, Kraków

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.10.2021 – obecnie

adiunkt, kierownik grupy badawczej w Zakładzie Ekspresji Genów,

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

01.02.2012 – 31.08.2021

postdoc, MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Cancer (IGC), University of Edinburgh, Wielka Brytania

01.09.2007 – 1.10. 2011,

doktorant, Edinburgh Cancer Research Centre, College of Medicine and Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Rola ko-transkrypcyjnego i post-transkrypcyjnego metabolizmu RNA w regulacji ekspresji genów i w rozwoju embrionalnym.

b) Prace włączone do wniosku habilitacyjnego

wspólny pierwszy autor

1. **Maslon MM**#, Heras SR#, Bellora N, Eyraş E, Cáceres JF. *The translational landscape of the splicing factor SRSF1 and its role in mitosis. Elife. 2014 May 6;3:e02028. doi: 10.7554/eLife.02028. Online ahead of print. PMID: 24842991*

IF₂₀₂₁= 8.14, punkty MNiSzW: 200

2. Haward F#, **Maslon MM**#, Yeyati PL#, Bellora N, Hansen JN, Aitken S, Lawson J, von Kriegsheim A, Wachten D, Mill P, Adams IR, Cáceres JF. *Nucleo-cytoplasmic shuttling of splicing factor SRSF1 is required for development and cilia function. Elife. 2021 Aug 2;10:e65104. doi: 10.7554/eLife.65104. PMID: 34338635*

IF₂₀₂₁= 8.14, punkty MNiSzW: 200

3. **Maslon MM**, Braunschweig U, Aitken S, Mann AR, Kilanowski F, Hunter CJ, Blencowe BJ, Kornblihtt AR, Adams IR, Cáceres JF. *A slow transcription rate causes embryonic lethality and perturbs kinetic coupling of neuronal genes. EMBO J. 2019 May 2;38(9):e101244. doi: 10.15252/embj.2018101244. Epub 2019 Apr 15. PMID: 30988016 <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.2018101244>*

IF₂₀₂₁= 11.6, punkty MNiSzW: 200

Wyniki wyżej wymienionych publikacji zostały zaprezentowane na wielu konferencjach naukowych, m.in.:

Wydział Biologii UAM (KNOW), 2019 – wykład na zaproszenie

Wiosenne Sympozjum ICCVS, Sopot, 2019 – wykład na zaproszenie

Kongres RNA society, Praga 2017 - plakat

IV spotkanie Post-Eurasnet, Poznań, 2016 - wykład

Kongres RNA society, Kioto 2016 – wykład na sesji plenarnej

Spotkanie RNA UK, Windermere 2014 - wykład

Spotkanie RNA, Davos 2013 – wykład na sesji plenarnej

c) Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników, które doprowadziły do powstania ww. publikacji.

Wstęp

Genom człowieka koduje około 30 000 genów upakowanych w zwartą strukturę chromatyny. Różne klasy genów są transkrybowane przez odrębne polimerazy RNA (Roeder and Rutter, 1969), które oprócz kilku wspólnych podjednostek (Vannini and Cramer, 2012), wykazują różnice strukturalne nadające im specyficzność (Cramer *et al.*, 2008; Werner, Thuriaux and Soutourina, 2009; Sekine, Tagami and Yokoyama, 2012; Vannini and Cramer, 2012).

Geny kodujące białka są transkrybowane przez polimerazę RNA II (RNAPII). Transkrypcja RNAPII odbywa się w cyklu rekrutacji, inicjacji, elongacji i terminacji. Powstały w wyniku transkrypcji pierwotny transkrypt (pre-mRNA), podlega obróbce posttranskrypcyjnej poprzez i) dołączenie czapeczki guanylowej na końcu 5' mRNA; ii) splicing, czyli usuwaniu intronów i łączeniu egzonów; iii) dołączenie ogonka poli-A na końcu 3' mRNA i iv) edycję RNA. Splicing alternatywny (AS), w którym łączone są różne egzony z pre-mRNA na różne sposoby, czasem z pominięciem niektórych egzonów lub z zachowaniem jakiegoś intronu, jest niezbędnym etapem kaskady ekspresji genów. AS generuje ogromną liczbę izoform mRNA i wpływa na różnorodność proteomu u eukariontów (Baralle and Giudice, 2017; Ule and Blencowe, 2019). Dojrzałe mRNA są eksportowane do cytoplazmy, gdzie ulegają translacji i ostatecznie degradacji.

Różne etapy dojrzewania pre-mRNA są sprzężone i zachodzą kotranskrypcyjnie. Proces ten jest koordynowany przez C-kończącą domenę (CTD) największej podjednostki RNAPII (Saldi *et al.*, 2016). Kotranskrypcyjny charakter obróbki pre-mRNA stał się podstawą modelu kinetycznego postulującego, że prędkość RNAPII może pełnić istotną rolę w regulacji różnych etapów dojrzewania mRNA, w tym alternatywnego splicingu (Naftelberg *et al.*, 2015; Maslon *et al.*, 2019).

Wszystkie etapy metabolizmu mRNA są regulowane przez białka wiążące RNA (RBP). Koordynują one cały cykl życia mRNA, od obróbki pre-mRNA po eksport, translację i degradację (Müller-Mcnicoll and Neugebauer, 2013). Wiązanie się RBP z ich docelowymi RNA jest procesem bardzo dynamicznym i umożliwia komórkom reagowanie na zmieniające się czynniki środowiska, takie jak stres (Backlund *et al.*, 2020; Bresson *et al.*, 2020), rozwój (Despic *et al.*, 2017), lub zmieniona ekspresja genów (Gilbertson *et al.*, 2018).

Cele badawcze

Kiedy dołączyłam do grupy Javiera Caceres, większość opublikowanych przez nią prac dotyczyła regulacji alternatywnego splicingu. Działania badawcze laboratorium skupiały się na opisanu funkcji i mechanizmu działania białek z rodziny SR w alternatywnym splicingu, przy użyciu różnych genów reporterowych. W tym czasie, metody wykorzystujące wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA do analizy ekspresji genów stały się ogólnodostępne, co umożliwiło zbadanie roli białek SR w różnych etapach metabolizmu RNA cało-genomowo.

Na mój dorobek naukowy, stanowiący osiągnięcie naukowe będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, składają się trzy prace eksperymentalne, które opublikowałam podczas stażu podoktorskiego w laboratorium Javiera Caceresa na Uniwersytecie w Edynburgu. **Celem mojej pracy było wyjaśnienie znaczenia ko-transkrypcyjnego i post-transkrypcyjnego metabolizmu RNA w fizjologii i rozwoju ssaków.**

Pytania, na które chciałam odpowiedzieć były następujące:

- jak ważny jest transport SRSF1 pomiędzy jądrem a cytoplazmą? Czy białko to jest tylko biernie przenoszone do cytoplazmy wraz ze związanymi do niego RNA, czy też może jego obecność w różnych przedziałach komórkowych wiąże się z odrębnymi funkcjami w metabolizmie RNA?

- jak ważna jest szybkość polimeryzacji przez RNAPII dla regulacji metabolizmu RNA i jakie są konsekwencje zaburzenia tej regulacji dla rozwoju organizmu?

Aby rozwiązać te problemy, opracowałam kilka modeli komórkowych i mysich oraz zastosowałam najnowocześniejsze metody analizy różnych aspektów metabolizmu RNA, w tym analizy natywnej transkrypcji i translacji.

Wyniki

I. Funkcja translacyjna SRSF1 jest wymagana do tworzenia dwubiegunowego wrzeciona podziałowego (**Publikacja 1**).

SRSF1 przemieszcza się w sposób ciągły z jądra do cytoplazmy (Cáceres, Sreaton and Krainer, 1998; Cowper *et al.*, 2001; Sapra *et al.*, 2009). To wskazuje na to, że SRSF1 może pełnić istotną funkcję nie tylko w procesie splicingu, lecz również w eksporcie mRNA do cytoplazmy, w translacji mRNA lub procesie kontroli jakości i stabilności RNA w cytoplazmie (prace przeglądowe: (Huang and Steitz, 2005; Long and Cáceres, 2009; Twyffels, Gueydan and Krays, 2011)). Zanim dołączyłam do laboratorium Cáceres, grupa ta wykazała, że hipofosforylowane białko SRSF1 wiąże się z polirybosomami i może stymulować translację lucyferazy, jeśli w sekwencji kodującej genu reporterowego znajdują się miejsca wiązania SRSF1 (Sanford *et al.*, 2004, 2005). Laboratorium Cáceres wykazało również, że SRSF1 oddziałuje z białkami szlaku sygnalizacyjnego mTOR (Michlewski *et al.*, 2008), wpływając na zwiększoną fosforylację i zahamowanie aktywności białka 4E-BP, konkurencyjnego inhibitora translacji zależnej od czapeczki. Pierwszym celem moich badań, było eksperymentalne zidentyfikowanie mRNA, których translacja jest uzależniona od białka SRSF1. W tym celu najpierw przejściowo zwiększyłam ekspresję SRSF1 w komórkach 293T i potwierdziłam, że prowadzi to do zwiększonej translacji lucyferazy kodującej miejsca wiązania SRSF1. Następnie, wyizolowałam ekstrakty cytoplazmatyczne zarówno z komórek kontrolnych, jak i komórek z nadekspresją SRSF1, naniósłłam je na gradienty sacharozy i poddałam ultrawiroowaniu, aby, na podstawie gęstości, oddzielić mRNA związane polirybosomami i monosomami 80S od tych, które nie uległy jeszcze inicjacji. Następnie wyizolowałam RNA z subpolisomowych i ciężkich frakcji polisomalnych, i przeprowadziłam ich sekwencjonowanie. Początkowo chciałam zidentyfikować te mRNA, które pod wpływem zwiększonej ekspresji SRSF1 przemieszczają się z frakcji subpolisomalnych do polisomalnych. Stwierdziłam, że translacja około 1500 mRNA jest stymulowana bezpośrednio lub pośrednio przez SRSF1.

Biorąc pod uwagę różne funkcje SRSF1 w metabolizmie mRNA, zwiększona asocjacja mRNA z polisomami mogła oznaczać bezpośredni wpływ nadekspresji SRSF1 na ich translację. Alternatywnie, mógł być to skutek uboczny zwiększonej ekspresji SRSF1, prowadzący do stymulacji jego aktywności w jądrze komórkowym. W tym wypadku zwiększona ilość SRSF1 może prowadzić do zmian w ekspresji genów, na przykład poprzez regulacje splicingu, co może pośrednio skutkować zwiększoną translacją części mRNA. Aby zidentyfikować te mRNA, których translacja jest bezpośrednio regulowana przez SRSF1, w dalszej analizie wzięłam pod uwagę tylko te mRNA, które są bezpośrednio związane przez SRSF1. Te mRNA zostały

poprzednio eksperymentalnie zidentyfikowane przez (Sanford *et al.*, 2009), przy użyciu metody CLIP. Na tej podstawie ustaliłam, że około 40% mRNA, których wiązanie do poliribosomów zwiększa się w odpowiedzi na nadekspresję SRSF1, są rzeczywiście bezpośrednio związane z SRSF1. To wskazuje na to, że ich zwiększona translacja jest specyficzną odpowiedzią na zwiększoną ilość SRSF1.

