

Marzena Wojciechowska

AUTOREFERAT

Informacje o osiągnięciu i dorobku naukowym

Tytuł osiągnięcia naukowego:

**ELEMENTY PATOMECHANIZMÓW I PODEJŚCIA TERAPEUTYCZNE
W CHOROBYCH NEURODEGENERACYJNYCH CZŁOWIEKA
WYWOŁANYCH EKSPANSJAMI SEKWENCJI MIKROSATELITARNYCH**

Poznań, lipiec 2015

1. IMIĘ I NAZWISKO: Marzena Wojciechowska

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

2001, doktor nauk biologicznych, dyscyplina: biologia, specjalność: cytogenetyka; tytuł rozprawy doktorskiej: „*Zmiany towarzyszące rozwojowi i degradacji bielma podczas dojrzewania nasion Echinocystis lobata*”. Praca wykonana w ramach Studium Doktoranckiego Fizjologiczno-Mikrobiologicznego przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź; Promotor: Profesor Maria J. Olszewska.

1997, magister biologii, dyscyplina: biologia, specjalność: nauczycielska; tytuł pracy magisterskiej: „*Zmiany zawartości jądrowego DNA i białek barwiących się NYS w komórkach liścieni kiełkujących nasion Vicia faba susp. minor ocenianych metodą podwójnej cytofotometrii*”. Praca wykonana na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź; Promotor: Profesor Kazimierz Marciniak.

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

10/2009–obecnie, Polska Akademia Nauk, Instytut Chemii Bioorganicznej, Noskowskiego 12/14, Poznań, adiunkt.

01/2007–09/2009, University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Genetics Department, 1515 Holcombe Blvd., Houston, Texas, USA, instructor.

04/2006–12/2006, Laval University, Human Genetics Department, 2705 Blvd. Laurier, Ste-Foy, Quebec City, Quebec, Canada, post-doctoral scientist.

01/2002–04/2006, Texas A&M University System, Health Science Center, Institute of Biosciences and Technology, Center for Genome Research, 2121 West Holcombe Blvd., Houston, Texas, USA, post-doctoral research scientist.

10/1997–09/2001, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska), Uniwersytet Łódzki, Pilarskiego 14/16, Łódź, doktorant.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl pięciu publikacji naukowych z lat 2006-2014 (Tabela 1), opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports pod wspólnym tytułem: *Elementy patomechanizmów i podejścia terapeutyczne w chorobach neurodegeneracyjnych człowieka wywołanych ekspansjami sekwencji mikrosatelitarnych*. Sumaryczny impact factor (zgodny z rokiem opublikowania) tych pozycji wynosi 31.78, liczba punktów MNiSzW to 185, zaś liczba cytowań wg. bazy Web of Science (do dnia złożenia wniosku) wynosi 139. W czterech publikacjach jestem pierwszym autorem, a w jednej z nich ponadto autorem korespondencyjnym.

Tabela 1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

Lp.	Dane bibliograficzne	Impact factor	Punkty MNiSzW	Liczba cytowań wg. Web of Science
1	<u>M. Wojciechowska</u> , M. Napierala, J. E. Larson, and R. D. Wells. 2006. <i>Non-B DNA Conformations Formed by Long Repeating Tracts of Myotonic Dystrophy Type 1, Myotonic Dystrophy Type 2, and Friedreich's ataxia Genes, not the Sequences per se, Promote Mutagenesis in Flanking Regions</i> . Journal of Biological Chemistry 281: 24531-24543.	5.808	35	18
2	<u>M. Wojciechowska</u> and W. J. Krzyzosiak. 2011. <i>Cellular Toxicity of Expanded RNA Repeats: Focus on RNA Foci</i> . Human Molecular Genetics 20(19):3811-21.	7.636	40	61
3	A. Mykowska, K. Sobczak, <u>M. Wojciechowska</u> , P. Kozłowski and W. J. Krzyzosiak. 2011. <i>CAG Repeats Mimic CUG Repeats in the Misregulation of Alternative Splicing</i> . Nucleic Acids Research 39(20):8938-51.	8.026	40	45
4	<u>M. Wojciechowska</u> and W. J. Krzyzosiak. 2011. <i>CAG Repeat RNA as an Auxiliary Toxic Agent in Polyglutamine Disorders</i> . RNA Biology 8(4):565-71.	4.933	35	13
5	<u>M. Wojciechowska</u> , K. Taylor, K. Sobczak, M. Napierala and W. J. Krzyzosiak. 2014. <i>Small Molecule Kinase Inhibitors Alleviate Different Molecular Features of Myotonic Dystrophy Type 1</i> . RNA Biology 11(6):742-754.	5.377	35	2

5. OMÓWIENIE INDYWIDUALNEGO WKŁADU WNIOSKODAWCY W PUBLIKACJE STANOWIĄCE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

M. Wojciechowska, M. Napierala, J. E. Larson, and R. D. Wells. 2006. *Non-B DNA Conformations Formed by Long Repeating Tracts of Myotonic Dystrophy Type 1, Myotonic Dystrophy Type 2, and Friedreich's ataxia Genes, not the Sequences per se, Promote Mutagenesis in Flanking Regions*. Journal of Biological Chemistry 281(34): 24531-24543.

Wkład habilitanta: Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń wspólnie z autorem korespondencyjnym, wykonaniu większości eksperymentów, interpretacji wyników badań oraz napisaniu wstępnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. W ramach prac eksperymentalnych do tej publikacji wykonałam doświadczenia polegające na klonowaniu sekwencji powtórzonych w wektory ekspresyjne, ich wprowadzaniu do komórek pro- i eukariotycznych, namnażaniu i izolacji plazmidów, przygotowaniu materiału DNA do sekwencjonowania i interpretacji wyników sekwencjonowania w celu oszacowania mutagenności sekwencji powtórzonych oraz wykonaniu eksperymentów LM-PCR. Wyniki tych badań zostały przeze mnie opracowane statystycznie i przedstawione na Rycinach 1-5 i Tabelach 1-4.

Mój udział szacuję na około 60%.

M. Wojciechowska and W. J. Krzyzosiak. 2011. *Cellular Toxicity of Expanded RNA Repeats: Focus on RNA Foci*. Human Molecular Genetics 20(19): 3811-21.

Wkład habilitanta: Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu jej koncepcji wspólnie z autorem korespondencyjnym, zgromadzeniu stosownej literatury, napisaniu manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Ponadto, przygotowałam Ryciny 1 i 2 oraz sporządziłam Tabele 1-3, które stanowiły obszerny materiał suplementarny.

Mój udział w przybliżeniu szacuję na 65%.

A. Mykowska, K. Sobczak, M. Wojciechowska, P. Kozłowski and W. J. Krzyzosiak. 2011. CAG Repeats Mimic CUG Repeats in the Misregulation of Alternative Splicing. Nucleic Acids Research 39(20): 8938-51.

Wkład habilitanta: Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów mikroskopowych, polegających na identyfikacji zmutowanych transkryptów zawierających ekspansje powtórzeń CUG i CAG w ludzkich komórkach fibroblastycznych przy wykorzystaniu metody RNA FISH (Rycina 7D) oraz identyfikacji białka MBNL1 w jądrowych inkluzjach zmutowanych transkryptów za pomocą hybrydyzacji FISH połączonej z immunobarwieniem (Rycina 8A). Opracowałam i zinterpretowałam wyniki tych doświadczeń. Ponadto, brałam udział w przygotowaniu manuskryptu tej pracy i odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Przewiduję, iż mój udział wynosił około 25%.

M. Wojciechowska and W. J. Krzyzosiak. 2011. CAG Repeat RNA as an Auxiliary Toxic Agent in Polyglutamine Disorders. RNA Biology 8(4): 565-71.

Wkład habilitanta: Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu jej koncepcji wspólnie z autorem korespondencyjnym, zgromadzeniu stosownej literatury, napisaniu manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów. Ponadto, przygotowałam Ryciny 1 i 2.

Mój przewidywalny udział wynosił około 55%.

M. Wojciechowska^{*}, K. Taylor, K. Sobczak, M. Napierała, and W. J. Krzyzosiak. 2014. Small Molecule Kinase Inhibitors Alleviate Different Molecular Features of Myotonic Dystrophy Type 1. RNA Biology 11(6): 742-754.

^{*}, autor korespondencyjny

Wkład habilitanta: Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu jej koncepcji i wykonaniu całej części eksperymentalnej (z wyjątkiem filter binding assay, Rycina S-3D). Opracowałam i zinterpretowałam wyniki wszystkich badań przedstawione na Rycinach 1-7 publikacji oraz materiału suplementarnego w postaci Tabel i Rycin. Ponadto, przygotowałam całość manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów.

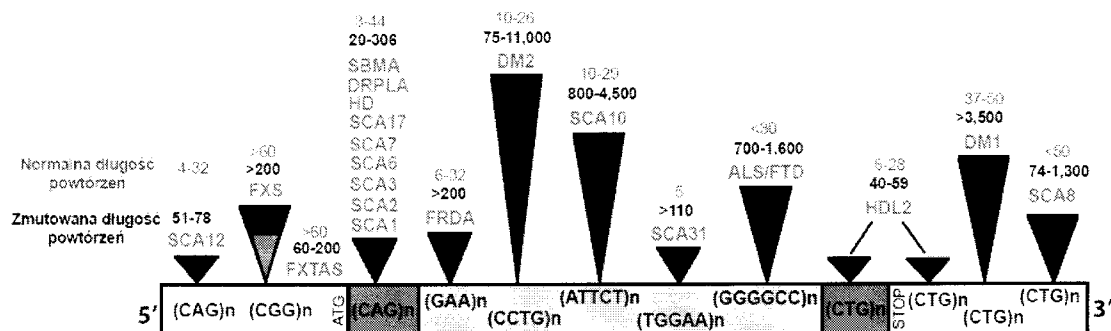
Mój udział szacuję na co najmniej 60%.

Kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe znajdują się w Załączniku nr 4, natomiast oświadczenia współautorów, określające ich indywidualny wkład w powstanie każdej pracy znajdują się w Załączniku nr 5.

6. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I WYNIKÓW PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO Z UWZGLĘDNIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Problematyka i cele badawcze

Sekwencje mikrosatelitarne, zwane krótkimi sekwencjami tandemowymi (*ang. short tandem repeats, STRs*) lub prostymi sekwencjami powtórzonymi (*ang. simple sequence repeats, SSRs*), są sekwencjami DNA złożonymi z wielokrotnie powtórzonych motywów o długości 1-6 nukleotydów. Sekwencje te znajdujące się zarówno w kodujących jak i niekodujących częściach genów, a ich charakterystyczną cechą jest wysoka niestabilność genetyczna, prowadząca do polimorfizmu zarówno sekwencji jak i długości (1). Nadmierny wzrost liczby powtórzeń (ekspansje) takich sekwencji jak: trójnukleotydowe (CTG, CAG, CGG, GAA), tetranukleotydowe (CCTG), pentanukleotydowe (ATTCT i TGGAA) oraz heksanukleotydowe (GGGGCC) jest przyczyną około 40 chorób neurodegeneracyjnych człowieka (Ryc. 1). Są wśród nich dystrofia miotoniczna typu pierwszego (DM1) i drugiego (DM2), ataksja Friedreich'a (FRDA) oraz liczna grupa chorób



Rycina 1. Sekwencje mikrosatelitarne i wywołane nimi choroby neurodegeneracyjne człowieka. Białe obszary reprezentują 5' i 3' UTR-y, zielone - eksony, żółty - intron.

poliglutaminowych, na przykład choroba Huntingtona (HD) i ataksje rdzeniowo-mózdkowe (SCAs) (2). W chorobach tych, obecność wydłużonych sekwencji mikrosatelitarnych w określonych genach może prowadzić do (i) powstawania toksycznych transkryptów i/lub produktów białkowych, (ii) zatrzymywania zmutowanych transkryptów na terenie jądra komórkowego i do (iii) represji transkrypcji oraz wyciszenia ekspresji zmutowanych genów.