Nieoczekiwanie, odkryłam, że pewna pula tych mRNA koduje białka zaangażowane w regulację cyklu komórkowego, organizację chromosomów i mitozę, co sugeruje, że translacja za pośrednictwem SRSF1 może wpływać na prawidłowy przebieg procesu podziału komórkowego. Ta obserwacja wydała mi się szczególnie interesująca w kontekście onkogennej roli SRSF1. Chociaż funkcja SRSF1 w procesie transformacji była jak dotąd wiązana z rolą tego białka w splicingu, zaobserwowano również, że zatrzymanie SRSF1 w jądrze komórkowym (a tym samym ablacja jego aktywności translacyjnej), poprzez fuzję sygnału retencji w jądrze (NRS), zmniejsza zdolności transformacyjne SRSF1 (Shimoni-Sebag *et al.*, 2013). NRS jest około 30 aminokwasowym peptydem zidentyfikowanym w ekskluzywnie jądrowym białku SRSF2, które po połączeniu z C-końcem SRSF1, powoduje jego konstytutywne zatrzymanie w jądrze, a tym samym utratę aktywności translacyjnej (Cazalla *et al.*, 2002; Sanford *et al.*, 2004). Moje wyniki sugerowały, że SRSF1, poprzez stymulację translacji białek zaangażowanych w cykl komórkowy, może przyczyniać się do podziału transformowanych komórkach.

Wspomniane mRNA kodują białka odgrywające rolę w tworzeniu wrzeciona mitotycznego i kinetochoru. Wśród nich są na przykład: a) białka centrosomalne, w tym CEP170, CEP70 i CEP57, które są uczestniczą w organizacji mikrotubul i są wymagane do utrzymania integralności wrzeciona (Shi *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013), b) NDC80 i CCDC99, które są zaangażowane w wiązanie mikrotubul i dyneiny z kinetochorem (Wei, Al-Bassam and Harrison, 2006; Barisic *et al.*, 2010), c) białka tworzące kompleks kondensynowy, w tym SMC2 i SMC4, które razem z kohezyną, restrukturyzują chromosomy i umożliwiają wierną segregację chromosomów podczas mitozy (Losada and Hirano, 2005). Biorąc pod uwagę istotną funkcję powyższych białek w tworzeniu dwubiegunowego wrzeciona i prawidłowym przyłączeniu kinetochorów do mikrotubul wrzeciona, zmiany w translacji któregośkolwiek z tych białek mogą prowadzić do defektów w segregacji chromosomów. W związku z tym, w następnym etapie moich badań, postanowiłam dokładniej scharakteryzować rolę SRSF1 w translacji tych mRNA i znaczenie tej funkcji w przebiegu mitozy.

Najpierw oszacowałam zmiany w stopniu asocjacji tychże mRNA z polisomami w odpowiedzi na zwiększoną ekspresję lub wyciszenie ekspresji SRSF1. W zgodzie z danymi uzyskanymi w RNAseq, zaobserwowałam, że manipulacja poziomem białka SRSF1, powoduje zwiększoną obecność tych mRNA we frakcjach polisomalnych w wyniku nadekspresji, oraz ich przesunięcie do frakcji subpolisomowych w wyniku wyciszenia ekspresji SRSF1. Wzrost asocjacji tych mRNA z polisomami prowadzi do zwiększenia poziomu kodowanych przez nie białek, co potwierdziłam za pomocą Western blotting i SILAC. Ta obserwacja potwierdza bezpośrednią rolę SRSF1 w translacji tych podstawowych regulatorów cyklu komórkowego i wskazuje na to, że fizjologiczne lub wywołane chorobą zmiany w ekspresji lub lokalizacji SRSF1 mogą bezpośrednio wpływać na cykl komórkowy.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, chciałam szczegółowo opisać rolę SRSF1 w cyklu komórkowym, ze szczególnym uwzględnieniem procesu mitozy. W tym celu wykorzystałam szereg protokołów umożliwiających synchronizację komórek na różnych etapach cyklu komórkowego. W pierwszej kolejności użyłam inhibitora proteasomu MG132, który, jak wykazano wcześniej, indukuje zatrzymanie podziału komórkowego na etapie metafazy (Wójcik *et al.*, 1996). Najpierw wyciszyłam ekspresję SRSF1 za pomocą siRNA, po czym potraktowałam komórki inhibitorem MG132, a następnie usunęłam go, aby obserwować, jak wygląda przebieg mitozy komórki w obecności i przy braku SRSF1. Na podstawie analizy utrwalonych komórek pod mikroskopem stwierdziłam, że komórki bez SRSF1 pozostają zatrzymane w metafazie, pomimo usunięcia MG132, co wskazuje na to, że SRSF1 jest wymagane do prawidłowego przebiegu mitozy. Następnie w celu zbadania, jak SRSF1 wpływa na czas przebiegu mitozy, wyciszyłam ekspresję SRSF1 i ko-transfekowałam komórki tubuliną znakowaną GFP i histonem H2B znakowanym mCherry, co umożliwiło mi monitorowanie tworzenia wrzeciona i segregację chromosomów w żywych komórkach. Poprzez obrazowanie przeżyciowe time-lapse zaobserwowałam, że zgodnie z danymi literaturowymi, komórki kontrolne przeszły mitozę w ciągu około 50 minut, jednak komórki bez SRSF1 pozostawały zatrzymane w metafazie przez kilka godzin i ostatecznie wiele z nich uległo apoptozie. Powtórzyłam ten eksperyment na innych typach komórek i potwierdziłam, że brak SRSF1 powoduje znaczne wydłużenie czasu spędzanego przez komórki w podziale mitotycznym.

Wyniki analizy frakcji polisomalnych wskazują na rolę SRSF1 w translacji mRNA kodujących białka zaangażowane w funkcję wrzeciona mitotycznego, sugerując, że zaobserwowane fenotypy są związane z brakiem syntezy tych białek, kiedy ekspresja SRSF1 jest wyciszona.

Jednakże biorąc pod uwagę istniejącą literaturę, nie mogłam wykluczyć, że te defekty w przebiegu cyklu komórkowego w odpowiedzi na wyciszenie SRSF1 były powiązane z tworzeniem pętli R (Gan *et al.*, 2011). Aby eksperymentalnie wykazać, że zatrzymanie metafazy w odpowiedzi na brak SRSF1 jest rzeczywiście powiązane z jego translacyjną rolą, postanowiłam skupić się na obserwacji wrzeciona podziałowego w komórkach kontrolnych i komórkach bez SRSF1. Aby zobrazować wrzeciona, użyłam przeciwciał swoistych dla tubuliny i perycentryny. W komórkach HeLa z wyciszoną ekspresją SRSF1 zaobserwowałam liczne defekty wrzeciona, takie jak wielobiegunowość, nieprawidłowe ustawienie chromosomów i problemy z kongresją chromosomów. Aby zbadać, która z funkcji SRSF1, cytoplazmatyczna czy jądrowa, przyczyniła się do zaobserwowanego fenotypu, zaprojektowałam serię eksperymentów ratunkowych, w których użyłam plazmidów kodujących białko SRSF1 typu dzikiego lub białko chimeryczne, gdzie do SRSF1 przyłączono sygnał retencji jądrowej (NRS) tym samym prowadząc do utraty aktywności translacyjnej (Cazalla *et al.*, 2002; Sanford *et al.*, 2004). Rzeczywiście, udało mi się wykazać, że tylko przywrócenie ekspresji dzikiego SRSF1, ale nie SRSF1-NRS, prowadzi do przywrócenia dwubiegunowego wrzeciona w komórkach z wyciszonym endogennym SRSF1. To wskazuje na to, że normalny poziom białka SRSF1 jest wymagany do utrzymania dwubiegunowego wrzeciona i że to funkcja translacyjna SRSF1 jest niezbędna dla tej aktywności.

II. Jądrowe i cytoplazmatyczne funkcje SRSF1 są sprzężone (**Publikacja 1**)

Używając eksperymentu CLIP przeprowadzonego na ekstraktach jądrowych i cytoplazmatycznych, grupa Caceres wykazała, że niektóre mRNA są związane z SRSF1 zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie (Sanford *et al.*, 2009). To sugeruje, że SRSF1 może koordynować jądrowe i cytoplazmatyczne etapy metabolizmu mRNA. W celu zbadania tej hipotezy, przeprowadziłam analizę alternatywnego splicingu w komórkach ze zwiększoną ekspresją SRSF1 i sprawdziłam, czy izoformy powstające w odpowiedzi na nadekspresję SRSF1, podlegają również kontroli na poziomie translacyjnym. Co ciekawe, wykazałam, że izoformy generowane w wyniku zwiększonej ekspresji SRSF1, mają wyższy indeks PSR (indeks asocjacji z polisomami). Jest to ważna obserwacja, gdyż wskazuje na to, że SRSF1 może wpływać na różnorodność białkową, poprzez regulację alternatywnego splicingu, a następnie stymulowanie translacji powstałych izoform mRNA.

III. Cytoplazmatyczne funkcje SRSF1 są niezbędne do prawidłowego rozwoju myszy (Publikacja 2)

Po opisanu znaczenia aktywności cytoplazmatycznej SRSF1 *in vitro*, chciałam zbadać, czy SRSF1 jest zaangażowane w translację *in vivo*. Ta część projektu doprowadziła do szeregu odkryć opisanych poniżej i w Publikacji 2. Eksperymenty prowadzące do tej pracy, rozpoczęłam wspólnie z moją doktorantką, Fioną Haward. W tym czasie opublikowano właśnie metodologię CRISPR/Cas9, oferującą możliwość łatwego i mniej czasochłonnego tworzenia modeli mysich. Wspólnie z Fioną zaprojektowałyśmy szereg strategii, które miały doprowadzić do fuzji peptydu NRS do endogennego SRSF1. Ostatecznie dołączyłyśmy sekwencję NRS, krótki łącznik glicynowy i epitop T7 do końca C sekwencji kodującej *Srsf1*, gdyż w tej formie nie obserwowaliśmy zmian w ekspresji chimerycznego białka. Myszy *Srsf1^{NRS/NRS}* powstałe z krzyżówek *Srsf1^{+/NRS}* przeżyły po urodzeniu, co kontrastowało z wczesną śmiertelnością embrionalną myszy z nokautem *Srsf1^{-/-}* (Xu *et al.*, 2005). To wskazuje na to, że cytoplazmatyczne funkcje SRSF1 nie są niezbędne do rozwoju embrionalnego. Nieoczekiwanie, około 14 dni po urodzeniu myszy *Srsf1^{NRS/NRS}*, odkryliśmy u nich różne nieprawidłowości fenotypowe. Po pierwsze, zaobserwowaliśmy znaczne ograniczenie wzrostu u myszy *Srsf1^{NRS/NRS}*. Były one około 30% lżejsze niż myszy typu dzikiego i różnica ta utrzymywała się w różnych grupach wiekowych. Co ważne, ograniczenie wzrostu pojawiło się po urodzeniu, a nie w trakcie rozwoju embrionalnego, ponieważ masa zarodków i łożyska była porównywalna z odpowiednikami typu dzikiego. Oprócz ograniczenia wzrostu, połowa zwierząt *Srsf1^{NRS/NRS}* rozwinęła wodogłowie do P14. Wodogłowie jest spowodowane nagromadzeniem płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF), które powoduje rozszerzenie komór mózgu i zwiększony nacisk na otaczającą tkankę mózgową. Wizualnie charakteryzuje się to czaszką w kształcie kopuły i może być spowodowane niedrożnością wodociągów mózgu lub nieprawidłowym biciem rzęsek wyściełających komory mózgu, co uniemożliwia przepływ płynu mózgowo-rdzeniowego (Ibañez-Tallon *et al.*, 2004). Tą pierwszą możliwość wykluczyliśmy poprzez analizę wycinków mózgu myszy dzikich i *Srsf1^{NRS/NRS}*, gdzie zaobserwowaliśmy, że akwedukty u myszy *Srsf1^{NRS/NRS}* były funkcjonalne i porównywalne do tych u myszy dzikich. Biorąc pod uwagę ten wynik, nawiązałam współpracę z Patricią Yeyati, pracującą w tym samym instytucie i posiadającą rozległe doświadczenie w charakteryzowaniu fenotypów rzęsek. Chciałyśmy ustalić, czy w odpowiednich tkankach tworzą się ruchliwe rzęski, czy ich struktura jest zaburzona i czy możemy zaobserwować jakiegokolwiek zmiany molekularne, które mogłyby wyjaśnić zmienioną funkcję rzęsek. Najpierw zbadaliśmy, czy