Pomimo iż, molekularne podłoże chorób wywołanych ekspansjami sekwencji mikrosatelitarnych pozostaje w znacznym stopniu niewyjaśnione, badania wskazują, że formowanie struktur drugorzędowych przez te powtórzenia w DNA i transkryptach może odgrywać istotną rolę w procesie patogenezy. Wykazano, że tworzenie się przejściowych, lecz stabilnych struktur (*ang. non-B DNA structures*) takich jak: spinki (*ang. hairpin*), tripleksy (*ang. triplex*) i G-kwadruksy (*ang. G-quadruplex*) jest źródłem genetycznej niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych. Ponadto, udowodniono że obecność struktur typu *hairpin* w RNA nadaje toksycznych właściwości zmutowanym transkryptom i odgrywa kluczową rolę w ich patogennych oddziaływaniach z białkami zaangażowanymi w metabolizm RNA (3). Od wczesnych lat 90-tych XX wieku trwają intensywne badania nad wyjaśnieniem podłoża molekularnego chorób wywołanych niestabilnością sekwencji mikrosatelitarnych. Dotyczą one molekularnej charakterystyki tych powtórzeń, jak również prób wytłumaczenia skutków ich obecności na genom,

transkryptom i proteom komórek z mutacjami. Obecnie wiadomo, że ekspansje sekwencji mikrosatelitarnych prowadzą do uruchomienia skomplikowanych mechanizmów patogenez, wśród których są: nabycie toksycznych właściwości przez zmutowane transkrypty (*ang. RNA gain-of-function*) lub białka (*ang. protein gain-of-function*), dwukierunkowa transkrypcja (*ang. bidirectional transcription*), translacja niezależna od kodonu START (*ang. non-ATG RAN translation*), oraz deregulacja ekspresji krótkich niekodujących cząsteczek RNA (*ang. micro RNAs*) (2; 4; 5). Jednakże pomimo wieloletnich wysiłków wielu laboratoriów na całym świecie, toksyczność sekwencji powtórzonych pozostaje nadal zagadką, a wywołane nimi choroby są ciągle nieuleczalne. Dlatego dalsze badania nad poznaniem patomechanizmów tych chorób są istotne i mogą pomóc w znalezieniu skutecznych narzędzi terapeutycznych.

Przedstawiony cykl pięciu publikacji, stanowiących osiągnięcie naukowe, opisuje wyniki moich badań, dotyczących aspektów związanych z mutagennością sekwencji mikrosatelitarnych, jak również ich toksycznością na poziomie transkryptów oraz prób poszukiwań skutecznych form terapii dla osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne związane z niestabilnością genetyczną prostych sekwencji powtórzonych. Badania nad tymi zagadnieniami są kontynuowane, w nadziei na polepszenie jakości i długości życia pacjentów na całym świecie.

OGÓLNE CELE BADAŃ: *Badanie mechanizmów toksyczności wydłużonych powtórzeń mikrosatelitarnych w DNA i transkryptach oraz próby poszukiwań skutecznych form terapii w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych człowieka.*

Cel szczegółowy 1: *Badanie mutagennego potencjału powtórzeń CTG, CCTG i GAA, których ekspansje związane są odpowiednio z rozwojem chorób DM1, DM2 i FRDA.*

Formowanie się drugorzędowych struktur typu *non-B DNA* przez wydłużone powtórzenia tandemowe w DNA jest uznawane za źródło ich genetycznej niestabilności (6; 7). Procesy replikacji i transkrypcji ułatwiają tworzenie się takich struktur przez sekwencje mikrosatelitarne i łącznie z niektórymi systemami naprawy DNA m.in., po-replikacyjnym systemem MMR (*ang. mismatch repair system*) i sprzężonym z transkrypcją systemem NER (*ang. nucleotide excision repair*), zwiększają ryzyko destabilizacji tych struktur będącej źródłem zmian długości wydłużonych sekwencji powtórzonych (8; 9). Badaniem mechanizmów genetycznej niestabilności wydłużonych sekwencji tandemowych związanych z chorobami neurologicznymi człowieka od wczesnych lat 90-tych ubiegłego wieku zajmował się zespół Profesora Roberta Wellsa z Houston (USA), do którego dołączyłam w 2002 roku. Podczas mojego stażu podoktorskiego zostałam zaangażowana w nowy kierunek badań, dotyczący zagadnienia mutagennych właściwości sekwencji powtórzonych w DNA, charakteryzujących się niestabilnością genetyczną i zdolnością do formowania struktur typu *non-B DNA*. Ten nurt zapoczątkowały badania prowadzone przez Dr Albino Bacolla (10; 11), które dotyczyły weryfikacji hipotezy, że zmienność genetyczna w genie *PKD1*, który jest zmutowany u około 85% pacjentów z wielotorbielowatością nerek (*ang. autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD*), jest wynikiem niestabilności genetycznej 2.5-kbp intronowej sekwencji poli(purynowo-pyrimidynowej) (*ang. poly(R•Y)*) w obrębie tego genu, która może tworzyć rozmaite struktury typu *non-B DNA*.

Przedmiotem moich badań, związanych z mutagennością sekwencji mikrosatelitarnych, były powtórzenia CTG, GAA i CCTG. Początkowo, prowadziłam badania z wykorzystaniem komórek różnych szczepów bakterii, do których wprowadzałam wektory ekspresyjne zawierające sekwencje powtórzone. Prowadząc rekultywację bakterii zawierających takie plazmidy zauważyłam, iż obecności wydłużonych powtórzeń towarzyszyły mutacje (delecje i inwersje) w sekwencjach DNA je otaczających, które nie występowały przy krótkich sekwencjach oraz przy ich braku. Częstość mutacji zależała nie tylko od długości powtórzeń, ale również od ich orientacji względem miejsca inicjacji replikacji, od transkrypcji, obecności interrupcji zaburzających ciągłość sekwencji powtórzonych oraz ich typu. Znacznie wyższym potencjałem mutagennym charakteryzowały się powtórzenia CTG i CCTG niż GAA (12). Te wyniki pozwoliły mi wysunąć hipotezę, iż właściwości mutagenne powtórzeń mikrosatelitarnych zostają uaktywnione w warunkach komórkowych sprzyjających formowaniu się struktur drugorzędowych DNA. Wyniki badań tej hipotezy zostały opublikowane w *Journal of Biological Chemistry* pt. „*Non-B DNA Conformations Formed by Long Repeating Tracts of Myotonic Dystrophy Type 1, Myotonic Dystrophy Type 2, and Friedreich's ataxia Genes, not the Sequences per se, Promote Mutagenesis in Flanking Regions*” (13) i są elementem osiągnięcia naukowego.

W celu wykazania roli struktury DNA w procesie mutagenezy sekwencji mikrosatelitarnych zastosowałam kilka strategii badawczych. Po pierwsze, do badań wykorzystałam zarówno sekwencje powtórzone, które mają zdolność tworzenia drugorzędowych struktur *non-B* DNA (CTG, GAA i CCTG) (6) jak i te, które ich nie tworzą (CAA) (14). Po drugie, wybrane przeze mnie szczepy bakteryjne umożliwiły zbadanie, czy poziom superskręcenia kolistych cząsteczek plazmidowego DNA (*ang. negative supercoiling density*) wpływa na mutagenne właściwości sekwencji powtórzonych. W tym celu wykorzystałam komórki z funkcjonalną (szczep JTT1), bądź zmutowaną formą jednej z dwóch topoizomeraz DNA: topoizomerazy I (*topA*) (szczep RS2) oraz gyrazy (*gyrB*) (szczep SD7), zmieniających liczbę opleceń cząsteczek DNA, wpływając na ich negatywne superskręty. Jak wykazały wcześniejsze badania, zmiany topologii DNA mają wpływ na powstawanie i stabilność lokalnych struktur DNA w obrębie wydłużonych sekwencji powtórzonych (11; 15). Ich formowanie aktywuje systemy naprawy DNA wycinające wypętlenia, a powstające w ten sposób dwuniciowe pęknięcia (*ang. double-strand breaks*) są następnie naprawiane na drodze rekombinacji homologicznej. Wiadomo, że w procesie rekombinacji homologicznej zachodzącym u bakterii uczestniczy m.in. białko SbcC (16). Dlatego w moich badaniach wykorzystałam komórki bakteryjne posiadające aktywną (szczep AB1157) i zmutowaną (szczep PF2070) nukleazę SbcC. Po trzecie, wykorzystanie ssaczycy linii komórkowych (COS-7, HEK-293 i CV-1) umożliwiło mi przeprowadzenie eksperymentów w warunkach, gdy badane sekwencje powtórzone ulegały zarówno replikacji jak i transkrypcji, bądź gdy zachodził tylko jeden z tych procesów. Wariant eksperymentalny z zahamowaną transkrypcją był możliwy dzięki wprowadzeniu mutacji do wykorzystywanego przeze mnie w komórkach eukariotycznych wektora ekspresyjnego pEGFP-C1 w postaci delecji w sekwencji promotora CMV. Natomiast eksperymenty z nieaktywnym procesem replikacji były możliwe z wykorzystaniem linii komórek CV-1, w której nie dochodzi do replikacji plazmidów z miejscem inicjacji replikacji typu SV40. Takie warunki eksperymentalne umożliwiły mi zbadanie, czy procesy replikacji i transkrypcji, ułatwiające powstawanie lokalnych struktur drugorzędowych *non-B* DNA w obrębie sekwencji powtórzonych, indukują mutacje w obszarach je otaczających.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów wysunęłam następujące wnioski: (i) jedynie wydłużone sekwencje powtórzone, które mogą tworzyć struktury typu *non-B* DNA, nie zaś ich

krótkie odpowiedniki, indukują mutacje w obszarach DNA otaczających te powtórzenia; (ii) warunki komórkowe, podwyższające poziom negatywnego superskręcenia DNA, sprzyjającego powstawaniu struktur *non-B DNA*, wzmacniają mutageny potencjał powtórzeń CTG, GAA i CCTG; (iii) inaktywacja nukleazy SbcC rozpoznającej i wycinającej wypełnienia DNA typu *hairpin* osłabia mutagenzę w sekwencjach DNA flankujących powtórzenia.

Osiągnięcia:

1. Badania do tej publikacji ugruntowały istotny wpływ struktury DNA tworzonej w obrębie wydłużonych tandemowych sekwencji DNA na niestabilność w regionach otaczających powtórzenia i pokazały mutageny charakter ekspansji powtórzeń trój- i tetranukleotydowych związanych z DM1, DM2 oraz FRDA, zarówno w komórkach bakteryjnych jak i w ssaczych.
2. Wyniki tych badań są istotne, ponieważ wykazały nowe toksyczne właściwości wydłużonych sekwencji mikrosatelitarnych w DNA, będących przyczyną chorób neurodegeneracyjnych człowieka.
3. Te wyniki mogą pomóc w ustaleniu udziału sekwencji powtórzonych w inicjacji i rozwoju chorób genetycznych człowieka.

Możliwe zastosowanie:

1. Dalsza identyfikacja i charakterystyka mutacji w regionach DNA flankujących powtórzenia.
2. Badanie mechanizmów patogenezy chorób związanych z niestabilnością sekwencji powtórzonych.

Cel szczegółowy 2: *Toksyczność transkryptów zawierających ekspansje powtórzeń CUG i CAG w patogenezie DM1 oraz HD i SCA3.*

Ekspansje powtórzeń mikrosatelitarnych (Ryc. 1) prowadzą do uruchomienia złożonych mechanizmów patogenezy, wśród których jest nabycie toksycznych właściwości przez zmutowane transkrypty (*ang. toxic RNA gain-of-function*). Badania molekularnych podstaw tego mechanizmu zapoczątkowały we wczesnych latach 90-tych poprzedniego wieku prace nad patogenezą DM1 (17). Choroba ta, wywołana jest obecnością wydłużonych powtórzeń CUG w regionie 3'UTR genu *DMPK* i w związku z tym, jej patomechanizm jest utożsamiany z toksycznością zmutowanych transkryptów. Ich ekspresja objawia się tworzeniem jądrowych inkluzji RNA (*ang. ^{mut}foci*), będących efektem zaburzonego eksportu i patogennych oddziaływań z białkami metabolizmu RNA. Do chwili obecnej, jądrowe inkluzje RNA zawierające zmutowane transkrypty zostały zidentyfikowane w wielu chorobach neurodegeneracyjnych człowieka. Są wśród nich zarówno choroby związane z ekspansjami sekwencji niekodujących np. DM2, FXTAS, ASL/FTD, HDL2, SCA10 oraz SCA31, jak i kodujących np. SCA3 i HD (Ryc. 1). Toksyczność zmutowanych transkryptów jest wiązana z faktem, iż obecne w nich wydłużone sekwencje mikrosatelitarne mają zdolność do formowania struktur drugorzędowych, takich jak *hairpiny* lub kwadrupleksy. Zmieniają one powinowactwo tych transkryptów do białek komórkowych, co stanowi o istocie ich toksyczności (3). Tę tematykę badań rozpoczęłam w 2006 roku podczas mojego stażu podoktorskiego w laboratorium Profesora Jacka Puymirata w Laval University, Quebec City (Kanada) i kontynuowałam ją w latach 2009-2014 w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, pracując jako adiunkt w laboratorium Profesora Włodzimierza J. Krzyżosiaka. W ramach realizowanych projektów

badawczych tego laboratorium, byłam zaangażowana w eksperymenty mające wyjaśnić czy transkrypty zawierające ekspansje powtórzeń CAG wykazują właściwości toksyczne (podobne do tych, jakie charakteryzują powtórzenia CUG) i odgrywają rolę w patogenezie chorób poliglutaminowych takich jak HD i SCA3. Wynikiem realizacji tych celów badawczych były, między innymi, trzy publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe. Są to: „*Toxicity of Expanded RNA Repeats: Focus on RNA Foci*” (2), „*CAG Repeats Mimic CUG Repeats in the Misregulation of Alternative Splicing*” (18) oraz „*CAG Repeat RNA as an Auxiliary Toxic Agent in Polyglutamine Disorders*” (19).

W pierwszej z tych publikacji przedstawiłam charakterystykę jądrowych inkluzji RNA w chorobach neurodegeneracyjnych człowieka. Praca ta stanowi podsumowanie wyników badań wielu laboratoriów z ponad dwudziestu ostatnich lat, opisujących różne aspekty toksyczności zmutowanych transkryptów. Jak dotychczas wykazano, ekspresja transkryptów zawierających wydłużone powtórzenia CUG, CCUG, CGG, AUUCU, UGGAA i GGGGCC oraz CAG zaangażowane odpowiednio w DM1, DM2, FXTAS, SCA10, SCA31, ALS/FTD oraz HD i SCA3, jest warunkiem koniecznym i wystarczającym do tworzenia się jądrowych *foci*. Ich obecność towarzyszy inicjacji i rozwojowi patogenezy wymienionych chorób. Co ciekawe, jak wykazały badania z wykorzystaniem komórek DM1 i organizmów modelowych tej choroby, obniżanie ilości jądrowych *mutfoci* za pomocą narzędzi interferencji RNA lub niskocząsteczkowych związków chemicznych oddziałujących specyficznie z powtórzeniami CUG w transkryptach, powodowało poprawę fenotypu DM1. Było to związane z uwalnianiem białek zasocjowanych z inkluzjami RNA oraz poprawą zaburzeń alternatywnego splicingu, będącego nieodłącznym elementem toksyczności zmutowanych transkryptów CUG (20-23).

Jądrowe *foci* złożone ze zmutowanych transkryptów są obecne zarówno w tkankach i w hodowanych *in vitro* komórkach osobników chorych, jak również w organizmach transgenicznych reprezentujących eksperymentalne modele tych chorób. Natomiast nie są one wykrywane w materiale biologicznym od osobników zdrowych. Charakterystycznymi cechami tych agregatów jest ich liczebność, morfologia oraz zawartość białek, które zależą od typu tkanki i poziomu ekspresji transkryptów zawierających ekspansje sekwencji mikrosatelitarnych. Na przykład, w mięśniach szkieletowych pacjentów z DM1 i DM2 znajdowane są mniej liczne i większe inkluzje RNA niż w hodowanych mioblastach lub fibroblastach z taką samą ilością powtórzeń (2). Również długość powtórzeń mikrosatelitarnych determinuje liczbę *mutfoci* przypadającą na jądro komórkowe jak i frakcję jąder *foci*-pozytywnych w badanym materiale. Jak wykazano w tkankach z mięśni szkieletowych od pacjentów DM1, 60% jąder posiadało inkluzje RNA ze średnią liczbą *foci* 1.18, gdy liczba powtórzeń CUG wynosiła 165-430; natomiast, przy długości 1250-1900, ponad 90% jąder było *foci*-pozytywnych ze średnio 3 inkluzjami na jądro komórkowe (24). Pomimo, iż występowanie rybonukleoproteinowych agregatów zawierających zmutowane transkrypty sekwencji mikrosatelitarnych jest niedłącznym elementem patogenezy wielu chorób neurodegeneracyjnych człowieka, kwestią sporną pozostaje fakt, czy *mutfoci* są przyczyną patogenezy czy zjawiskiem towarzyszącym wielu symptomom chorobotwórczym (*ang. epiphenomena*). Ich toksyczność jest obecnie wiązana z faktem, iż są one źródłem zaburzeń alternatywnego splicingu, gdyż prowadzą do sekwestracji białek z rodziny *muscleblind*, oraz zmian w poziomach ekspresji i aktywności białek z rodziny *CELF*. Jednakże, ich obecność wywołuje również tymczasową i/lub stałą immobilizację wielu innych białek, składającą się na złożoność patomechanizmu chorób wywołanych ekspansjami sekwencji tandemowych. Istnieje więc

konieczność dalszych badań zmierzających do określenia, czy te jądrowe struktury są przyczyną czy wynikiem patogenezы chorób neurodegeneracyjnych człowieka.

Do roku 2005, toksyczność transkryptów przypisywano jedynie patogenezы chorób wywołanych ekspansjami sekwencji niekodujących takich jak CUG i CCUG w odpowiednio DM1 i DM2 (Ryc. 1). Natomiast, choroby poliglutaminowe np. HD i SCA3, związane z wydłużaniem się egzonowych sekwencji powtórzonych CAG utożsamiano z toksycznością zmutowanych białek poliglutaminowych (polyGln) (25). Zmiana tego paradygmatu nastąpiła na przełomie lat 2005–2011, kiedy powstało kilka prac eksperymentalnych zwracających uwagę świata naukowego na toksyczność zmutowanych transkryptów zawierających ekspansje powtórzeń CAG i ich udział w patogenezы chorób poliglutaminowych (18; 26-30). Podsumowanie tych prac znalazło miejsce w publikacji przeglądowej mojego autorstwa zatytułowanej „*CAG Repeat RNA as an Auxiliary Toxic Agent in Polyglutamine Disorders*” (19), natomiast mój wkład eksperymentalny w badania związane z wyjaśnianiem nowej roli zmutowanych transkryptów został zamieszczony w publikacji zatytułowanej „*CAG Repeats Mimic CUG Repeats in the Misregulation of Alternative Splicing*” (18).

Wyniki badań, które zainicjowały prace wielu laboratoriów związane z wyjaśnianiem udziału zmutowanych transkryptów w patomechanizmie chorób poliglutaminowych dowodziły, iż obecność wydłużonych powtórzeń CAG w transkryptach ulegających egzogennej ekspresji w komórkach COSM6 skutkuje formowaniem jądrowych *foci* RNA, z którymi kolokalizuje białko MBNL1 (26). Pomimo występowania tych kluczowych elementów mechanizmu *toxic RNA gain-of-function*, w badanym systemie nie obserwowano zmian splicingowych analizowanych cząsteczek mRNA (cTNT i INSR), które były wykrywane w przypadku transkryptów z wydłużonymi powtórzeniami CUG. Dalszych dowodów na szkodliwość komórkową zmutowanych transkryptów CAG dostarczyły prace eksperymentalne z wykorzystaniem organizmów transgenicznych i komórek pochodzących od pacjentów z HD i SCA3. W publikacjach, w których wykorzystano zwierzęta transgeniczne (muszki owocowe, myszy i niepasżytnicze nicienie) do ekspresji powtórzeń CAG ulegających lub nieulegających translacji, wykazano iż obecność zmutowanych transkryptów CAG jest wystarczająca, aby wywołać serię patogennych zmian w morfologii i funkcjonowaniu tych organizmów. Co ciekawe, obecność zmutowanego białka polyGln nie powodowała pogorszenia się symptomów patogenezы (27; 29; 30). Istotnych wyników dostarczyły również badania z wykorzystaniem transgenicznych muszek *Drosophila*, będących modelem eksperymentalnym choroby SCA3, do wygenerowania których wykorzystano wydłużone powtórzenia CAG niezawierające interrupcji lub takie, których ciągłość została zaburzona obecnością trójek nukleotydów innych niż CAG (27). Chociaż w obu systemach eksperymentalnych obserwowano formowanie rybonukleoproteinowych *mutfoci* i zaburzoną morfologię oczu transgenicznych much, model w którym powtórzenia CAG nie posiadały interrupcji cechował się znacznie ostrzejszą formą przebiegu patogenezы, zakończoną przedwczesną śmiercią tych organizmów na skutek zaburzeń neuronalnych. Ten wynik umocnił rolę struktury drugorzędowej RNA w mechanizmie toksyczności transkryptów, bowiem jak wykazały wcześniejsze badania *in vitro* obecność interrupcji w sekwencji wydłużonych powtórzeń mikrosatelitarnych zaburza formowanie struktur typu *hairpin* (31-33), a tym samym osłabia patogenne oddziaływania z białkiem MBNL1. W konsekwencji takich zmian strukturalnych, toksyczność transkryptów zostaje znacznie osłabiona.