komórki wyściółki i splot naczyniówkowy w mózgu posiadają liczne mikrokosmki i czy ich rzęski są ruchliwe. Stwierdziłyśmy, że na powierzchni tych komórek znajdują się liczne rzęski, były one ruchliwe, ale ich ruch był nieregularny. Następnie zaobserwowałyśmy za pomocą mikroskopii elektronowej, że struktura rzęsek była zaburzona u myszy *Srsf1^{NRS/NRS}*. Zaobserwowane defekty w strukturze rzęsek, jak również nieprawidłowy ruch rzęsek w komórkach wyściółki, mogą leżeć u podstaw obserwowanych fenotypów. Aby zrozumieć zmiany molekularne u zwierząt *Srsf1^{NRS/NRS}*, które prowadzą do tak specyficznych nieprawidłowości w funkcji i budowie rzęsek, zdecydowałyśmy wybrać kilka tkanek, które charakteryzują się ruchliwymi rzęskami i które umożliwiają izolacje RNA bądź białka w ilości/jakości odpowiedniej do różnych techniki biologii molekularnej. Jedną z takich tkanek są komórki nabłonka tchawicy (mTEC), które można wyizolować od myszy i następnie różnicować *in vitro*. Stanowią one doskonały model do śledzenia stopniowego tworzenia się i dojrzewania ruchliwych rzęsek. Najpierw, w celu zbadania wytwarzania komórek wielorzęskowych i ruchu rzęsek w hodowlach komórek mTEC zastosowałyśmy mikroskop wideo o wysokiej częstotliwości. Zaobserwowałyśmy, że chociaż brak cytoplazmatycznego SRSF1 nie wpływa na sama produkcję rzęsek, znaczna ich część pozostaje nieruchoma lub nieprawidłowo się porusza w komórkach *Srsf1^{NRS/NRS}*. Podobnie, plemniki pobrane z jąder myszy *Srsf1^{NRS/NRS}* były nieruchome albo wykazywały nieprawidłowy ruch. Na podstawie tych obserwacji, stwierdziliśmy, że obecność SRSF1 w cytoplazmie jest niezbędna do prawidłowej funkcji ruchliwych rzęsek.

IV. Regulacja translacji przez SRSF1 umożliwia realizację programów ekspresji genów wymaganych do funkcji ruchliwych rzęsek (**Publikacja 2**)

Na tym etapie badań, wciąż nie znaleźliśmy molekularnego podłoża wad rozwojowych zaobserwowanych u myszy *Srsf1^{NRS/NRS}*. Biorąc pod uwagę liczne funkcje SRSF1, fenotypy te mogły być spowodowane: zmianami funkcji jądrowych SRSF1, zmienionym eksportem mRNA, utratą funkcji translacji mRNA przez SRSF1 lub kombinacją tych trzech. Biorąc pod uwagę, że SRSF1 ma zasadnicze znaczenie dla żywotności komórek i organizmów, co wynika z roli tego białka w regulacji splicingu w jądrze (Lin et al., 2005; Xu et al., 2005), żywotność myszy knock-in wskazywała na zachowane i prawidłowe funkcje jądrowe *Srsf1^{NRS}*. Aby to potwierdzić, przeprowadziłam sekwencjonowanie RNA na materiale uzyskanym z mysich fibroblastów embrionalnych (MEF) pochodzących od miotów *Srsf1^{NRS/NRS}*, *Srsf1^{NRS/+}* i *Srsf1^{+/+}*, i przeprowadziłam analizę alternatywnego splicingu. Wśród około 65 000 transkryptów,

wykryłam zaledwie kilkadziesiąt zmian splicingowych, potwierdzając, że funkcje jądrowe stworzonego modelu mysiego są zachowane.

SRSF1 funkcjonuje w eksporcie mRNA do cytoplazmy (Huang and Steitz, 2005; Hargous *et al.*, 2006), stąd ograniczenie lokalizacji SRSF1 do jądra może potencjalnie zmienić pulę mRNA dostępnych do translacji w cytoplazmie. Aby to wykluczyć, przeprowadziłam sekwencjonowanie RNA wyizolowanego z frakcji cytoplazmatycznych MEF i NSC pochodzących od zwierząt *Srsf1*^{+/+} lub *Srsf1*^{NRS/NRS}. Brak SRSF1 w cytoplazmie wpłynął na ekspresję tylko około 100 mRNA, a te mRNA nie pokrywały się z poprzednio zidentyfikowanymi mRNA podlegającymi eksportowi za pośrednictwem SRSF1 (Müller-McNicoll *et al.*, 2016). Analiza RT-qPCR wybranych mRNA, nie ujawniła żadnych istotnych zmian w ich proporcji jądrowo/cytoplazmatycznej. Podsumowując, te dane potwierdzają, że zatrzymanie SRSF1 w jądrze komórkowym nie wpływa na splicing pre-mRNA i powoduje stosunkowo niewielkie zmiany w eksporcie mRNA.

W związku z tymi wynikami, postanowiłam zbadać konsekwencje braku SRSF1 w cytoplazmie na translację mRNA *in vivo*. W tym celu zmierzyłam asocjację mRNA z polisomami i frakcjami subpolysomalnymi za pomocą RNAseq. Ponieważ wcześniej wykazałam, że obecność SRSF1 w cytoplazmie nie jest wymagana do rozwoju embrionalnego, ale staje się kluczowa w późniejszych stadiach rozwojowych do poniższych eksperymentów, wybrałam kilka modeli komórkowych, reprezentujących różne etapy rozwoju. Użyłam pluripotencjalnych komórek ESC, multipotencjalnych komórek NSC, oraz MEF reprezentujących terminalnie zróżnicowane komórki. Ekstrakty cytoplazmatyczne z tych linii komórkowych zostały nałożone na gradienty sacharozowe, zwirowane, a RNA wyizolowane z frakcji subpolisomowych i polisomowych zostały poddane sekwencjonowaniu. Analiza uzyskanych danych wykazała zmiany w asocjacji mRNA z polisomami w NSC i MEF wyizolowanych z myszy *Srsf1*^{NRS/NRS}. Zaobserwowałam, zmniejszoną asocjację z frakcjami polisomowymi dla 1077 mRNA (spośród 1258) w komórkach NSC i 464 mRNA (spośród 733) w komórkach MEF w stosunku do ich asocjacji z frakcjami subpolisomowymi, co wskazuje na to, że SRSF1 jest zaangażowany w ich translację. Chciałam wykluczyć efekty pośrednie, takie jak odpowiedź transkrypcyjna na brak SRSF1 w cytoplazmie, dlatego sprawdziłam całkowity poziom i alternatywny splicing mRNA, których indeksach polisomalny jest niższy w odpowiedzi na brak cytoplazmatycznego SRSF1. Nie zaobserwowałam korelacji między tymi różnymi parametrami, co wskazuje na to, że zmiany translacyjne są bezpośrednią odpowiedzią na utratę SRSF1 w cytoplazmie, a nie konsekwencją zmienionej transkrypcji lub eksportu mRNA. Podsumowując wykazałam, że aktywność

translacyjna SRSF1, która początkowo była obserwowana tylko *in vitro* i w komórkach z nadekspresją SRSF1, wpływa również na translację mRNA w liniach komórkowych pochodzących od myszy. Co istotne, moje dane sugerują również, że translacja zależna od SRSF1 staje się ważniejsza w miarę różnicowania się komórek. Zatem SRSF1 nie jest konstytutywnym elementem maszynerii translacyjnej, ale raczej stymuluje translację w trakcie określonych przemian komórkowych, na przykład podczas różnicowania lub kiedy zmieniają się wymagania metaboliczne komórek.

Wykazałam, że aktywność SRSF1 w cytoplazmie jest wymagana do translacji komponentów wrzeciona (**Publikacja 1**, (Maslon *et al.*, 2014)). Zgodnie z tymi wcześniejszymi odkryciami, analiza ontologii tych mRNA, których translacja jest zmniejszona w komórkach *Srsf1^{NRS}*, zidentyfikowała między innymi kategorię wrzeciona, co może częściowo tłumaczyć zmniejszoną masę myszy *Srsf1^{NRS/NRS}*. Co ciekawe, część mRNA o zmniejszonej asocjacji z frakcjami polisomalnymi w komórkach NSC *Srsf1^{NRS/NRS}*, należą do kategorii funkcjonalnej związanej z ruchliwą rzęską. Jest to zgodne z fenotypami, które zaobserwowaliśmy w modelach mysich, w tym z wodogłowiem, nieruchomymi plemnikami i nieprawidłowym ruchem rzęsek w komórkach tchawicy. Wśród tych mRNA są m.in. mRNA kodujące dyneiny Dnaaf1/Lrrc50 i Dnaaf3, które są wymagane do powstania kompleksów ramion dyneinowych, jak również samych podjednostek motorycznych, w tym zarówno wewnętrznych (tj. ciężki łańcuch aksonemalny dyneiny 7 [Dnah7a]), jak i zewnętrznych ramion dyneinowych (tj. aksonemalny łańcuch pośredni dyneiny 2 [Dnai2]). Każde z tych białek tworzy funkcjonalne makromolekularne motory, które napędzają ruch rzęsek. Co ciekawe, wiele z genów kodujących te białka jest zmutowanych u pacjentów z wrodzoną dysfunkcją ruchliwych rzęsek (tzw. pierwotna dyskineza rzęsek (PCD)) (Zhang *et al.*, 2002; Loges *et al.*, 2008, 2009; Mitchison *et al.*, 2012).