Jednakże znaczących dowodów na to, iż zmutowane transkrypty CAG indukują zmiany w alternatywnym splicingu dostarczyła dopiero publikacja zatytułowana „*CAG Repeats Mimic CUG Repeats in the Misregulation of Alternative Splicing*” (18). Przedstawiliśmy w niej dowody na to, że

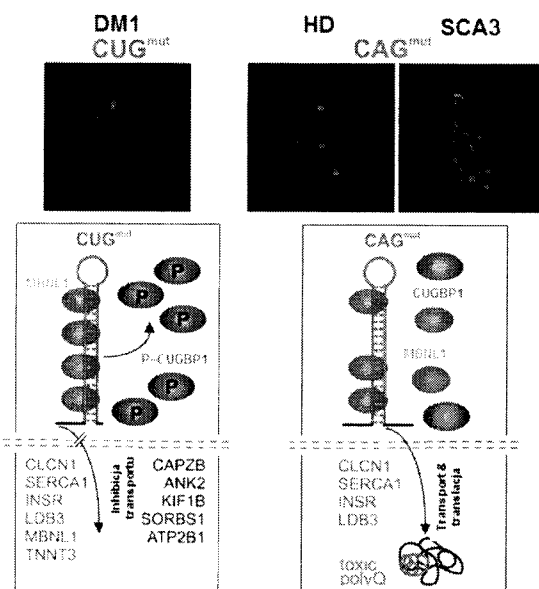
ekspansje powtórzeń CAG prowadzą do zaburzeń metabolizmu zmutowanych transkryptów i wywołują w ludzkich komórkach zmiany podobne do tych, jakie są konsekwencją ekspresji transkryptów z CUG (Ryc. 2). Do badań wykorzystaliśmy kilka linii komórkowych pochodzących od pacjentów z HD, SCA3 i DM1, jak również stworzone przez nas linie komórkowe ze stabilną ekspresją powtórzeń CAG, które ulegały lub nie ulegały translacji. Takie modele badawcze posłużyły do identyfikacji elementów mechanizmu zwanego *toxic RNA gain-of-function* i odpowiedzi na następujące pytania: (i) czy transkrypty z ekspansjami powtórzeń CAG tworzą jądrowe inkluzje w ludzkich komórkach i czy ich formowanie zależy od długości powtórzeń (ii) czy białko MBNL1 kolokalizuje z inkluzjami RNA, oraz (iii) czy formowanie rybonukleoproteinowych *foci* CAG prowadzi do zaburzeń alternatywnego splicingu w warunkach niezależnych od obecności białka polyGln. Analiza porównawcza uzyskanych wyników wykazała, że:

(a) Zarówno egzogenna ekspresja wydłużonych sekwencji CAG (74 i 200 powtórzeń) nieulegających translacji oraz endogenna (44 i 69 powtórzeń) ulegających translacji powodowała w ludzkich komórkach tworzenie się *mut* *foci* RNA i kolokalizację białka MBNL1. Takie zmiany nie były obserwowane w przypadku krótszych sekwencji CAG (5 i 30 powtórzeń). *Analogiczna zależność formowania inkluzji od długości powtórzeń dotyczy sekwencji CUG.*

(b) Komórki, w których dochodziło do tworzenia rybonukleoproteinowych inkluzji charakteryzowały się zmianami splicingowymi kilku cząsteczek mRNA, których splicing jest regulowany przez białko MBNL1 (np. INSR, CLCN1, SERCA1, LDB3 i MBNL1). Częściową poprawę tych zaburzeń uzyskaliśmy przeprowadzając nadekspresję białka MBNL1 w tych komórkach. *Analogiczne zmiany splicingowe zależne od niedoboru MBNL1 są charakterystyczne dla powtórzeń CUG.*

(c) Zmiany splicingowe występowały niezależnie od obecności zmutowanego białka polyGln i były wykrywane zarówno w komórkach z egzogenną, jak i endogenną ekspresją zmutowanych transkryptów CAG. Ponadto, zaburzenia te nie były wynikiem obecności transkryptów antysensownych CUG, bowiem jak wykazały wyniki testu MLPA (*ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) poziom ich ekspresji był śladowy (~2%) w porównaniu z transkryptami CAG.

Reasumując wyniki badań dotyczące toksyczności transkryptów zawierających ekspansje powtórzeń CAG należy stwierdzić, iż fundamentalne elementy mechanizmu *toxic RNA gain-of-function* są obecne w komórkach, w których dochodzi do ekspresji powtórzeń CAG niezależnie od systemu badań i złożoności organizmów modelowych (Ryc. 2). Wyniki tych badań pokazały że toksyczność zmutowanych



Rycina 2. Elementy toksyczności zmutowanych transkryptów zawierających ekspansje powtórzeń CUG i CAG w DM1, HD i SCA3. Zmutowane transkrypty tworzą w jądrze komórkowym *foci* RNA (górne panele). Ich obecność prowadzi m.in. do sekwestracji MBNL1 i zaburzeń alternatywnego splicingu szeregu genów (dolne panele)

transkryptów CAG może odgrywać rolę w patogenezie chorób poliglutaminowych człowieka. Jednocześnie, zwróciły uwagę świata naukowego na potrzebę podejmowania prób terapeutycznych interwencji skierowanych również na zmutowany transkrypt, nie zaś jedynie jak dotychczas na jego polyGln produkt białkowy. Takie podejścia mogą w przyszłości doprowadzić do opracowania narzędzi terapeutycznych, skutecznych w osłabianiu patomechanizmu chorób poliglutaminowych człowieka, które są obecnie nieuleczalne.

Osiągnięcia:

1. Wykazanie po raz pierwszy, że endogenne transkrypty zawierające wydłużone powtórzenia CAG w genach ataksyny 3 (*ATXN3*) i huntingtyny (*HTT*) tworzą w komórkach pochodzących od pacjentów SCA3 i HD jądrowe *foci*, z którymi kolokalizuje białko splicingowe MBNL1.
2. Wykazanie po raz pierwszy, że toksyczność zmutowanych transkryptów zawierających wydłużone powtórzenia CAG dotyczy również zaburzeń w alternatywnym splicingu kilku cząsteczek mRNA regulowanych przez białko MBNL1.
3. Wykazanie w sposób kompleksowy na różnych modelach badawczych, że zmutowane transkrypty CAG wykazują właściwości toksyczne podobne do tych, jakie charakteryzują powtórzenia CUG.

Możliwe zastosowanie:

1. Dalsza charakterystyka elementów toksyczności transkryptów z mutacjami powtórzeń CAG i badanie ich wpływu na patogenezę chorób poliglutaminowych człowieka.
2. Opracowanie nowych narzędzi terapeutycznych z zastosowaniem reagentów interferujących ze zmutowanymi transkryptami CAG.

Cel szczegółowy 3: *Próby zastosowania podejść terapeutycznych z wykorzystaniem niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz białkowych w celu złagodzenia patomechanizmu DM1.*

Dotychczasowe podejścia terapeutyczne w DM1 były skierowane na zmutowane powtórzenia CUG, aby obniżyć wewnątrzkomórkowy poziom transkryptów *DMPK* i/lub przeciwdziałać ich patogennym oddziaływaniom z białkami komórkowymi, głównie z MBNL1. W tych podejściach wykorzystywano antysensowe oligonukleotydy CAG, oraz niskocząsteczkowe związki chemiczne oddziałujące specyficznie z powtórzeniami CUG (34). Jednakże, pomimo obiecujących wyników wstępnych w postaci złagodzenia pewnych symptomów patomechanizmu DM1, nie udało się dotychczas opracować skutecznej formy terapii i choroba ta pozostaje nadal nieuleczalna.

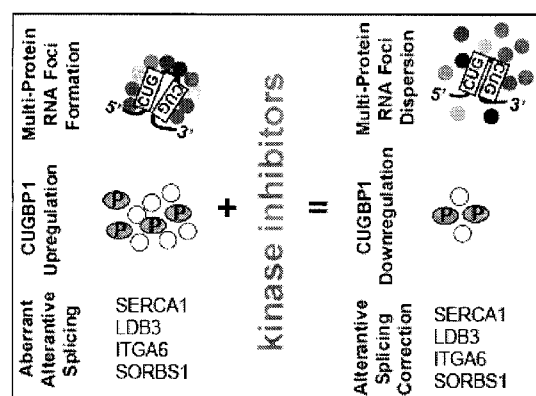
W ostatnich latach, w eksperymentach skierowanych na poszukiwanie skutecznych narzędzi terapeutycznych w DM1 zaczęto wykorzystywać niskocząsteczkowe inhibitory kinaz białkowych. Takie podejście uzasadnia fakt, iż patogenezę DM1 charakteryzują zmiany w poziomie ekspresji i aktywności kinaz białkowych, jak również po-translacyjnej fosforylacji wielu białek, niewykrywane w komórkach osobników zdrowych (35-37). Nieprawidłowa aktywacja kinaz jest ostatnio sugerowana jako nowy patomechanizm DM1, który może pomóc w wyjaśnieniu złożoności symptomów tej choroby. To zagadnienie staje się istotne dla rozwijania nowych podejść terapeutycznych, ponieważ jak wskazują najnowsze wyniki eksperymentalne, chemiczna inhibicja kinaz białkowych w modelach komórkowych i organizmach transgenicznym DM1 łagodzi pewne symptomy molekularne DM1 (35; 38-40). Tematykę związaną z wykorzystaniem

niskocząsteczkowych związków chemicznych w badaniach patomechanizmu dystrofii miotonicznej rozpoczęłam w 2008 podczas stażu podoktorskiego w MD Anderson Cancer Center w Houston (USA) i kontynuuję ją w Instytucie Chemii Bioorganicznej w Poznaniu. Początkowo, prowadziłam badania z wykorzystaniem organizmów transgenicznych DM1 i DM2 (myszy i muszki owocowe), które traktowałam związkami chemicznymi będącymi inhibitorami białek stresu komórkowego wywołanego zaburzeniami w funkcjonowaniu szlaku metabolicznego retikulum endoplazmatycznego (*ang. ER stress*) oraz inhibitorami kaspaz. Takie podejścia eksperymentalne w owym czasie uzasadniały wyniki badań wskazujące na to, że w komórkach DM1 i DM2 zarówno *ER stress* jak i apoptoza są indukowane pod wpływem ekspresji zmutowanych transkryptów CUG i CCUG. Rezultaty moich analiz doprowadziły do wyselekcjonowania związku chemicznego o nazwie C16, wykazującego potencjalne właściwości terapeutyczne w dystrofii miotonicznej. Jak wiadomo, związek ten działa inhibując na fosforylację białka PKR i innych kinaz, przeciwdziałając ich aktywności (41; 42). Interesujący wydaje się fakt, że pod wpływem tego niskocząsteczkowego inhibitora obserwowałam pewną poprawę fenotypu DM. Wyniki tych badań prezentowałam kilkakrotnie na międzynarodowych konferencjach naukowych (postery konferencyjne, H iii-vii). Po powrocie do Polski, kontynuowałam tę tematykę badań na systemach modelowych DM1. Wynikiem tych prac jest publikacja zatytułowana "*Small Molecule Kinase Inhibitors Alleviate Different Molecular Features of Myotonic Dystrophy Type, 1*" w której przedstawiłam charakterystykę zmian w komórkach DM1 po zastosowaniu dwóch niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz.

Celem tej pracy było zbadanie czy fenotyp molekularny DM1 może ulec poprawie pod wpływem inhibitorów kinaz białkowych C16 oraz C51 (41-43). Są to związki chemiczne oddziałujące z kinazami w sposób zależny od ATP (*ang. ATP-site-specific binding inhibitors*), blokując ich właściwości fosforylacyjne *in vitro* i *in vivo*.

Co istotne, C16 wykazuje ponadto właściwości neuroprotektoryjne, jak wykazano na modelach badawczych chorób neurologicznych człowieka np. choroby Alzheimera (42; 44-46). Wyniki moich badań wykazały nowe właściwości C16 i C51, które mogą zostać wykorzystane w leczeniu chorych na DM1 (39). Do badań wykorzystałam linie komórkowe ludzkich fibroblastów i mioblastów, pochodzące od pacjentów DM1. Pod wpływem wyżej wymienionych inhibitorów, w komórkach DM1 dochodziło do uwalniania białka MBNL1 z jądrowych *mut*foci RNA i obniżania wewnątrzkomórkowego poziomu białka CUGBP1 (dwóch kluczowych czynników splicingowych

patogenezy DM1). Tym zmianom towarzyszyła korekta zaburzeń splicingowych wielu części mRNA zależnych zarówno od MBNL1 (np. *SERCA1*, *DMD*, *MBNL1*, *LDB3*), jak i od CUGBP1 (np. *ITGA6*, *MTMR3* and *SORBS1*) (Ryc. 3). W konsekwencji, w traktowanych komórkach DM1 obserwowałam wzór splicingowy podobny to tego, jaki występuje w komórkach osobników zdrowych. Jednakże, pomimo iż oba inhibitory powodowały zmniejszanie się liczby i wielkości jądrowych inkluzji RNA, co wykazałam wykonując reakcje hybrydyzacji RNA *in situ* i immunocytochemii dla białka MBNL1, to związki te nie przeciwdziałały tworzeniu się



Rycina 3. Łagodzenie patomechanizmu DM1 pod wpływem niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz.

rybonukleoproteinowych *mut foci*. Brak oddziaływania inhibitorów kinaz z powtórzeniami CUG potwierdziły wyniki badań z wykorzystaniem testu wiązania *in vitro* (*ang. filter binding assay*), do wykonania którego użyłam rekombinowanego białka MBNL1 i syntetycznych oligonukleotydów (CUG)₃₅. W obliczu tych wyników należy przypuścić, iż inhibitory C16 i C51 poprawiają fenotyp chorobowy DM1 bez bezpośredniego oddziaływania na zmutowane transkrypty *DMPK*. To wskazuje, że zmniejszanie się inkluzji CUG pod wpływem inhibitorów było rezultatem rozproszenia zmutowanych transkryptów w jądrze komórkowym, nie zaś ich degradacji i/lub uwalniania do cytoplazmy. Wyniki przyszłych badań w ramach nowego projektu grantowego OPUS 7, pozwolą na określenie mechanizmu działania tych związków i przybliżą nas do opracowania specyficznego podejścia terapeutycznego dla chorych na DM1 z zastosowaniem inhibitorów C16 i C51.

Podsumowując, należy stwierdzić, iż wyniki ostatnich badań z wykorzystaniem niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz są bardzo obiecujące i podkreślają potrzebę dalszej charakterystyki kinaz białkowych w celu opracowania skutecznej formy terapii dla pacjentów cierpiących na DM1.

Osiągnięcia:

1. Wykazanie, że patogeneza DM1 może zostać osłabiona pod wpływem niskocząsteczkowych związków chemicznych inhibujących właściwości fosforylacyjne kinaz białkowych.
2. Identyfikacja dwóch związków chemicznych o potencjale terapeutycznym w DM1.

Możliwe zastosowanie:

1. Badanie mechanizmu działania inhibitorów kinaz w procesie łagodzenia skutków patogenezy DM1.
2. Identyfikacja komórkowych substratów dla inhibitorów C16 i C51, w celu opracowania nowych narzędzi terapeutycznych.
3. Chemiczna modyfikacja C16 i C51, w celu zwiększenia ich specyficzności i zmniejszenia toksyczności komórkowej.

LITERATURA

1. Pumpernik D, Oblak B, Borstnik B. 2008. *Mol. Genet. Genomics* 279:53-61
2. Wojciechowska M, Krzyzosiak WJ. 2011. *Hum. Mol. Genet.* 20:3811-21
3. Goodwin M, Swanson MS. 2014. *Adv. Exp. Med. Biol.* 825:353-88
4. Wojciechowska M, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Jazurek M, Krzyzosiak WJ. 2014. *Nucleic Acids Res.* 42:11849-64
5. Batra R, Charizanis K, Swanson MS. 2010. *Hum. Mol. Genet.* 19:R77-82
6. Wells RD, Dere R, Hebert ML, Napierala M, Son LS. 2005. *Nucleic Acids Res.* 33:3785-98
7. Bacolla A, Wojciechowska M, Kosmider B, Larson JE, Wells RD. 2006. *DNA repair* 5:1161-70
8. Jaworski A, Rosche WA, Gellibolian R, Kang S, Shimizu M, et al. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92:11019-23
9. Parniewski P, Bacolla A, Jaworski A, Wells RD. 1999. *Nucleic Acids Res.* 27:616-23
10. Bacolla A, Jaworski A, Larson JE, Jakupciak JP, Chuzhanova N, et al. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:14162-7

11. Bacolla A, Jaworski A, Connors TD, Wells RD. 2001. *The Journal of biological chemistry* 276:18597-604
12. Wojciechowska M, Bacolla A, Larson JE, Wells RD. 2005. *J. Biol. Chem.* 280:941-52
13. Wojciechowska M, Napierala M, Larson JE, Wells RD. 2006. *J. Biol. Chem.* 281:24531-43
14. Richard GF, Goellner GM, McMurray CT, Haber JE. 2000. *EMBO J.* 19:2381-90
15. Napierala M, Bacolla A, Wells RD. 2005. *J. Biol. Chem.* 280:37366-76
16. Eykelenboom JK, Blackwood JK, Okely E, Leach DR. 2008. *Mol. Cell* 29:644-51
17. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, et al. 1992. *Cell* 68:799-808
18. Mykowska A, Sobczak K, Wojciechowska M, Kozłowski P, Krzyzosiak WJ. 2011. *Nucleic Acids Res.* 39:8938-51
19. Wojciechowska M, and Krzyzosiak, W.J. 2011. *RNA biology* 8:1-7
20. Sobczak K, Wheeler TM, Wang W, Thornton CA. 2013. *Mol. Ther.* 21:380-7
21. Wheeler TM, Sobczak K, Lueck JD, Osborne RJ, Lin X, et al. 2009. *Science* 325:336-9
22. Mulders SA, van den Broek WJ, Wheeler TM, Croes HJ, van Kuik-Romeijn P, et al. 2009. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:13915-20
23. Langlois MA, Lee NS, Rossi JJ, Puymirat J. 2003. *Mol. Ther.* 7:670-80
24. Botta A, Rinaldi F, Catalli C, Vergani L, Bonifazi E, et al. 2008. *J. Med. Genet.* 45:639-46
25. Orr HT, Zoghbi HY. 2007. *Annu. Rev. Neurosci.* 30:575-621
26. Ho TH, Savkur RS, Poulos MG, Mancini MA, Swanson MS, Cooper TA. 2005. *J. Cell Sci.* 118:2923-33
27. Li LB, Yu Z, Teng X, Bonini NM. 2008. *Nature* 453:1107-11
28. de Mezer M, Wojciechowska M, Napierala M, Sobczak K, Krzyzosiak WJ. 2011. *Nucleic Acids Res.* 39:3852-63
29. Wang LC, Chen KY, Pan H, Wu CC, Chen PH, et al. 2011. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:1255-67
30. Hsu RJ, Hsiao KM, Lin MJ, Li CY, Wang LC, et al. 2011. *PLoS One* 6:e16417
31. Sobczak K, Krzyzosiak WJ. 2005. *J. Biol. Chem.* 280:3898-910
32. Sobczak K, Krzyzosiak WJ. 2004. *Human mutation* 24:236-47
33. Sobczak K, Krzyzosiak WJ. 2004. *J. Biol. Chem.* 279:41563-72
34. Krzyzosiak WJ, Sobczak K, Wojciechowska M, Fiszler A, Mykowska A, Kozłowski P. 2012. *Nucleic Acids Res.* 40:11-26
35. Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, Cooper TA. 2007. *Mol. Cell* 28:68-78
36. Botta A, Malena A, Tibaldi E, Rocchi L, Loro E, et al. 2013. *Cell Death Dis.* 4:e770
37. Jones K, Wei C, Iakova P, Bugiardi E, Schneider-Gold C, et al. 2012. *J. Clin. Invest.* 122:4461-72
38. Ketley A, Chen CZ, Li X, Arya S, Robinson TE, et al. 2013. *Hum. Mol. Genet.* 23:1551-62
39. Wojciechowska M, Taylor K, Sobczak K, Napierala M, Krzyzosiak WJ. 2014. *RNA biology* 11:742-54
40. Wang GS, Kuyumcu-Martinez MN, Sarma S, Mathur N, Wehrens XH, Cooper TA. 2009. *J Clin Invest* 119:3797-806
41. Jammi NV, Whitby LR, Beal PA. 2003. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:50-7
42. Chen HM, Wang L, D'Mello SR. 2008. *Eur. J. Neurosci.* 28:2003-16
43. Bryk R, Wu K, Raimundo BC, Boardman PE, Chao P, et al. 2011. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21:4108-14
44. Zhu PJ, Huang W, Kalikulov D, Yoo JW, Placzek AN, et al. 2011. *Cell* 147:1384-96
45. Shimazawa M, Hara H. 2006. *Neurosci. Lett.* 409:192-5
46. Shimazawa M, Ito Y, Inokuchi Y, Hara H. 2007. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:3729-36

7. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH I INNYCH NIEWCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYMIONIEGO W PKT 3 ORAZ WSKAŹNIKI DOKONAŃ NAUKOWYCH.

Tabela 2. Pozostałe publikacje, niewchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

Lp.	Dane bibliograficzne	Impact factor	Punkty MNiSzW	Liczba cytowań wg. Web of Knowl.
1 [^]	H. Kuran, K. Marciniak, and <u>M. Wojciechowska</u> . 1998. <i>Nuclear DNA and NYS Protein Contents in Cotyledons of Dry and Germinating Seeds</i> . <i>Folia Morphologica</i> 57 (1): 37.	0.524	15	0
2 [^]	<u>M. Wojciechowska</u> . 2001. <i>The Symptoms of Programmed Cell Death During Plant Development</i> . <i>Postępy Biologii Komórki</i> 28 (3): 317-334.	0.203	15	0
3 [*]	<u>M. Wojciechowska</u> and M. J. Olszewska. 2003. <i>Endosperm Degradation During Seed Development of Echinocystis lobata (Cucurbitaceae) as a Manifestation of Programmed Cell Death (PCD) in Plants</i> . <i>Folia Histochemica et Cytobiologica</i> 41 (1): 41-50.	0.475	15	9
4 [*]	<u>M. Wojciechowska</u> , A. Bacolla, J. E. Larson, R. D. Wells. 2005. <i>The Myotonic Dystrophy Type 1 Triplet Repeat Sequence Induces Gross Deletions and Inversions</i> . <i>Journal of Biological Chemistry</i> 280: 941-952.	5.854	35	20
5 [*]	A. Bacolla, <u>M. Wojciechowska</u> , B. Kosmider, J. E. Larson, and R. D. Wells. 2006. <i>The Involvement of Non-B DNA Structures in Gross Chromosomal Rearrangements</i> . <i>DNA Repair</i> 5: 1161-1170.	5.868	40	55
6 [^]	A. Bacolla, <u>M. Wojciechowska</u> , B. Kosmider, J. E. Larson, and R. D. Wells. 2006. <i>Gross Rearrangements Caused by Long Triplet Repeats and Other Repeat Sequences</i> . Contribution for the book: Genetic Instabilities and Neurological Diseases , Second Edition, Elsevier, edited by Robert D. Wells and Tetsuo Ashizawa.	-	-	-
7 [*]	M. de Mezer, <u>M. Wojciechowska</u> , M. Napierala, K. Sobczak and W. J. Krzyzosiak. 2011. <i>Mutant CAG Repeats of Huntingtin Transcript Fold into Hairpin in vitro, form Nuclear foci in Cells and are Targeted by RNA Interference</i> . <i>Nucleic Acids Research</i> , 39(9): 3852-63.	8.026	40	50
8 [*]	W. J. Krzyzosiak, K. Sobczak, <u>M. Wojciechowska</u> , A. Fiszer, A. Mykowska, P. Kozłowski. 2012. <i>Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target</i> . <i>Nucleic Acids Research</i> 40(1): 11-26.	8.278	40	38

9*	<u>M. Wojciechowska</u> , M. Olejniczak, P. Galka-Marciniak, M. Jazurek, and W. J. Krzyzosiak. 2014. <i>RAN-translation and frameshifting as translational challenges at simple repeats of human neurodegenerative disorders</i> . <i>Nucleic Acids Research</i> 42(19): 11849-64.	8.808	40	2
10 [^]	<u>M. Wojciechowska</u> and P. Kozłowski. 2015. <i>Protein kinase inhibitors as potential therapeutic agents to ameliorate pathogenesis of myotonic dystrophy type 1 (DM1). Contribution for the book: Myotonic Dystrophies: Epidemiology, Diagnosis and Therapeutic Challenges</i> . NOVA Science Publisher.	–	–	–
11	E. Koscińska, T. Witkos, E. Kozłowska, <u>M. Wojciechowska</u> and W. J. Krzyzosiak. <i>Cooperation meets competition in microRNA-mediated DMPK transcript regulation</i> (w recenzji).	–	–	–
12	K. Klonowska, K. Czubak, <u>M. Wojciechowska</u> , L. Handschuh, A. Zmienko, M. Figlerowicz, H. Dams-Kozłowska, and P. Kozłowski. <i>Oncogenomic portals for visualization and analysis of genome-wide cancer data</i> (w recenzji).	–	–	–
	Łącznie	38.036	240	174

* , publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports

[^], monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports

(A) OMÓWIENIE PUBLIKACJI NIEWCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

H. Kuran, K. Marciniak, and M. Wojciechowska. 1998. *Nuclear DNA and NYS Protein Contents in Cotyledons of Dry and Germinating Seeds*. *Folia Morphologica* 57 (1): 37.