Obserwacje poczynione w liniach komórkowych były obiecujące w kontekście ich powiązania z fenotypami zaobserwowanymi na poziomie organizmu, stąd następnie postanowiłam zmierzyć stopień asocjacji rzęskowych mRNA i ilości kodowanych przez nie białek w tkankach, w których zaobserwowaliśmy rzęskowe fenotypy. W tym celu wykorzystałam następujące źródła ruchliwych rzęsek – komórki nabłonka tchawicy (opisane powyżej, mTEC) oraz jądra mysie. W celu zbadania statusu translacyjnego mRNA kodujących białka zaangażowane w funkcję rzęsek, przygotowałam ekstrakty cytoplazmatyczne z jąder i poddałam je wirowaniu przez gradienty sacharozy. RNA wyizolowane z frakcji subpolisomalnych i polisomalnych poddałam analizie RT-qPCR skupiając się na mRNA kodujących różne klasy białek związanych z powstawaniem i funkcją rzęsek, takich jak

czynniki składania dyneiny (DNAAF), które wspomagają montaż i ruch podjednostek motorycznych dyneiny; składniki kompleksu regulacyjnego neksyna-dyneina (DRC), które przekształcają ruch ślizgowy mikrotubul w charakterystyczne wygięcie aksonemów; białka RSPH, które zapewniają wsparcie strukturalne i wpływają na kształt fal; a także składniki strukturalne, takie jak białka stabilizujące mikrotubule, Tektyny. Zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowałam spadek asocjacji polisomalnej większości z tych mRNA w materiale pobranym z jąder samców *Srsf1^{NRS/NRS}*. Aby potwierdzić, że zmniejszone wiązanie się tych mRNA do polisomów, przekłada się na zmniejszoną ilość odpowiednich białek, przeprowadziliśmy analizę proteomiczną jąder izolowanych w P22–23, gdyż jest to stadium charakteryzujące się zsynchronizowaną spermiogenezą i rozszerzeniem wici. Analiza ilości białek w tym materiale ujawniła zmniejszoną ilość białek DNAAF, DRC i białek pomocniczych (CFAP, RSPH i Tektin) w jądrach *Srsf1^{NRS/NRS}*. Podobną analizę przeprowadziliśmy na różnych etapach różnicowania mTEC, w trakcie którego obserwuje się jednoczesne, zsynchronizowane zwiększenie produkcji białek odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie rzęsek. Ten skoordynowany proces zwiększonej syntezy białek rzęskowych był zaburzony w hodowlach *Srsf1^{NRS/NRS}*. Produkcja białek związanych z kategorią „montaż ruchliwych rzęsek”, takich jak DNAAF i DNAH, a także Tektyny i N-DRC, była znacząco obniżona w stosunku do komórek typu dzikiego. Podsumowując, wyniki te pokazują, że dysfunkcja rzęsek w opisanym modelu transgenicznym jest spowodowana zaburzoną aktywnością cytoplazmatyczną SRSF1 i wskazują na rolę cytoplazmatycznego SRSF1 w regulacji procesów odpowiedzialnych za powstanie ruchomych rzęsek.

V. Regulacja prędkości transkrypcji jest wymagana w rozwoju embrionalnym (**Publikacja 3**)

W opisanych powyżej badaniach chciałam lepiej zrozumieć rolę białka SRSF1, skupiając się na jego funkcjach w cytoplazmie. SRSF1, inne białka z rodziny SR, oraz białka hnRNP, jak również różne czynniki pomocnicze, oddziałują z regulatorowymi sekwencjami RNA i wpływają na splicing alternatywny (AS). Proces AS zależy nie tylko od interakcji RBPs-RNA, ale także od wielu innych poziomów regulacji, które obejmują metylację DNA, strukturę i modyfikację chromatyny oraz transkrypcję RNAPII (Schwartz and Ast, 2010; Lev Maor, Yearim and Ast, 2015; Naftelberg *et al.*, 2015). Transkrypcja RNAPII jest odpowiedzialna za produkcję wszystkich pre-mRNA kodujących białka i składa się z inicjacji RNAPII, elongacji i terminacji. Każdy z tych etapów podlega regulacji (Porrua and Libri, 2015; Proudfoot, 2016; Core and Adelman, 2019; Schier and Taatjes, 2020). Szybkość RNAPII jest bardzo zmienna,

zarówno w różnych częściach tego samego genu, jak również pomiędzy genami (Larson, 2011; Danko *et al.*, 2013; Jonkers, Kwak and Lis, 2014; Baluapuri *et al.*, 2019; Gregersen, Mitter and Svejstrup, 2020) i może być regulowana poprzez rekrutację czynników pomocniczych lub w odpowiedzi na różne bodźce (Bhatt *et al.*, 2012; Danko *et al.*, 2013; Williamson *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2019; Muniz and Nicolas, 2021; Cugusi *et al.*, 2022). Ze względu na kotranskrypcyjny charakter obróbki pre-mRNA, szybkość RNAPII ma wpływ na procesy, takie jak AS i poliadenylacja (prace przeglądowe: (Herzel *et al.*, 2017; Muniz and Nicolas, 2021)), zatem zmiany w kinetyce transkrypcji mogą modyfikować skład transkryptomu. Ta obserwacja dała początek dwóm komplementarnym modelom (Bentley, 2014; Naftelberg *et al.*, 2015). Model kinetyczny zakłada, że prędkość elongacji reguluje AS, poprzez bezpośredni wpływ na ilość czasu, w którym białka zaangażowane w kontrolę splicingu mogą wiązać się z powstającym pre-mRNA. Zgodnie z tym założeniem, transkrypcja przez RNAPII o wolniejszym tempie elongacji (mutacja C4/R749H) powoduje zwiększenie (de la Mata *et al.*, 2003) lub zmniejszenie (Dujardin *et al.*, 2014) włączenia alternatywnych egzonów do mRNA. Z kolei, kiedy porównano zmiany w AS pomiędzy komórkami transfekowanymi mutantami RNAPII, które powodują wolniejszą lub szybszą elongacją okazało się, że to optymalna szybkość transkrypcji jest wymagana dla normalnego splicingu kotranskrypcyjnego pre-mRNA (model „Goldilocks”) (Fong *et al.*, 2014). W cytowanych powyżej badaniach stosowano hodowle komórkowe transfekowane plazmidami kodującymi odpowiednie mutanty RNAPII, które dodatkowo były odporne na α -amanitynę. Transfekowane komórki traktowano α -amanityną w celu wywołania degradacji endogennej polimerazy RNAPII. Stąd, znaczenie modelu kinetycznego w warunkach fizjologicznych było dotychczas w dużej mierze niezbadane. Dlatego w poniższym projekcie zadałem następujące pytania:

- w jaki sposób zmieniona szybkość transkrypcji wpływa na ekspresję genów i kontrolę AS oraz na rozwój ssaków?

- jakie są konsekwencje zmiany kinetyki transkrypcji dla AS w tkankach/organizmie?

Aby odpowiedzieć na te pytania, postanowiłam stworzyć myszy model „wolnej” polimerazy RNAPII. Mutacja powodująca zmniejszoną prędkość polimerazy RNAPII to *Polr2a*^{R749H}, która jest odpowiednikiem mutacji punktowej C4 zidentyfikowanej w największej podjednostce *Drosophila pol II*. *pol II* z mutacją C4 jest nieefektywna w transkrypcji przez naturalne bariery obecne w sekwencji DNA i powoduje defekty rozwojowe u heterozygotycznych muszek (Coulter and Greenleaf, 1985; Mortin, Kim and Huang, 1988; Chen *et al.*, 1996). Projekt ten rozpoczął się tuż przed opublikowaniem strategii CRISPR/Cas9 i wymagał wykorzystania

tradycyjnych metod tworzenia zwierząt transgenicznych. Do endogennego *locus Polr2a* w mysich ESC wprowadzono heterozygotyczną lub homozygotyczną mutację R749H. W celu weryfikacji obecności mutacji nakładające się produkty PCR, obejmujące region ~14-kb wokół mutacji R749H poddałam sekwencjonowaniu metodą Ion Torrent. Udało mi się potwierdzić, że komórki ESC *Polr2a*^{WT/slow} i *Polr2a*^{slow/slow} nie uległy żadnym rearanżacjom genomowym, ani dodatkowym mutacjom w tym regionie w stosunku do ESC *Polr2a*^{WT/WT}.

W celu wygenerowania mysiego modelu wolnej polimerazy RNAPII, komórki heterozygotyczne wstrzyknięto do blastocyst C57BL/6. Pomimo użycia ośmiu samców z co najmniej 30% chimeryzmem koloru sierści nie doszło do transmisji z linii zarodkowej. W przypadku innych zwierząt transgenicznych, stwierdzono, że 3-4 męskie chimery są zazwyczaj wystarczające do wykrycia transmisji zarodkowej (BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement, 2003). Zatem wyniki te wskazują na to, że komórki ESC z jedną kopią *Polr2* typu dzikiego nie są w stanie przyczynić się do spermatogenezy.

W okresie, kiedy dokonaliśmy tych obserwacji opublikowano metodę CRISPR/Cas9, co po raz pierwszy dawało możliwość wygenerowania wymaganych mutantów z ominięciem procesu gametogenezy. W tym celu zaprojektowałam specyficzne gRNA, które zostały mikrowstrzyknięte do zygot wraz z mRNA kodującym Cas9 i oligonukleotydami zawierającymi mutację R749H („slow oligo”). Uzyskane zarodki przeniesiono w stadium dwukomórkowym do myszy w ciąży rzekomej. Wśród 47 urodzonych myszy nie uzyskaliśmy ani homozygotycznych, ani heterozygotycznych zwierząt z mutacją *Polr2a*^{R749H}. Sugerowało to, że mutacja R749H nie jest kompatybilna z rozwojem embrionalnym. Alternatywnym wytłumaczeniem mogła być nieefektywna naprawa lub indukcja pęknięć dwuniciowego DNA (DSB) przez sgRNA. Aby wykluczyć tą drugą możliwość, powtórzyłam ten eksperyment, używając mieszanki 1:1 „silent oligo” (zawierającego kilka cichych mutacji) i „slow oligo” (z mutacją R749H). Żadna z 51 urodzonych myszy nie miała mutacji *Polr2a*^{R749H}, jednak zidentyfikowałam dwie homozygoty i cztery heterozygoty zawierające ciche mutacje wprowadzone poprzez naprawę „silent oligo”. Podsumowując, wyniki te wykazały, że nawet w przypadku heterozygotyczności, *Polr2a*^{R749H} powoduje wady rozwojowe u myszy. W celu zbadania na jakim etapie rozwoju *Polr2a*^{R749H} powoduje śmiertelność, powtórzyłam eksperyment CRISPR/Cas9 i dokonałam analizy genotypów zygot hodowanych przez 3 dni *in vitro* i zarodków w dniu E9.5. Wśród około 100 zarodków zanalizowanych w późnym stadium moruli/blastocysty, obecne było kilka zarodków heterozygotycznych i 1 homozygotyczny zarodek, demonstrując, że mutacja *Polr2a*^{R749H} jest tolerowana na etapie przedimplantacyjnym. Nie zidentyfikowałam natomiast żadnego homozygotycznego i tylko jeden heterozygotyczny

Polr2a^{R749H} embrion w dniu E9.5. Podsumowując wyniki uzyskane podczas krzyżowania chimer jak również w eksperymentach metoda CRISPR/Cas9, mutacja *Polr2a*^{R749H} powoduje śmiertelność na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego.

Biorąc pod uwagę wczesną śmiertelność embrionów, a co za tym idzie brak materiału badawczego do określenia na jakie aspekty rozwoju wpływa zmiana prędkości RNAPII, w kolejnych etapach tych badań postanowiłam wykorzystać modele różnicowania *in vitro*. Najpierw zastosowałam różnicowanie nieukierunkowane, w którym pojedyncze komórki są wysiewane w kroplach, w pożywce pozbawionej LIF. Komórki te rozmnażają się i tworzą agregaty komórkowe, „zarodki”, składające się ze wszystkich trzech listków zarodkowych. Zaobserwowałam, że ESC z „wolną” RNAPII były w stanie dać początek wszystkim trzem listkom zarodkowym i potwierdziłam to za pomocą analizy RT-qPCR i mikroskopowej odpowiednich markerów.