Ta publikacja opisuje wyniki pomiarów cytofotometrycznych, dotyczących zawartości jądrowego DNA i białek barwiących się NYS w komórkach korzeni i liścieni z suchych i kiełkujących nasion czterech roślin dwuliściennych: *Vicia faba subsp. major* i *subsp. minor*, *Pisum sativum* oraz *Helianthus annuus*. Jak wykazały wyniki, w suchych nasionach zawartość jądrowego DNA utrzymywała się na poziomie 2C i 4C, natomiast kiełkowanie nasion uaktywniało procesy endoreplikacyjne, prowadzące do wzrostu poziomów DNA. Towarzyszyły mu zmiany w zawartości białek barwiących się NYS.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- Przygotowaniu materiału roślinnego i wykonaniu preparatów mikroskopowych do pomiarów cytofotometrycznych.
- Wykonaniu pomiarów cytofotometrycznych dotyczących zawartości DNA w korzeniach i liścieniach *Vicia faba subsp. major* i *subsp. minor* oraz *Pisum sativum*.
- Współtworzeniu wstępnej wersji manuskryptu.

Mój udział szacuję na 20%.

M. Wojciechowska. 2001. *The Symptoms of Programmed Cell Death During Plant Development*. *Postępy Biologii Komórki* 28 (3): 317-334.

W tej publikacji przedstawiłam ówczesny stan wiedzy na temat selektywnej eliminacji komórek, która jest warunkiem koniecznym prawidłowego rozwoju roślin. Główny nacisk położyłam na opis zdarzeń podczas końcowych etapów różnicowania tkanek efemerycznych (np. tapetum, bielma, synergid i suspensora) i na procesy degradacyjne umożliwiające dalsze funkcjonowanie komórek w organizmie roślinnym. Ta forma programowanej śmierci komórek (*ang. programmed cell death, PCD*) odgrywa istotną rolę w embriogenezie i homeostazie dojrzałych organów i jest elementem genetycznego programu w celu kontroli liczby komórek oraz eliminacji komórek uszkodzonych i niezdolnych do spełniania właściwych sobie funkcji. Ówczesne badania przebiegu procesu śmierci u różnych gatunków roślin i w różnych tkankach, wskazywały na jej występowanie na określonym etapie ontogenezy np. podczas determinacji płci, rozwoju gamet, zapłodnienia, embriogenezy, rozwoju i różnicowania organów oraz ich starzenia, a także podczas obrony przed mikroorganizmami patogennymi. Pomimo istnienia pewnych funkcjonalnych i morfologicznych podobieństw w przebiegu PCD u roślin i apoptozy u zwierząt, ówczesne badania nie potwierdzały podobieństw na poziomie molekularnym i śmierć komórek roślinnych określano jako *apoptosis-like*.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- Zgromadzeniu literatury.
- Napisaniu manuskryptu i jego edycji.
- Napisaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział to 100%.

M. Wojciechowska and M. J. Olszewska. 2003. *Endosperm Degradation During Seed Development of Echinocystis lobata (Cucurbitaceae) as a Manifestation of Programmed Cell Death (PCD) in Plants*. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 41 (1): 41-50.

Ta publikacja opisuje złożoność symptomów programowanej śmierci komórek bielma w czasie rozwoju i dojrzewania nasion rośliny dwuliściennej z rodziny dyniowatych o nazwie *Echinocystis lobata*. W tej pracy opisałam wyniki badań uzyskane w czasie realizacji pracy doktorskiej. Zmiany w morfologii komórek bielma analizowałam przy użyciu mikroskopii świetlnej i elektronowej, natomiast stopień degradacji jądrowego DNA był badany przy wykorzystaniu elektroforezy żelowej DNA (wzór drabinkowy migracji fragmentów DNA) oraz testów TUNEL i Comet. W wyniku przeprowadzonych badań wykazałam, że rozwojowi i dojrzewaniu nasion *Echinocystis lobata* towarzyszą zmiany morfologiczne i biochemiczne bielma, dotyczące między innymi kurczenia się protoplastów komórek, kondensacji i degradacji chromatyny oraz fragmentacji jądrowego DNA. Były to zmiany degradacyjne typowe dla symptomów PCD.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- Wykonaniu wszystkich doświadczeń i statystycznym opracowaniu wyników zilustrowanych w postaci Rycin oraz Tabel.
- Współtworzeniu manuskryptu i odpowiedzi dla recenzentów.

Mój udział szacuję na 60%.

M. Wojciechowska, A. Bacolla, J. E. Larson, R. D. Wells. 2005. *The Myotonic Dystrophy Type 1 Triplet Repeat Sequence Induces Gross Deletions*. Journal of Biological Chemistry 280: 941-952.

W tej pracy wykazałam, że wydłużone powtórzenia CTG i GAA, wywołujące odpowiednio DM1 i FRDA, są genetycznie niestabilne i prowadzą w komórkach bakterii do powstania zmian mutagennych w sekwencjach DNA otaczających te powtórzenia. Wykorzystując system episomalnej ekspresji dowiodłam, że jedynie wydłużone powtórzenia (CTG)_n (n=98 i 175), nie zaś ich krótsze odpowiedniki (n=17) indukują różne typy mutacji (delecje i inwersje). Powtórzenia (GAA)_n, (n=98 i 176) charakteryzowały się znacznie niższym potencjałem mutagennym. Częstość mutacji wywołanych tandemowymi sekwencjami CTG i GAA zależała od ich orientacji względem kierunku replikacji oraz od transkrypcji tych powtórzeń. Wyniki sekwencjonowania zmutowanych cząsteczek plazmidowego DNA wykazały istnienie sekwencji homologicznych o długości od 1 do 8 nukleotydów w miejscach pęknięć DNA, oraz obecność sekwencji charakteryzujących się zdolnością do formowania struktur typu *non-B DNA*. Reasumując, wyniki tych badań ujawniły istnienie nowego typu niestabilności genetycznej wywołanej wydłużonymi sekwencjami powtórzonymi CTG i GAA.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- Zaplanowaniu doświadczeń wspólnie z autorem korespondencyjnym.
- Wykonaniu eksperymentów polegających na klonowaniu powtórzeń CTG i GAA w wektory ekspresyjne i rekultywacji transformowanych nimi komórek bakterii.
- Izolacji plazmidów i przygotowaniu DNA do sekwencjonowania oraz interpretacji wyników sekwencjonowania w celu oszacowania mutagenności sekwencji powtórzonych.
- Interpretacji wyników wszystkich badań i ich statystycznym opracowaniu, a następnie zobrazowaniu w postaci Rycin i Tabel.
- Współtworzeniu wstępnej wersji manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Mój udział szacuję na 60%.

A. Bacolla, M. Wojciechowska, B. Kosmider, J. E. Larson, and R. D. Wells. 2006. *The Involvement of Non-B DNA Structures in Gross Chromosomal Rearrangements*. DNA Repair 5: 1161-1170.

Ta publikacja przedstawia ówczesny stan wiedzy na temat roli struktury *non-B DNA*, tworzonej przez różne sekwencje powtórzone w generowaniu genetycznej niestabilności. W tej pracy przedstawiliśmy wyniki badań dowodzące, że struktury typu hairpiny, kruciformy, tripleksy i tetrapleksy tworzone przez sekwencje powtórzone (włączając sekwencje mikrosatelitarne) są przyczyną ich genetycznej niestabilności i indukują powstawanie dużych mutacji (*ang. gross rearrangements*). Takie zmiany prowadzą do delecji, translokacji, insercji, inwersji i duplikacji chromosomów. *Gross rearrangements* są związane z etiologią szeregu chorób genetycznych człowieka (m.in. Zespół cat -eye, Zespół Smith-Magenis i Charcot-Marie-Tooth typ 1).

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- Współtworzeniu manuskryptu i jego edycji.
- Współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.
- Przygotowaniu Rycin 1-3.

Mój udział szacuję na 30%.

A. Bacolla, M. Wojciechowska, B. Kosmider, J. E. Larson, and R. D. Wells. 2006. *Gross Rearrangements Caused by Long Triplet Repeats and Other Repeat Sequences*. Contribution for the book: *Genetic Instabilities and Neurological Diseases, Second Edition*, Elsevier, edited by Robert D. Wells and Tetsuo Ashizawa.

Ta monografia przedstawia trzy zasadnicze problemy związane z niestabilnością sekwencji powtórzonych. Po pierwsze, charakteryzuje struktury typu *non-B DNA* (np. hairpiny, kruciformy, tripleksy, tetrapleksy) tworzone przez trójnukleotydowe sekwencje typu CTG, GAA i CGG oraz inne sekwencje mikrosatelitarne. Po drugie, proponuje kilka modeli wyjaśniających proces tworzenia się dużych rearanżacji mutacyjnych przez sekwencje powtórzone. I po trzecie, przedstawia szereg chorób genetycznych człowieka, których patomechanizm ma związek z niestabilnością sekwencji powtórzonych tworzących struktury typu *non-B DNA*. Jednocześnie, praca ta zwraca uwagę na potrzebę badań procesów powstawania struktur drugorzędowych DNA *in situ*, w celu weryfikacji dotychczasowych analiz prowadzonych wyłącznie *in vitro*.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- Współtworzeniu manuskryptu i jego edycji.
- Odpowiedzi na uwagi recenzentów.
- Przygotowaniu Rycin 46-2, 46-3 oraz 46-4.

Mój udział szacuję na 30%.

M. de Mezer, M. Wojciechowska, M. Napierala, K. Sobczak and W. J. Krzyzosiak. 2011. *Mutant CAG Repeats of Huntingtin Transcript Fold into Hairpin in vitro, form Nuclear foci in Cells and are Targeted by RNA Interference*. *Nucleic Acids Research*, 39(9): 3852-63.

W tej pracy przedstawiliśmy dowody na to, iż w warunkach *in vitro* syntetyczne fragmenty transkryptów huntingtyny (*HTT*) zawierające powtórzenia CAG, tworzą struktury typu *hairpin*. Natomiast w komórkach pacjentów HD, endogenne transkrypty *HTT* z ekspansjami powtórzeń CAG tworzą wewnątrzjądrowe inkluzje zawierające zmutowane RNA i białko splicingowe MBNL1. Ten wynik pozwolił nam wysunąć hipotezę, że formowanie się rybonukleoproteinowych *foci* jest konsekwencją tworzenia struktur typu *hairpin* przez wydłużone sekwencje CAG również w warunkach *in vivo*. Jednakże wyniki badań z użyciem siRNA komplementarnych do powtórzeń CAG w komórkach pacjentów HD, wykazały że zmutowane transkrypty *HTT* (podobnie jak ich niezmutowane odpowiedniki) nie są odporne na te narzędzia interferencji RNA i w konsekwencji odnotowaliśmy obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu obu typów transkryptów *HTT*. Wyniki tych badań nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy struktury drugorzędowe RNA istnieją w komórkach HD. Jednakże pozwoliły wysunąć hipotezę, że take struktury mogą być tworzone *in situ*, jednakże są niewystarczająco stabilne aby inhibować wiązanie siRNA do wydłużonych powtórzeń CAG.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- Wykonaniu doświadczeń zilustrowanych na Rycinach 4 i 7.
- Napisaniu manuskryptu i jego edycji.
- Przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

Mój udział szacuję na 40%.