Następnie postanowiłam skoncentrować się na rozwoju tkanki nerwowej. W tym celu poddałam różnicowaniu komórki ESC w multipotentne, Sox1 i Nestin-dodatnie neuronalne komórki progenitorowe (NPC) (Ying *et al.*, 2003; Conti *et al.*, 2005). NPC można następnie wykorzystać do wygenerowania nerwowych komórek macierzystych (NSC). NPC hoduje się w pożywce zawierającej czynnik wzrostu naskórka/fibroblastów 2 (EGF/FGF2) przez 5-7 dni, aż utworzą agregaty komórkowe. Agregaty te są następnie wysiewane na płytkach pokrytych lamininą, gdzie po pewnym czasie przerastają populacją bipolarnych, samoodnawiających się i multipotencjalnych NSC. Alternatywnie, NPC można zróżnicować we wszystkie trzy linie tkanki nerwowej. Na przykład, NPC hodowane na poliornitynie/lamininie w pożywce zawierającej cAMP i kwas askorbinowy różnicują się w niedojrzałe komórki neuronalne Tuj1+, a następnie w dojrzałe neurony postmitotyczne Map2+. Początkowo, zróżnicowałam *Polr2a*^{WT/WT} i *Polr2a*^{slow/slow} ESC w kierunku NPC. W przypadku obu genotypów, udało mi się uzyskać Sox1-negatywne i Pax6-dodatnie komórki NPC, chociaż progenitory uzyskane z *Polr2a*^{slow/slow} ESC charakteryzowały się zmniejszoną proliferacją i zwiększoną apoptozą. *Polr2a*^{WT/WT} i *Polr2a*^{slow/slow} NPC hodowane w obecności EGF i FGF2 utworzyły agregaty, ale tylko *Polr2a*^{WT/WT} NSC mogły być utrzymane w warunkach EGF/FGF2, podczas gdy *Polr2a*^{slow/slow} NSC po kilku pasażach ulegały apoptozie lub spontanicznemu różnicowaniu, wskazujące na zaburzoną równowagę między samoodnawianiem się a różnicowaniem.

VI. Szybkość polimerazy RNAPII reguluje splicing alternatywny w ESC i podczas różnicowania tkanki nerwowej (**Publikacja 3**).

W celu sprawdzenia czy model kinetyczny dotyczący wpływu prędkości polimerazy RNAPII na AS sprawdza się *in vivo*, wykonałam RNAseq na próbkach RNA pobranych z ESC, NPC i neuronów, *Polr2a*^{WT/WT} i *Polr2a*^{slow/slow}. Chciałam ustalić zarówno bezwzględne zmiany w splicingu, jak i znaczenie regulacji kinetycznej AS w zależności od etapu różnicowania. W celu porównania AS pomiędzy dwoma genotypami, użyłam narzędzia obliczeniowego vast-tool, które przypisuje każdemu egzonowi wartość „procent spliced in” (PSI). Zaobserwowałam, że ilość zmian AS w odpowiedzi na zmienioną kinetykę transkrypcji była znacznie wyższa w NPC i w pełni zróżnicowanych neuronach w porównaniu do ESC (166 egzonów i mikroegzonów w *Polr2a*^{slow/slow} ESCs, w porównaniu z 677 lub 693 egzonami i mikroegzonami w *Polr2a*^{slow/slow}, odpowiednio w NPC i neuronach). Biorąc pod uwagę, że całkowita liczba wykrytych zdarzeń AS na różnych etapach różnicowania jest porównywalna, wyniki te wskazują, że znaczenie regulacji kinetycznej AS wzrasta wraz z postępem różnicowania komórek. Co więcej, nie zaobserwowałam żadnej tendencji w kierunku zwiększonego włączania alternatywnych egzonów w komórkach *Polr2a*^{slow/slow} ESC lub NPC w porównaniu do ich dzikich odpowiedników. Niewielka tendencja do zwiększonego włączenia alternatywnych egzonów została zaobserwowana tylko w neuronach *Polr2a*^{slow/slow} (zwiększone włączenie 60% zmienionych alternatywnych egzonów). Dane te są zgodne z obecnym modelem kinetycznym, proponującym, że wolna polimeraza RNAPII może prowadzić do zwiększonego włączenia egzonu, jeśli zdarzenie AS zależy od rekrutacji pozytywnych regulatorów, albo do pominięcia egzonu, jeśli rekrutowane są inhibitory splicingu (Dujardin *et al.*, 2014).

Aby zbadać, co sprawia, że pewne egzony są wrażliwe na prędkość RNAPII, przeanalizowałam następujące właściwości zmienionych egzonów: siła miejsc splicingowych 5' i 3', a także długość flankujących intronów i alternatywnych egzonów (Yeo and Burge, 2004; Corvelo *et al.*, 2010). Stworzyłam również mapy RNA dla białek wiążących RNA w obrębie zmienionych egzonów/intronów, korzystając z opublikowanego katalogu motywów wiążących RNA (Ray *et al.*, 2013). Zaobserwowałam dwa ciekawe zjawiska. Egzony wrażliwe na wolną polimerazę w komórkach ESC charakteryzują się dłuższymi flankującymi intronami (mediana odpowiednio 2335 i 1546 zasad w egzonach włączonych i niezmienionych), co jest zgodne z oryginalnym modelem „okna możliwości” modelu kinetycznego: dłuższe introny mogą przyczynić się do wydłużenia czasu, w którym może nastąpić rozpoznanie i składanie suboptymalnych egzonów w powstających transkryptach. Egzony regulowane w zróżnicowanych komórkach były natomiast bardziej zależne od specyficznych RBP. Na przykład, zaobserwowałam zwiększoną ilość motywów rozpoznawanych przez białko Noval1 w intronach poniżej pominiętych egzonów, co jest zgodne z publikacjami wskazującymi, że wiązanie Noval1 poniżej

alternatywnych egzonów hamuje ich włączanie do transkryptu mRNA (Ule *et al.*, 2006). Chciałam ustalić, czy obserwowane zmiany w splicingu są bezpośrednim wynikiem zaburzeń kinetyki transkrypcji, czy też są odpowiedzią na zmianę w ekspresji czynników zaangażowanych w regulację AS. Chociaż ekspresja niektórych RBP była zmieniona w komórkach *Polr2a^{slow/slow}*, nie stwierdziłam korelacji pomiędzy zmianami AS w komórkach *Polr2a^{slow/slow}*, a zmianami AS stwierdzonymi po eksperymentalnym zaburzeniu funkcji tych białek. To wskazuje na to, że zaobserwowane zmiany splicingu w naszych modelach komórkowych są bezpośrednio spowodowane „wolną” polimerazą RNAPII.

VII. Prędkość RNAPII wpływa na prawidłową ekspresję i AS długich genów zaangażowanych w funkcję synaps w neuronach (**Publikacja 3**).

Przyjęłam hipotezę, że zmiany w kinetyce transkrypcji mogą mieć wpływ nie tylko na AS, ale również na ilość produkowanego mRNA. Rzeczywiście, wyniki RNAseq ujawniły zmiany w ekspresji kilkuset genów w komórkach z wolniej transkrybującą polimerazą, w porównaniu do komórek z jej dzikim odpowiednikiem. Zmiany w ekspresji mRNA nie korelowały ze zmianami AS. Wyjątkiem była retencja intronów, w przypadku których zaobserwowałam ujemną korelację z poziomem ekspresji. Przyczyną tej ujemnej zależności jest najprawdopodobniej fakt, że retencja intronów często prowadzi do powstania przedwczesnych kodonów STOP, które są rozpoznawane i stanowią sygnał indukujący degradację mRNA w procesie NMD. Analiza mająca na celu określenie grup funkcyjnych wśród genów, których ekspresja uległa zmianie wykazała, że mRNA o zmniejszonej ekspresji lub podlegające AS w *Polr2^{slow/slow}* neuronach, kodują białka zaangażowane w tworzenie synaps i sygnalizację synaptyczną. Te mRNA kodują białka uczestniczące w całym cyklu życiowym pęcherzyka synaptycznego, to jest: przywiązywanie pęcherzyka do cytoszkieletu aktynowego (Syn1 i Syn2) (Thomas *et al.*, 1988); fuzja i recykling pęcherzyków synaptycznych (Snap25, Stx1b, Stxbp1 i Syt1), system rusztowania synaptycznego i transsynaptyczne białka komunikacyjne (Nrxn1, Nrxn2, Cntnap2 i Cntnap3). W celu zrozumienia, dlaczego te specyficzne kategorie funkcyjne są regulowane w neuronach z „wolną” RNAPII, dokonałam analizy cech charakteryzujących te geny, w tym zawartość GC, ich długość, liczbę egzonów. Analiza ta wykazała, że 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 wpłynęła na zmniejszenie 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 10 kb do ponad 80% dla genów wyjątkowo długich. Jest to fascynująca obserwacja, biorąc pod uwagę fakt, że w neuronach ulegają ekspresji jedne z najdłuższych genów, a wiele z nich koduje białka zaangażowane w rozwój neuronów i tworzenie synaps. W oparciu o to odkrycie, spekuluję, że optymalna prędkość RNAPII jest niezbędna dla podtrzymania transkrypcji i splicingu długich transkryptów, wymaganych do funkcjonowania neuronów. Zgodnie z tą hipotezą, RNAPII o zmniejszonej prędkości preferencyjnie wpływa na transkrypcję i splicing tych długich genów. Istniejąca literatura potwierdza ten model, zgodnie z którym ekspresja długich genów w neuronach może wymagać dodatkowych mechanizmów, aby specyficznym utrzymać transkrypcję na duże odległości. Na przykład wykazano, że neuronalne białko wiążące RNA Sfpq (bogate w prolinę/glutaminę, znane również jako PSF) jest czynnikiem krytycznym dla utrzymywania transkrypcji długich genów (Patton *et al.*, 1993; Takeuchi *et al.*, 2018). Dlaczego jest to ważne? Uważa się, że rozregulowanie ekspresji długich genów w neuronach leży u podstaw zaburzeń neurodegeneracyjnych i psychiatrycznych (King *et al.*, 2013; Gabel *et al.*, 2015). RBP zaangażowane w choroby takie jak ALS lub ASD, preferencyjnie wpływają na splicing długich pre-mRNA (Lagier-Tourenne *et al.*, 2012; Takeuchi *et al.*, 2018). Moje wyniki sugerują, że nieprawidłowa regulacja szybkości RNAPII może mieć również szkodliwy wpływ na rozwój układu nerwowego, wpływając głównie na ekspresję i/lub splicing białek synaptycznych, które są kodowane przez szczególnie długie geny. W związku z tymi obserwacjami proponuję model, że nieprawidłowa regulacja szybkości RNAPII, na przykład na skutek mutacji w czynnikach elongacyjnych, powoduje zmiany w ekspresji i AS długich genów, wpływając w ten sposób na funkcję lub rozwój układu nerwowego. Odkrycia te stanowią podstawę do przeprowadzenia badań mających na celu określenie roli kinetyki transkrypcji w prawidłowym i zaburzonym rozwoju układu nerwowego.

Przyszłe kierunki badawcze.

Celem moich niezależnych badań jest lepsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację etapu elongacji podczas transkrypcji RNAPII w rozwoju organizmu i w utrzymaniu stabilności genomu. Jestem przygotowana w sposób merytoryczny, aby pokierować takim projektem. Moje międzynarodowe doświadczenia naukowe umożliwiły mi uzyskać wiedzę ekspercką w dziedzinie transkrypcji, ekspresji genów, rozwoju embrionalnego, a także umiejętności w najnowocześniejszych technikach badania kinetyki transkrypcji i obróbki RNA. Posiadam umiejętności wymagane do analizy danych uzyskanych w eksperymentach

sekwencjonowania. Te umiejętności i wiedzę skonsolidowałam i usystematyzowałam podczas studiów magisterskich z bioinformatyki na Uniwersytecie w Glasgow. W 2021 uzyskałam tytuł magistra bioinformatyki z wyróżnieniem.