W. J. Krzyzosiak, K. Sobczak, M. Wojciechowska, A. Fiszer, A. Mykowska, P. Kozłowski. 2012. *Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target*. *Nucleic Acids Research* 40(1): 11-26.

Ta publikacja opisuje w sposób kompleksowy wyniki wieloletnich badań wielu laboratoriów na całym świecie dotyczące trzech aspektów związanych z wyjaśnianiem roli zmutowanych transkryptów zawierających ekspansje powtórzeń mikrosatelitarnych w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych człowieka. Po pierwsze, przedstawione zostały w niej wyniki badań strukturalnych *in vitro* dokumentujące, że transkrypty zawierające ekspansje prostych sekwencji powtórzonych tworzą struktury drugorzędowe o różnej architekturze i stabilności. Po drugie, przedyskutowany został aspekt komórkowej toksyczności takich transkryptów na przykładzie kilku chorób neurodegeneracyjnych człowieka m.in. DM1 i FXTAS. Trzecim zagadnieniem, jakie opisuje ta publikacja są rozmaite podejścia terapeutyczne stosowane dotychczas w chorobach zależnych od toksyczności RNA i białka w celu selektywnej inhibicji ekspresji zmutowanych transkryptów.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- Zgromadzeniu materiałów literaturowych.
- Współdziale w komponowaniu manuskryptu, jego edycji i napisaniu odpowiedzi dla recenzentów.

Mój udział szacuję na 25%.

M. Wojciechowska, M. Olejniczak, P. Galka-Marciniak, M. Jazurek, and W. J. Krzyzosiak. 2014. *RAN-translation and frameshifting as translational challenges at simple repeats of human neurodegenerative disorders*. *Nucleic Acids Research* 42(19): 11849-64.

W tej pracy przedstawiliśmy obecny stan wiedzy na temat dwóch procesów związanych z ekspansjami prostych sekwencji mikrosatelitarnych: RAN translacji i frameshiftingu. Pierwszy z nich to translacja niezależna od kodonu START (*ang. non-ATG RAN translation*), który to proces został niedawno opisany w czterech chorobach neurodegeneracyjnych człowieka: SCA8, DM1, FXTAS i ALS/FTD. Dotyczy on indukowania niekanonicznej translacji (niewymagającej kodonu START) przez wydłużone powtórzenia mikrosatelitarne znajdujące się w częściach niekodujących różnych genów. Ten typ translacji może odbywać się w różnych ramkach odczytu w obrębie powtórzeń CAG, CGG oraz GGGGCC, prowadząc do powstawania krótkich i homogeny peptydów. Kwestią dotychczas nierozstrzygniętą pozostaje udział białek RAN w patomechanizmie wyżej wymienionych chorób, bowiem dane eksperymentalne wskazują zarówno na ich negatywny jak i pozytywny wpływ. Badania nad wyjaśnieniem podłoża molekularnego procesu RAN translacji trwają, jednakże dotychczasowe wyniki wskazują na udział drugorzędowych struktur RNA tworzonych przez ekspansje sekwencji powtórzonych w procesie inicjacji tej niekonwencjonalnej produkcji białek. Podobna hipoteza dotycząca wpływu struktury RNA została wcześniej zaproponowana dla wyjaśnienia przyczyn innego procesu dotyczącego zaburzeń elongacji łańcucha białkowego przez ekspansje powtórzeń CAG. Ten proces, określany jako *frameshifting* został opisany w komórkach pacjentów HD i SCA3. Jednakże, poza identyfikacją białkowych produktów *frameshiftingu* w komórkach ich rola w patomechanizmie tych chorób pozostaje niewyjaśniona.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- *Zgromadzeniu materiałów literaturowych.*
- *Napisaniu manuskryptu i jego edycji.*
- *Współudziale w tworzeniu wszystkich Rycin manuskryptu oraz Rycin i Tabel materiału suplementarnego.*

Mój udział szacuję na co najmniej 30%.

M. Wojciechowska and P. Kozłowski, 2015. Protein kinase inhibitors as potential therapeutic agents to ameliorate pathogenesis of myotonic dystrophy type 1 (DM1). Contribution for the book entitled: Myotonic Dystrophies: Epidemiology, Diagnosis and Therapeutic Challenges. NOVA Science Publisher.

Ta monografia opisuje obecny stan wiedzy na temat nowych podejść terapeutycznych w dystrofii miotonicznej typu pierwszego z zastosowaniem niskocząsteczkowych związków chemicznych będących inhibitorami kinaz białkowych. Ich zastosowanie w systemach komórkowych i organizmach transgenicznym DM1 ujawniło potencjalne właściwości terapeutyczne związane z łagodzeniem symptomów patogenezy tej choroby. Mechanizm działania tych inhibitorów nie jest obecnie poznany, jednakże wstępne wyniki badań sugerują, że mogą one być skutecznymi narzędziami terapeutycznymi.

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na:

- *Zgromadzeniu materiałów literaturowych.*
- *Napisaniu manuskryptu i jego edycji.*

Mój udział szacuję na co najmniej 60%.

(B) BADANIA PROWADZONE AKTUALNIE I PLANY NAUKOWE NA PRZYSZŁOŚĆ

W ramach kierowanych przez mnie projektów badawczych: „Analiza oddziaływania białek ze zmutowanymi transkryptami genów zaangażowanych w choroby z grupy TREDs” (projekt MNiSzW, okres realizacji: 2011-2015), oraz „Wyjaśnienie mechanizmu działania niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz w łagodzeniu patomechanizmu dystrofii miotonicznej typu pierwszego (DM1)” (projekt OPUS 7, okres realizacji: 2015-2018), prowadzę badania mające na celu zidentyfikowanie białek uczestniczących w patomechanizmie chorób wywołanych toksycznością zmutowanych transkryptów zawierających ekspansje powtórzeń CUG, CCUG oraz CAG zaangażowanych odpowiednio w DM1, DM2 oraz HD i SCA3. Ponadto, poszukuję nowych narzędzi terapeutycznych, które mogą zostać wykorzystane w leczeniu dystrofii miotonicznej typu pierwszego i innych chorób zależnych od toksyczności RNA. Celem zakończonego już projektu MNiSzW była charakterystyka białek zaangażowanych w metabolizm RNA, które zostały wstępnie wyselekcjonowane na podstawie wcześniejszych badań proteomicznych. Rezultatem tych analiz jest wyłonienie kilku białek mających potencjalne znaczenie w procesie jądrowej akumulacji zmutowanych transkryptów. Ich dalsza charakterystyka doprowadzi do ustalenia czy mogą one posłużyć w opracowaniu skutecznych narzędzi terapeutycznych w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych człowieka.

Zagadnienie identyfikacji nowych białek zaangażowanych w patomechanizm chorób neurodegeneracyjnych będzie kontynuowane w ramach realizacji nowego projektu grantowego OPUS 7, którego celem jest wyjaśnienie mechanizmu działania niskocząsteczkowych inhibitorów kinaz w łagodzeniu patomechanizmu DM1. Projekt ten jest kontynuacją pracy opublikowanej w 2014 roku (39), w której przedstawiłam wyniki badań wskazujące na potencjalny charakter terapeutyczny dwóch niskocząsteczkowych związków chemicznych C16 i C51, będących inhibitorami kinaz białkowych. W tym projekcie weryfikacji poddawana będzie hipoteza, że łagodzenie molekularnego fenotypu DM1 pod wpływem C16 i C51 jest wywołane ilościowymi i/lub jakościowymi zmianami różnych kinaz białkowych. Wobec tego podstawowym celem niniejszego projektu będzie identyfikacja i charakterystyka kinaz docelowych dla inhibitorów C16 i C51 w komórkach mięśni szkieletowych DM1, oraz całokinomowa analiza porównawcza poziomów ekspresji i fosforylacji kinaz w komórkach osobników zdrowych i chorych. Do badań wykorzystane zostaną biotynylowane formy inhibitorów C16 i C51 oraz komórki DM1 (zarówno niezróżnicowane jak i zróżnicowane w warunkach *in vitro*) aby uzyskać materiał różniący się wewnątrzkomórkową ekspresją kinaz. Może to mieć istotne znaczenie na rodzaj zidentyfikowanych białek oddziałujących z inhibitorami. Ilościowa i jakościowa charakterystyka białek będących substratami biotynylowanych cząsteczek inhibitorów zostanie przeprowadzona przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Ostatecznie, zidentyfikowane w ten sposób kinazy będą badane w celu określenia czy i w jaki sposób wpływają na patogenezę DM1. Ten etap będzie się odbywać z wykorzystaniem ludzkich komórek mięśni szkieletowych i będzie dotyczył nadekspresji lub wyciszania kinaz białkowych w celu oceny ich wpływu na podstawowe elementy patomechanizmu DM1. W konsekwencji, badania te doprowadzą do wyłonienia grupy kinaz łagodzących molekularny fenotyp komórek DM1. Zostaną one zakwalifikowane do przyszłych testów zmierzających do opracowania terapii z ich udziałem.

(C) SUMMARYCZNY IMPACT FACTOR WEDŁUG LISTY JOURNAL CITATION REPORTS ZGODNIE Z ROKIEM OPUBLIKOWANIA – 69.816

(D) LICZBA CYTOWAŃ PUBLIKACJI WEDŁUG BAZY WEB OF SCIENCE – 313

(E) INDEKS HIRSCHA WEDŁUG BAZY WEB OF SCIENCE – 9

(F) KIEROWANIE MIĘDZYNARODOWYMI I KRAJOWYMI PROJEKTAMI BADAWCZYMI ORAZ UDZIAŁ W TAKICH PROJEKTACH

- i. **2015 – 2018**, kierownik projektu w konkursie OPUS 7 (NCN) – „*Wyjaśnienie mechanizmu działania małowcząsteczkowych inhibitorów kinaz w łagodzeniu patomechanizmu dystrofii miotonicznej typu pierwszego (DM1)*”.
- ii. **2011 – 2014**, kierownik projektu w 40 konkursie MNiSzW – “*Analiza oddziaływania białek ze zmutowanymi transkryptami genów zaangażowanych w choroby z grupy TREDs*”.
- iii. **2012 – 2014**, wykonawca w projekcie MAESTRO 3 (NCN), zatytułowanym „*RNA toxicity in pathogenesis of polyglutamine diseases*”; kierownik projektu: prof. Włodzimierz J. Krzyżosiak.
- iv. **2009 – 2010**, wykonawca w Programie Operacyjnym Innowacyjna Gospodarka (European Regional Development Fund within Innovative Economy Programme) zatytułowanym „*Nowe reagenty technologii interferencji RNA o dużym znaczeniu dla medycyny*”; kierownik projektu: prof. Włodzimierz J. Krzyżosiak.
- v. **2007 – 2009**, wykonawca w projekcie grantowym typu RO1 finansowanym przez Amerykański Instytut Badań NIH zatytułowanym “*Molecular genetic characteristic of myotonic dystrophy*”; kierownik projektu: prof. Ralf Krahe.
- vi. **2002 – 2006**, wykonawca w projektach grantowych typu RO1 finansowanych przez Amerykański Instytut Badań NIH oraz Muscular Dystrophy Association i Friedreich’s Ataxia Research Alliance dotyczących mechanizmów niestabilności genetycznej powtórzeń trójnukleotydowych; kierownik projektów: prof. Robert D. Wells.
- vii. **2000 – 2002**, kierownik projektu KBN dla młodych badaczy – “*TUNEL Assay - określenie stopnia degradacji bielma w nasionach Echinocystis Lobata*”.