Uzyskałam finansowanie na realizację zaproponowanych poniżej planów badań. Otrzymałam grant Sonata Bis na lata 2021-2026 w wysokości 3,1 mln zł, co umożliwi mi rekrutację postdoca i doktoranta. Uzyskałam również stypendium Polish Returns Grant na lata 2022-2025, które pokryje moje wynagrodzenie, a także umożliwi mi rekrutację pracownika naukowego.

W publikacji 3 wykazałam, że zmiany szybkości RNAPII mogą modyfikować skład transkryptomu. Odkryłam również, że właściwa kinetyka RNAPII pełni istotną funkcję w regulacji rozwoju embrionalnym. Jak dotąd mechanizmy odpowiedzialne za regulację prędkości RNAPII podczas różnicowania nie są opisane. W moim projekcie planuję zbadać rolę zmian prędkości RNAPII w rozwoju, a moje cele są następujące:

Cel 1: Zbadanie mechanizmów regulacji szybkości RNAPII w neurorozwoju.

Cel 2: Wyjaśnienie roli elongacji w etiologii zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD).

Neurorozwój wymaga wytworzenia odpowiedniej liczby różnych typów komórek z nerwowych komórek macierzystych (NSC). Molekularne podstawy homeostazy NSC, czyli tego jak zachowana jest równowaga między proliferacją a różnicowaniem, nie są w pełni opisane. W moich badaniach wykazałam, że NSC z mutacją *RNAPII^{R749H}* nie odnawiają się samoistnie i podlegają spontanicznemu różnicowaniu się. Zauważyłam również, że wolna RNPAII preferencyjnie wpływa na obniżenie ekspresji bardzo długich genów w neuronach (Maslon et al., 2019). Kiedy porównałam te mRNA z listą mRNA z bazy danych SFARI, gdzie skatalogowane są geny związane z autyzmem, okazało się, że pokrywają się one w 15%.

Na pierwszym etapie moich badań określe, jak zmienia się prędkość RNAPII podczas normalnego neurorozwoju, a mianowicie podczas różnicowania komórek ESC w NSC i do neuronów. Zmiany w szybkości elongacji zostaną porównane do zmian w położeniu RNAPII i w strukturze chromatyny. To umożliwi określenie i) przyczyn i następstw zmian szybkości transkrypcji oraz ii) jak te parametry wpływają na zmiany ekspresji genów, które leżą u podstaw rozwoju nerwowego. Aby zbadać molekularne podstawy regulacji szybkości RNAPII, określe zmiany w składzie białkowym immunoprecypitowanych kompleksów RNAPII. Następnie, dla wybranych czynników białkowych, których wiązanie do RNAPII jest różne w zależności od etapu różnicowania, zaprojektuję linie komórkowe umożliwiające ich indukowaną degradację. To umożliwi mi zbadanie jaki jest wpływ braku tych białek na szybkość elongacji, ekspresję

genów i zdolność różnicowania. Stworzę również warunkowe, specyficzne dla mózgu modele mysie z „wolną” i „szybką” (E1126G) RNAPII, aby ocenić konsekwencje niewłaściwej kinetyki transkrypcji dla rozwoju układu nerwowego *in vivo*. Z użyciem tych narzędzi, chcę zbadać: czy kinetyka ma wpływ na różnicowanie? jakie są zmiany w ekspresji genów? czy ten sam zestaw genów jest wrażliwy na „wolną” i „szybką” RNAPII?

Jako drugi cel moich badań planuję sprawdzić hipotezę, że część genów ryzyka zaburzeń ze spektrum autyzmu, ASD, m.in. kodujących białka odpowiedzialne za modyfikacje struktury chromatyny i regulatory etapu elongacji transkrypcji (Iossifov *et al.*, 2012; O’Roak *et al.*, 2012; de Rubeis *et al.*, 2014) wpływają na tempo transkrypcji. W tym celu, wykorzystam istniejące i stworzę nowe ludzkie linie komórkowe związane z ASD. Dwie nowe linie będą zawierać mutacje w genach ryzyka ASD, a mianowicie LEO1 i RNAPII. Białko LEO1 wchodzi w skład kompleksu PAF1, który wiąże się z RNAPII i stymuluje prędkość elongacji. Powtarzające się delecje w promotorze LEO1 u pacjentów z ASD powodują zwiększoną ekspresję tego białka (Brandler *et al.*, 2018). Inna zidentyfikowana mutacja dotyczy Seryny 1590 w sekwencji RNAPII (Neale *et al.*, 2012), która znajduje się w domenie zwanej łącznikiem CTD i ulega fosforylacji przez TEF-b podczas etapu elongacji (Vos *et al.*, 2018). Znaczenie tego aminokwasu i samej fosforylacji dla procesu transkrypcji nie zostało jeszcze zbadane. Po stworzeniu tych modeli najpierw sprawdzę obecność zmian fenotypowych obserwowanych w innych modelach komórkowych ASD (prolifерacja/różnicowanie NPC, funkcjonalność neuronów wyróżnicowanych z NSC). Zastosuję metody opisane powyżej, aby ustalić zmiany w kinetyce transkrypcji. Zbadam również, czy można zmienić prędkość RNAPII za pomocą panelu inhibitorów enzymów modyfikujących chromatynę i w ten sposób przywrócić prawidłową ekspresję odpowiednich genów (np.: długich genów neuronalnych nieprawidłowo regulowanych w ASD). Zidentyfikowane modulatory transkrypcji zostaną użyte w celu sprawdzenia czy aktywność neuronalną/synaptyczną modeli ASD można przywrócić *in vitro*. Mysie modele wolnej/szybkiej RNAPII (Cel 1) zostaną wykorzystane do sprawdzenia obecności fenotypów autystycznych (in vitro: proliferacja NPC, różnicowanie, aktywność neuronalna; in vivo: badania behawioralne). Te badania pozwolą zrozumieć, jak tempo transkrypcji wpływa na rozwój mózgu i czy jego niewłaściwa regulacja może prowadzić do zaburzeń neurorozwoju. Ta wiedza może przyczynić się do opracowania strategii terapeutycznych i podejść diagnostycznych dla chorób rozwojowych.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Podczas mojego stażu podoktorskiego w laboratorium Javiera Caceres'a zaangażowałam się we współpracę z Marią Gomez z Uniwersytetu w Madrycie. Nasza współpraca została zainicjowana podczas urlopu naukowego Marii w moim instytucie i doprowadziła do identyfikacji nowych funkcji histonu H1 w strukturze chromatyny i procesie transkrypcji. Mój udział w tej współpracy polegał na zaplanowaniu i pomocy w wykonaniu eksperymentów znakowania metabolicznego (tj. eksperymentów, w których stosuje się zmodyfikowane nukleotydy do znakowania powstającego RNA). Artykuł został poddany ocenie recenzentów w *Cell Reports*, obecnie pracujemy nad poprawkami wskazanymi przez recenzentów, a preprint jest dostępny w Biorxiv (Fernández-Justel *et al.*, 2021). Obecnie, Maria i ja, już jako kierownik mojej własnej grupy badawczej, współpracujemy w celu ustalenia wpływu zaburzonej kinetyki RNAPII na stabilność genomu.

Podczas mojego stażu podoktorskiego współpracowałam z Dasą Longman, postdokkiem w grupie Javiera Caceres, aby scharakteryzować funkcję nowo zidentyfikowanego czynnika NMD, białka NBAS. W związku z tym, zaplanowałam, wykonałam i przeanalizowałam wyniki eksperymentów, które miały na celu określenie roli NBAS i innych czynników NMD w stabilności mRNA w różnych przedziałach komórkowych. Badanie te doprowadziły do opisanie nowej, ścieżki degradacji mRNA zlokalizowanej w ER (Longman *et al.*, 2020).

Podczas mojego stażu podoktorskiego, w okresie listopad 2020 - październik 2021, studiowałam w pełnym wymiarze godzinowym, bioinformatykę. W ramach pracy magisterskiej, współpracowałam z dr Rossem Carruthers na Uniwersytecie w Glasgow i zaangażowałam się w projekt mający na celu scharakteryzowanie czynników epigenetycznych zaangażowanych w powstawanie dwuniciowych pęknięć DNA (DSB) w glejaku. W tym celu użyłam metod bioinformatycznych aby określić i) cało-genomowy rozkład DSB w panelach kontrolnych liniach komórkowych glejaka lub po ich ekspozycji na czynniki uszkadzające DNA na podstawie danych uzyskanych w BLISS-seq, ii) zmiany ekspresji genów i mutacji w tym samym panelu, korzystając z danych RNA-seq i DNA-seq. To umożliwiło mi stwierdzić, że różne linie komórkowe GBM, podobnie jak nowotwory pierwotne, dzielą się na różne

podtypy komórkowe, o charakterystycznym rozmieszczeniu i liczbie DSB oraz odpowiedzi na promieniowanie.

Przed odbyciem stażu podoktorskiego w grupie Javiera Caceres, wygrałam konkurs na odbycie 4-letniego stażu doktorskiego finansowanego przez Cancer Research UK, co pozwoliło mi rozpocząć studia doktoranckie z zakresu biologii nowotworów w Cancer Research Center w Edynburgu. Celem moich badań było wyjaśnienie funkcji białka AGR2 w procesie transformacji. AGR2 uczestniczy w wielu procesach biologicznych, w tym w tworzeniu komórek kubkowych i regeneracji kończyn, i ulega nadekspresji w różnych nowotworach. Kiedy rozpoczynałam doktorat, mechanizm działania AGR2 nie był znany, stąd moje badania skoncentrowały się na określeniu funkcji i regulacji AGR2 w komórkach rakowych. Wykorzystałam drożdżowy system dwuhybrydowy i zidentyfikowałam białko wiążące ATP, Reptynę, jako białko oddziałujące z AGR2. Wykazałam, że ekspresja obu tych białek jest podwyższona w skrawkach tkankowych pobranych z raka piersi. Zastosowałam szereg eksperymentów, aby wykazać, że AGR2 oddziałuje z Reptyną w ludzkich komórkach. Oczyszczałam rekombinowane białka AGR2 i Reptynę z hodowli *E.coli*, i wykazałam, że ich interakcja jest bezpośrednia i wymaga aktywności wiążącej ATP w Reptynie. Zastosowałam bibliotekę peptydów, obejmującą całą sekwencję AGR2 i zidentyfikowałam sekwencję aminokwasową, która stanowiła miejsce dokowania dla Reptyny. Ponadto odkryłam, że kompleks AGR2-Reptyna oddziałuje z białkiem p53, co hamuje aktywność transkrypcyjną p53. Te badania zaowocowały publikacją, w której byłam pierwszym autorem oraz dodatkową publikacją wraz z pracującym ze mną magistrantem (Maslon *et al.*, 2010; Healy *et al.*, 2015). Moje badania w trakcie doktoratu, w tym rola AGR2 w hamowaniu aktywności transkrypcyjnej p53, umożliwiły mi zdobycie obszernej wiedzy na temat szlaków sygnalizacyjnych wpływających na funkcje p53 w nowotworach, a także roli zmutowanego p53 w onkogenezie, co doprowadziło do opracowania dobrze cytowanej pracy przeglądowej opublikowanej w *Trends in Cell Biology* (Maslon and Hupp, 2010).

W trakcie doktoratu współpracowałam również z Instytutem Masaryk w Brnie, w celu zbadania funkcji białek z rodziny AGR, AGR2 i AGR3, w nowotworach, co zaowocowało artykułem opisującym zmiany w ekspresji AGR2 i ich wpływ na lekooporność u chorych na raka piersi (Hrstka *et al.*, 2010).

Podczas studiów magisterskich na Uniwersytecie Jagiellońskim otrzymałam stypendium Socrates-Erasmus, co umożliwiło mi wizytę w laboratorium Robina Frahrauesa na

Uniwersytecie Paris VII. Spędziłam tam 8 miesięcy, a moje zadanie polegało na stworzeniu narzędzi badawczych do zbadania roli mRNA kodującego p53 w regulacji aktywności p53 (Candeias *et al.*, 2008).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Umiejętności związane z nauczaniem i funkcją opiekuna naukowego rozwinęłam poprzez następujące działania:

a) Opieka naukowa nad magistrantami i doktorantami.

Pełniłam funkcję opiekuna części praktycznej i promotora pomocniczego poniższych magistrantów i doktorantki.

- Fiona Haward, praca doktorska - 2017
- Francesca Tagiliani, praca magisterska - 2015
- Adam Healy, praca magisterska - 2011
- Natalie Neumann, praca magisterska – 2010

W przypadku opieki nad doktorantką, uczestniczyłam w regularnych spotkaniach (10 miesięcy, 1 rok, 2 rok, 3 rok) z komisją pracy dyplomowej, która ocenia postępy pracy doktorantów. Byłam również zaangażowana w korektę prac dyplomowych tych studentów.

b) Nauczanie

W latach 2017-2021 przygotowałam i prowadziłam dwudniowy praktyczny kurs profilowania rybosomalnego dla doktorantów I roku w Instytucie Genetyki i Nowotworów (IGC), w Edynburgu.

Zostałam zaproszona przez prof. Nicka Gilberta, Dyrektora Studiów Doktoranckich w IGC, do udziału w panelach ewaluacyjnych dla doktorantów (ewaluacja 10-tygodniowa i ocena po 1 roku studiów doktoranckich), które polegały na ocenie ich pisemnych raportów i udziału w komisji oceniającej postępy w realizacji projektu. Te doświadczenia przygotowały mnie do podjęcia samodzielnego nadzoru merytorycznego nad doktorantami.

c) Popularyzacja nauki

Uczestniczyłam w Targach Kariery w Edynburskim Liceum, gdzie w czteroosobowym zespole zachęcaliśmy młodych uczniów do studiowania nauk przyrodniczych.

Przygotowywałam i przeprowadzałam eksperymenty z uczniami klasy pierwszej w International School of Poznań.

d) Dorobek organizacyjny

Wraz z Christine Mordstein współtworzyłam i współorganizowałam klub ediRNA, inicjatywę naukową, która umożliwiała dzielenie się wiedzą i doświadczeniami wśród badaczy RNA z różnych kampusów uniwersyteckich i instytutów w Edynburgu. W ramach tej inicjatywy zorganizowałam dwa spotkania naukowe dla ok. 80 uczestników, w tym m.in. stworzyłam listę prelegentów i zaprosiłam ich na spotkanie, pozyskałam sponsorów, co umożliwiło między innymi zapewnienie cateringu. W ramach klubu ediRNA zaprosiłam Herve le Hira z Uniwersytetu w Bazylei do poprowadzenia seminarium.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Otrzymałam finansowanie Sonata Bis z NCN na lata 2021-2026 w wysokości 3,1 mln zł, co umożliwi mi rekrutację postdoca i doktoranta.

Uzyskałam również stypendium Polskie Powroty z NAWA na lata 2022-2025 (1,1 mln zł), które pokryje moje wynagrodzenie, a także umożliwi mi rekrutację pracownika naukowego oraz pomoc administracyjną w niepełnym wymiarze godzin.

W 2019 otrzymałam Nick Hastie Career Award dla obiecujących naukowców wśród naukowców pracujących w Instytucie Genetyki i Nowotworów w Edynburgu.

W 2019 roku pozyskałam również pieniądze umożliwiające finansowanie naszej inicjatywy ediRNA (opisanej powyżej) w ramach tzw. Salonu RNA (RNA Society)

W 2004 roku otrzymałam stypendium Socrates-Erasmus, co umożliwiło mi wyjazd do Paryża i zdobycie pierwszego praktycznego doświadczenia w laboratorium biologii molekularnej pod kierownictwem Dr Robin Fahraeus, Inserm, na Uniwersytecie Paryskim.

Od 2020 roku należę do panelu ekspertów zajmującego się recenzjami wniosków o grant Miniatura (NCN).

8. Bibliografia

- Backlund, M. *et al.* (2020) "Plasticity of nuclear and cytoplasmic stress responses of RNA-binding proteins," *Nucleic Acids Research*, 48(9), p. 4725. doi:10.1093/NAR/GKAA256.
- Baluapuri, A. *et al.* (2019) "MYC Recruits SPT5 to RNA Polymerase II to Promote Processive Transcription Elongation," *Molecular Cell*, 74(4), p. 674. doi:10.1016/J.MOLCEL.2019.02.031.
- Baralle, F.E. and Giudice, J. (2017) "Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, pp. 437–451. doi:10.1038/nrm.2017.27.
- Barisic, M. *et al.* (2010) "Spindly/CCDC99 Is Required for Efficient Chromosome Congression and Mitotic Checkpoint Regulation," *Molecular Biology of the Cell*, 21(12), p. 1968. doi:10.1091/MBC.E09-04-0356.
- Bentley, D.L. (2014) "Coupling mRNA processing with transcription in time and space.," *Nature Reviews Genetics*, 15(3), pp. 163–175. doi:10.1038/nrg3662.
- Bhatt, D.M. *et al.* (2012) "Transcript Dynamics of Proinflammatory Genes Revealed by Sequence Analysis of Subcellular RNA Fractions," *Cell*, 150(2), pp. 279–290. doi:10.1016/j.cell.2012.05.043.
- Brandler, W.M. *et al.* (2018) "Paternally inherited cis-regulatory structural variants are associated with autism," *Science*, 360(6386), pp. 327–331. doi:10.1126/science.aan2261.
- Bresson, S. *et al.* (2020) "Stress-Induced Translation Inhibition through Rapid Displacement of Scanning Initiation Factors," *Molecular Cell*, 80(3), pp. 470–484. doi:10.1016/j.molcel.2020.09.021.
- Cáceres, J.F., Sreaton, G.R. and Krainer, A.R. (1998) "A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm.," *Genes & development*, 12(1), pp. 55–66.
- Candeias, M.M. *et al.* (2008) "p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions," *Nature Cell Biology* 2008 10:9, 10(9), pp. 1098–1105. doi:10.1038/ncb1770.
- Cazalla, D. *et al.* (2002) "Nuclear Export and Retention Signals in the RS Domain of SR Proteins," *Molecular and cellular biology*, 22(19), pp. 6871–6882. doi:10.1128/MCB.22.19.6871.
- Chen, Y. *et al.* (1996) "Drosophila RNA polymerase II mutants that affect transcription elongation.," *The Journal of biological chemistry*, 271(11), pp. 5993–5999. doi:10.1074/JBC.271.11.5993.
- Conti, L. *et al.* (2005) "Niche-Independent Symmetrical Self-Renewal of a Mammalian Tissue Stem Cell," *PLoS Biology*. Edited by R. Lovell-Badge, 3(9), pp. e283–e283. doi:10.1371/journal.pbio.0030283.
- Core, L. and Adelman, K. (2019) "Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: a nexus of gene regulation," *Genes & Development*, 33(15–16), p. 960. doi:10.1101/GAD.325142.119.
- Corvelo, A. *et al.* (2010) "Genome-Wide Association between Branch Point Properties and Alternative Splicing," *PLoS Computational Biology*. Edited by I.M. Meyer, 6(11), pp. e1001016–e1001016. doi:10.1371/journal.pcbi.1001016.

- Coulter, D.E. and Greenleaf, A.L. (1985) "A mutation in the largest subunit of RNA polymerase II alters RNA chain elongation in vitro.," *The Journal of biological chemistry*, 260(24), pp. 13190–13198.
- Cowper, A.E. *et al.* (2001) "Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing.," *The Journal of biological chemistry*, 276(52), pp. 48908–48914. doi:10.1074/jbc.M103967200.
- Cramer, P. *et al.* (2008) "Structure of eukaryotic RNA polymerases," *Annual Review of Biophysics*. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.130008.
- Cugusi, S. *et al.* (2022) "Heat shock induces premature transcript termination and reconfigures the human transcriptome," *Molecular Cell*, 0(0). doi:10.1016/J.MOLCEL.2022.01.007.
- Danko, C.G. *et al.* (2013) "Article Signaling Pathways Differentially Affect RNA Polymerase II Initiation , Pausing , and Elongation Rate in Cells." doi:10.1016/j.molcel.2013.02.015.
- Despic, V. *et al.* (2017) "Dynamic RNA-protein interactions underlie the zebrafish maternal-to-zygotic transition," *Genome Research*, 27(7), pp. 1184–1194. doi:10.1101/GR.215954.116/-/DC1.
- Dujardin, G. *et al.* (2014) "How Slow RNA Polymerase II Elongation Favors Alternative Exon Skipping," *Molecular Cell*, 54(4), pp. 683–690. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.044.
- Fernández-Justel, J.M. *et al.* (2021) "Histone H1 regulates non-coding RNA turnover on chromatin in a m6A-dependent manner," *bioRxiv*, p. 2021.10.12.464039. doi:10.1101/2021.10.12.464039.
- Fong, N. *et al.* (2014) "Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II elongation rate.," *Genes & development*, 28(23), pp. 2663–2676. doi:10.1101/gad.252106.114.
- Gabel, H.W. *et al.* (2015) "Disruption of DNA-methylation-dependent long gene repression in Rett syndrome," *Nature*, 522(7554), p. 89. doi:10.1038/nature14319.
- Gan, W. *et al.* (2011) "R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression," *Genes & Development*, 25(19), pp. 2041–2056. doi:10.1101/GAD.17010011.
- Gilbertson, S. *et al.* (2018) "Changes in mRNA abundance drive shuttling of RNA binding proteins, linking cytoplasmic RNA degradation to transcription," *eLife*, 7. doi:10.7554/ELIFE.37663.
- Gregersen, L.H., Mitter, R. and Svejstrup, J.Q. (2020) "Using TT chem-seq for profiling nascent transcription and measuring transcript elongation," *Nature protocols*, 15(2), pp. 604–627. doi:10.1038/S41596-019-0262-3.
- Hargous, Y. *et al.* (2006) "Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8.," *The EMBO journal*, 25(21), pp. 5126–5137. doi:10.1038/sj.emboj.7601385.
- He, R. *et al.* (2013) "Cep57 Protein Is Required for Cytokinesis by Facilitating Central Spindle Microtubule Organization," *The Journal of Biological Chemistry*, 288(20), p. 14384. doi:10.1074/JBC.M112.441501.
- Healy, A.R. *et al.* (2015) "Discovery of a novel ligand that modulates the protein-protein interactions of the AAA+ superfamily oncoprotein reptin," *Chemical science*, 6(5), pp. 3109–3116. doi:10.1039/C4SC03885A.
- Herzel, L. *et al.* (2017) "Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(10), pp. 637–650. doi:10.1038/nrm.2017.63.

- Hou, L. *et al.* (2019) "Paf1C regulates RNA polymerase II progression by modulating elongation rate," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(29), pp. 14583 LP – 14592. doi:10.1073/pnas.1904324116.
- Hrstka, R. *et al.* (2010) "The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers," *Oncogene*, 29(34), pp. 4838–4847. doi:10.1038/ONC.2010.228.
- Huang, Y. and Steitz, J.A. (2005) "SRprises along a messenger's journey.," *Molecular cell*, 17(5), pp. 613–615. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.020.
- Ibañez-Tallon, I. *et al.* (2004) "Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation," *Human Molecular Genetics*, 13(18), pp. 2133–2141. doi:10.1093/HMG/DDH219.
- Iossifov, I. *et al.* (2012) "De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum.," *Neuron*, 74(2), pp. 285–299. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.009.
- Jonkers, I., Kwak, H. and Lis, J.T. (2014) "Genome-wide dynamics of Pol II elongation and its interplay with promoter proximal pausing , chromatin , and exons," pp. 1–25. doi:10.7554/eLife.02407.
- King, I.F. *et al.* (2013) "Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism," *Nature*, 501(7465), pp. 58–62. doi:10.1038/nature12504.
- de la Mata, M. *et al.* (2003) "A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo," *Molecular Cell*, 12(2), pp. 525–532. doi:10.1016/j.molcel.2003.08.001.
- Lagier-Tourenne, C. *et al.* (2012) "Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs," *Nature Neuroscience*, 15(11), pp. 1488–1497. doi:10.1038/nn.3230.
- Larson, D.R. (2011) "Real-Time Observation of Transcription Initiation and Elongation," 332(6028), pp. 475–478. doi:10.1126/science.1202142.Real-Time.
- Lev Maor, G., Yearim, A. and Ast, G. (2015) "The alternative role of DNA methylation in splicing regulation.," *Trends in genetics : TIG* [Preprint]. doi:10.1016/j.tig.2015.03.002.
- Lin, S. *et al.* (2005) "Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation.," *Molecular cell*, 20(3), pp. 413–425. doi:10.1016/j.molcel.2005.09.015.
- Loges, N.T. *et al.* (2008) "DNAI2 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Defects in the Outer Dynein Arm," *The American Journal of Human Genetics*, 83(5), pp. 547–558. doi:10.1016/J.AJHG.2008.10.001.
- Loges, N.T. *et al.* (2009) "Deletions and Point Mutations of LRRC50 Cause Primary Ciliary Dyskinesia Due to Dynein Arm Defects," *The American Journal of Human Genetics*, 85(6), pp. 883–889. doi:10.1016/J.AJHG.2009.10.018.
- Long, J.C. and Caceres, J.F. (2009) "The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression," *Biochemical Journal*, 417(1), pp. 15–27. doi:10.1042/BJ20081501.
- Longman, D. *et al.* (2020) "Identification of a localized nonsense-mediated decay pathway at the endoplasmic reticulum," *Genes & Development*, 34(16), pp. 1075–1088. doi:10.1101/GAD.338061.120.

- Losada, A. and Hirano, T. (2005) "Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins," *Genes & development*, 19(11), pp. 1269–1287. doi:10.1101/GAD.1320505.
- Maslon, M.M. *et al.* (2010) "A divergent substrate-binding loop within the pro-oncogenic protein anterior gradient-2 forms a docking site for reptin," *Journal of Molecular Biology*, 404(3), pp. 418–438. doi:10.1016/j.jmb.2010.09.035.
- Maslon, M.M. *et al.* (2014) "The translational landscape of the splicing factor SRSF1 and its role in mitosis," *eLife*, 3, pp. 1–27. doi:10.7554/elife.02028.
- Maslon, M.M., Braunschweig, U., Aitken, S., Mann, A.R., *et al.* (2019) "A slow transcription rate causes embryonic lethality and perturbs kinetic coupling of neuronal genes," *The EMBO Journal*, 38, pp. e101244–e101244. doi:10.15252/embj.2018101244.
- Maslon, M.M., Braunschweig, U., Aitken, S., Wilson, A.R., *et al.* (2019) "Slow transcriptional elongation causes embryonic lethality and perturbs kinetic coupling of long neural genes," *Embo Journal*, 38, p. 426577. doi:10.1101/426577.
- Maslon, M.M. and Hupp, T.R. (2010) "Drug discovery and mutant p53," *Trends in Cell Biology*, 20(9), pp. 542–555. doi:10.1016/j.tcb.2010.06.005.
- Michlewski, G., Sanford, J.R. and Cáceres, J.F. (2008) "The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1.," *Molecular cell*, 30(2), pp. 179–189. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.013.
- Mitchison, H.M. *et al.* (2012) "Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia," *Nature Genetics* 2012 44:4, 44(4), pp. 381–389. doi:10.1038/ng.1106.
- Mortin, M.A., Kim, W.J. and Huang, J. (1988) "Antagonistic interactions between alleles of the RplII215 locus in *Drosophila melanogaster*., " *Genetics*, 119(4), pp. 863–873.
- Müller-McNicoll, M. *et al.* (2016) "SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export.," *Genes & development*, 30(5), pp. 553–566. doi:10.1101/gad.276477.115.
- Müller-Mcnicoll, M. and Neugebauer, K.M. (2013) "How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA–protein complexes," *Nature Reviews Genetics* 2013 14:4, 14(4), pp. 275–287. doi:10.1038/nrg3434.
- Muniz, L. and Nicolas, E. (2021) "RNA polymerase II speed : a key player in controlling and adapting transcriptome composition," pp. 1–22. doi:10.15252/embj.2020105740.
- Naftelberg, S. *et al.* (2015) "Regulation of Alternative Splicing Through Coupling with Transcription and Chromatin Structure.," *Annual review of biochemistry*, 84, pp. 165–198. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034242.
- Neale, B.M. *et al.* (2012) "Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders.," *Nature*, 485(7397), pp. 242–245. doi:10.1038/nature11011.
- O’Roak, B.J. *et al.* (2012) "Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations.," *Nature*, 485(7397), pp. 246–250. doi:10.1038/nature10989.
- Patton, J.G. *et al.* (1993) "Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor.," *Genes & development*, 7(3), pp. 393–406.

- Porrúa, O. and Libri, D. (2015) "Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop," *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(3), pp. 190–202. doi:10.1038/NRM3943.
- Proudfoot, N.J. (2016) "Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut," *Science (New York, N.Y.)*, 352(6291), p. aad9926. doi:10.1126/SCIENCE.AAD9926.
- Ray, D. *et al.* (2013) "A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation," *Nature*, 499(7457), p. 172. doi:10.1038/NATURE12311.
- Roeder, R.G. and Rutter, W.J. (1969) "Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms," *Nature*, 224(5216). doi:10.1038/224234a0.
- de Rubeis, S. *et al.* (2014) "Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism," *Nature*, 515(7526), pp. 209–215. doi:10.1038/nature13772.
- Saldi, T. *et al.* (2016) "Coupling of RNA polymerase II transcription elongation with pre-mRNA splicing," *Journal of molecular biology*, 428(12), pp. 2623–2635. doi:10.1016/j.jmb.2016.04.017.
- Sanford, J.R. *et al.* (2004) "A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation.," *Genes & development*, 18(7), pp. 755–768. doi:10.1101/gad.286404.
- Sanford, J.R. *et al.* (2005) "Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), pp. 15042–15047. doi:10.1073/pnas.0507827102.
- Sanford, J.R. *et al.* (2009) "Splicing factor SRSF1 recognizes a functionally diverse landscape of RNA transcripts," *Genome Research*, 19(3), p. 381. doi:10.1101/GR.082503.108.
- Sapra, A.K. *et al.* (2009) "SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo.," *Molecular cell*, 34(2), pp. 179–190. doi:10.1016/j.molcel.2009.02.031.
- Schier, A.C. and Taatjes, D.J. (2020) "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery," *Genes & Development*, 34(7–8), p. 465. doi:10.1101/GAD.335679.119.
- Schwartz, S. and Ast, G. (2010) "Chromatin density and splicing destiny: on the cross-talk between chromatin structure and splicing," *The EMBO Journal*, 29(10), p. 1629. doi:10.1038/EMBOJ.2010.71.
- Sekine, S.I., Tagami, S. and Yokoyama, S. (2012) "Structural basis of transcription by bacterial and eukaryotic RNA polymerases," *Current Opinion in Structural Biology*. doi:10.1016/j.sbi.2011.11.006.
- Shi, X. *et al.* (2011) "CEP70 Protein Interacts with γ -Tubulin to Localize at the Centrosome and Is Critical for Mitotic Spindle Assembly," *The Journal of Biological Chemistry*, 286(38), p. 33401. doi:10.1074/JBC.M111.252262.
- Shimoni-Sebag, A. *et al.* (2013) "RRM1 domain of the splicing oncoprotein SRSF1 is required for MEK1-MAPK-ERK activation and cellular transformation," *Carcinogenesis*, 34(11), pp. 2498–2504. doi:10.1093/CARCIN/BGT247.
- Takeuchi, A. *et al.* (2018) "Loss of Sfpq Causes Long-Gene Transcriptopathy in the Brain," *Cell Reports*, 23(5), pp. 1326–1341. doi:10.1016/J.CELREP.2018.03.141.
- Thomas, L. *et al.* (1988) "Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane," *Science*, 242(4881), pp. 1050–1053. doi:10.1126/science.2461586.

- Twyffels, L., Gueydan, C. and Kruys, V. (2011) "Shuttling SR proteins: more than splicing factors.," *The FEBS journal*, 278(18), pp. 3246–3255. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08274.x.
- Ule, J. *et al.* (2006) "An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation," *Nature*, 444(7119), pp. 580–586. doi:10.1038/nature05304.
- Ule, J. and Blencowe, B.J. (2019) "Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution," *Molecular Cell*. Cell Press, pp. 329–345. doi:10.1016/j.molcel.2019.09.017.
- Vannini, A. and Cramer, P. (2012) "Conservation between the RNA Polymerase I, II, and III Transcription Initiation Machineries," *Molecular Cell*, pp. 439–446. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.023.
- Vos, S.M. *et al.* (2018) "Structure of activated transcription complex Pol II–DSIF–PAF–SPT6," *Nature*, 560(7720), pp. 607–612. doi:10.1038/s41586-018-0440-4.
- Wei, R.R., Al-Bassam, J. and Harrison, S.C. (2006) "The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment," *Nature Structural & Molecular Biology* 2007 14:1, 14(1), pp. 54–59. doi:10.1038/nsmb1186.
- Werner, M., Thuriaux, P. and Soutourina, J. (2009) "Structure-function analysis of RNA polymerases I and III," *Current Opinion in Structural Biology*. doi:10.1016/j.sbi.2009.10.005.
- Williamson, L. *et al.* (2017) "UV Irradiation Induces a Non-coding RNA that Functionally Opposes the Protein Encoded by the Same Gene.," *Cell*, 168(5), pp. 843-855.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.01.019.
- Wójcik, C. *et al.* (1996) "An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces arrest in G2-phase and metaphase in HeLa cells.," *European journal of cell biology*, 70(2), pp. 172–8.
- Xu, X. *et al.* (2005) "ASF/SF2-regulated CaMKII δ alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle.," *Cell*, 120(1), pp. 59–72. doi:10.1016/j.cell.2004.11.036.
- Yeo, G. and Burge, C.B. (2004) "Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals," *Journal of Computational Biology*, 11(2–3), pp. 377–394. doi:10.1089/1066527041410418.
- Ying, Q.-L. *et al.* (2003) "Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture," *Nature Biotechnology*, 21(2), pp. 183–186. doi:10.1038/nbt780.
- Zhang, Y.J. *et al.* (2002) "Identification of Dynein Heavy Chain 7 as an Inner Arm Component of Human Cilia That Is Synthesized but Not Assembled in a Case of Primary Ciliary Dyskinesia," *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), pp. 17906–17915. doi:10.1074/JBC.M200348200.

.....
(podpis wnioskodawcy)