(G) MIĘDZYNARODOWE I KRAJOWE NAGRODY ZA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWĄ

- i. **2008** – nagroda za najlepszy plakat pt. „*Mouse Models With Core Features of Myotonic Dystrophy Type 2 (DM2)*” na konferencji Genes & Development Retreat. Camp Allen Conference & Retreat Center, Navasota, Texas, USA.
- ii. **2005** – nagroda za najlepszy plakat pt. „*The Molecular Mechanisms Responsible for the Genetic Instability of the CCTG-CAGG Repeats Associated with Myotonic Dystrophy Type 1 and Type 2*” na konferencji Lost Pines Conference. Smithville, Texas, USA.

- iii. **2003** – Nagroda im. Profesora Henryka Godlewskiego dla młodych autorów wykorzystujących nowoczesne techniki badawcze w cytochemii i biologii komórki – za najlepszą pracę w roku 2003 pt. "Endosperm degradation during seed development of *Echinocystis lobata* (Cucurbitaceae) as a manifestation of programmed cell death (PCD) in plants" opublikowaną w Folia Histochemica et Cytobiologica, vol. 41, nr 1, str. 41-50.

(H) AKTYWNY UDZIAŁ W MIĘDZYNARODOWYCH I KRAJOWYCH KONFERENCJACH TEMATYCZNYCH

- i. M. Wojciechowska, K. Sobczak, K. Taylor, K. Przyslo. *Small molecule kinase inhibitors alleviate molecular features of myotonic dystrophy type 1 (DM1)*. Cell Symposia, Regulatory RNAs. Berkeley, CA, USA (2014); **plakat**
- ii. A. Mykowska, K. Sobczak, M. Wojciechowska, P. Kozłowski and W. J. Krzyzosiak. *CAG Repeats Mimic CAG Repeats in the Misregulation of Alternative Splicing*. Huntington's Disease World Congress, Melbourne, Australia (2011); **plakat**
- iii. R. Krahe, M. Sirito, M. Wojciechowska, L.L. Bachinski, L.T. Timchenko, C.S. Van Pelt, D.R. Mosier, K. A. Sheikh, G. Zhang, P. Mancias, and B. Udd. *Mouse Models for Myotonic Dystrophy type 2 (DM2) Lacking Aberrant Splicing Implicate Novel Cytoplasmic Pathomechanisms*. 7th The International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting. Würzburg, Germany (2009); **plakat**
- iv. A. Bergmann, V. Sahin, M. Wojciechowska, M. Sirito., C. Richards, Z. Chen, and R. Krahe. *A Drosophila Model of Myotonic Dystrophy Type 2 (DM2)*. 7th The International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting. Würzburg, Germany (2009); **plakat**
- v. M. Wojciechowska, K. A. Baggerly, B. Schoser, B. Udd, and R. Krahe. *Accumulation of Mutant DM2 (CCUG)*n* Transcript Triggers Activation of PKR and ER Stress Response*. 7th The International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting. Würzburg, Germany (2009); **referat na zaproszenie**
- vi. M. Wojciechowska, M. Sirito, L. Bachinski, and R. Krahe. *Mouse Models With Core Features of Myotonic Dystrophy Type 2 (DM2)*. Genes & Development Retreat. Camp Allen Conference & Retreat Center, Navasota, Texas, USA (2008); **plakat i referat**
- vii. R. Krahe, M. Sirito, M. Wojciechowska, S. Hajibashi, S.E. Olufemi, D.R. Mosier, O. Raheem, R. Randen, B. Udd, & L.L. Bachinski. *A Transgenic Mouse Model for Myotonic Dystrophy Type 2 (DM2)*. 6th The International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting. Milan, Italy (2007); **plakat**
- viii. M. Wojciechowska, M. Napierala, A. Bacolla, J. E. Larson and R. D. Wells. *DNA Conformational Transitions Within the Repeats of DM1, DM2 and FRDA Genes Promote Mutagenesis in Mammalian and Bacterial Cells. DNA Structure*. Genomic Rearrangements, and Human Disease at ASBMB Sponsored Symposium. Institute of Biosciences and Technology, Houston, Texas, USA (2006); **referat na zaproszenie**
- ix. R. Dere, M. Napierala, L. P. W. Ranum, M. Wojciechowska, and R. D. Wells. *The Molecular Mechanisms Responsible for the Genetic Instability of the CCTG•CAGG Repeats Associated with Myotonic Dystrophy Type 1 and Type 2*. Lost Pines Conference. Smithville, Texas, USA (2005). **plakat**

- x. M. Wojciechowska, A. Bacolla, R. Dere, M. Hebert, B. Kosmider, J. E. Larson, M. Napierala, L. S. Son, and R. D. Wells. *Long DM1 and DM2 Repeat Sequences Induce Gross Rearrangements in Flanking DNA Sequences*. 5th The International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting. Quebec City, Canada (2005); **referat na zaproszenie**
- xi. A. Bacolla, P. D. Chastain, R. Dere, M. Filutowicz, J. D. Griffith, M. Hebert, J. P. Jakupciak, L. Mochmann, M. Napierala, P. Parniewski, A. Pluciennik, R. R. Iyer, A. Jaworski, J. E. Larson, N. Sakamoto, L. Spitz, A. A. Vetcher, J. H. Wilson, M. Wojciechowska, R. D. Wells. *Recombination Mediates Genetic Instability of Triplet Repeat Sequences*. 30th Steinbeck Symposium. Gene Expression, Transposition, Genomics and Other Life Sciences, Madison, Wisconsin, USA (2004); **plakat**
- xii. M. Wojciechowska, A. Bacolla, J. E. Larson, A. Jaworski, J. P. Jakupciak, C. D. O'Connell, R. D. Wells. *Long Tracts of PolypurinesPolypirimidines and Triplet Repeats Increase the Frequency of Large Deletions*. 4th International Conference on Unstable Microsatellites and Human Disease. Banff, Alberta, Canada (2004); **plakat**
- xiii. A. Bacolla, R. Dere, M. Hebert, B. Kosmider, M. Napierala, L. Spitz, M. Wojciechowska, A. Jaworski, J. E. Larson, J. P. Jakupciak, N. Chuzhanova, S. S. Abeyasinghe, C. D. O'Connell, D. N. Cooper, and R. D. Wells. *Non-B DNA Conformations, Genetic Rearrangements, and Human Disease*. The 19th Lost Pines Conference on Cellular and Molecular Biology. The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Smithville, USA (2004); **plakat i referat**
- xiv. A. Bacolla, R. P. Bowater, R. Dere, J. D. Griffith, M. Hebert, R. R. Iyer, J. P. Jakupciak, A. Jaworski, J. Larson, L. Mochmann, M. Napierala, A. Pluciennik, L. Spitz, A. Vetcher, M. Wojciechowska, R. D. Wells. *Non-B DNA and its Physiological Consequences*. Symposium on Physiology, Biochemistry and Molecular Genetics Group, 153rd Ordinary Meeting UMIST, Manchester, UK (2003); **plakat**
- xv. M. Wojciechowska. *The Symptoms of Programmed Elimination of Echinocystis lobata Endosperm on the Molecular and Ultrastructural Levels*. XIV Conference on Genetics, Poznan, Poland (2001); **plakat**
- xvi. M. Wojciechowska. *DNA degradation in the cells of Echinocystis lobata endosperm*. 37 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Poznań, Poland (2001); **plakat**
- xvii. M. Wojciechowska. *Nuclear DNA Degradation During Development of Echinocystis lobata endosperm-programmed cell death*. XXIV Conference on Embryology: Plants-Animals-Humans. Podlesice, Poland (2000); **plakat**
- xviii. M. Wojciechowska, and K. Marciniak. *DNA and NYS Protein Contents in Endosperm and Cotyledon Nuclei in Germinating Seeds of Echinocystis lobata*. 7th Conference on Cell Biology. Kraków, Poland (1999); **plakat**

(I) OPIEKA NAUKOWA NAD STUDENTAMI I DOKTORANTAMI

- i. **W latach 2010 – 2014**, sprawowałam opiekę w charakterze opiekuna naukowego nad 2 studentami doktorantami i 2 magistrantami pracując jako adiunkt w Instytucie Chemii Bioorganicznej, Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.
- ii. **W latach 2007 – 2009**, sprawowałam opiekę w charakterze opiekuna naukowego nad 2 studentami doktorantami pracując jako post-doc w Department of Genetics, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA.

- iii. **W latach 2002 – 2006**, sprawowałam opiekę w charakterze opiekuna naukowego nad 2 magistrantami pracując jako post-doc w Center for Genome Research, Institute of Biosciences and Technology Texas A&M University, Houston, USA.
- iv. **W latach 1997 – 2001**, sprawowałam opiekę w charakterze opiekuna naukowego nad 3 magistrantami będąc doktorantem Uniwersytetu Łódzkiego, Zakład Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, Łódź.

(J) RECENZOWANIE PUBLIKACJI W CZASOPISMACH MIĘDZYNARODOWYCH I KRAJOWYCH

Dotychczas wykonałam łącznie 12 recenzji publikacji oryginalnych i artykułów przeglądowych w następujących czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym:

- i. PLoS One
- ii. Journal of Biological Chemistry
- iii. Nucleic Acids Research
- iv. Neuromuscular Disorders
- v. Skeletal Muscle
- vi. BMC Musculoskeletal Disorders
- vii. Nature Communications
- viii. BioTechnologia

(K) INNE OSIĄGNIĘCIA, NIE WYMIENIONE WYŻEJ

- i. **W 2014 r.** brałam udział w „Nocy Naukowców” zorganizowanej w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.
- ii. **W latach 2010 – 2014** prezentowałam wyniki badań na seminariach Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Tytuły wykładów:
 - *Alleviating DM1 Pathogenesis via Targeting Mutant DMPK Transcripts and Affecting Protein Kinases.*
 - *Ribonucleoprotein inclusions in neuromuscular disorders.*
 - *Toksyczność transkryptów w dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1) i chorobie Huntingtona (HD).*
- iii. **W latach 1997 – 2001** prowadziłam zajęcia dydaktyczne dla studentów stacjonarnych i zaocznych na Wydziale Biologii Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi:
 - 10/1997 – 05/2000 prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne i seminaria z zakresu cytologii i cytochemii roślin.
 - 10/1998 – 05/2001 prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne i seminaria z zakresu embriologii roślin oraz pracownie dla studentów (stacjonarnych i niestacjonarnych).
- iv. **W latach 1997 – 2001** prowadziłam zajęcia lekcyjne dla uczniów klas I-IV w I Liceum Ogólnokształcącym im. Stefana Żeromskiego w Ozorkowie.

- v. W 1997 r. prowadziłam zajęcia lekcyjne dla uczniów klas VI w Szkole Podstawowej Nr 5 im. Marii Curie-Skłodowskiej w Ozorkowie.

(L) ROZWÓJ KARIERY AKADEMICKIEJ

W roku 1992 rozpoczęłam studia na ówczesnym Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego na kierunku biologia. W 1997 r. obroniłam pracę magisterską zatytułowaną „Zmiany zawartości jądrowego DNA i białek barwiących się NYS w komórkach liścieni kielkujących nasion *Vicia faba susp. minor* ocenianych metoda podwójnej cytofotometrii” i uzyskałam stopień magistra biologii. Praca została wykonana w Zakładzie Anatomii i Embriologii Roślin UŁ pod kierunkiem dr hab. Kazimierza Marciniaka. W 1997 r. podjęłam studia doktoranckie w Stacjonarnym Studium Doktoranckim Fizjologiczno-Mikrobiologicznym przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie w 2001 r. obroniłam pracę doktorską „Zmiany towarzyszące rozwojowi i degradacji białka podczas dojrzewania nasion *Echinocystis lobata*” uzyskując tytuł doktora nauk biologicznych ze specjalnością cytogenetyka. Praca została wykonana w Zakładzie Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Marii J. Olszewskiej. W 2002 r. rozpoczęłam staż podoktorski w laboratorium Profesora Roberta D. Wellsa w Texas A&M University System, Health Science Center, Institute of Biosciences and Technology, Center for Genome Research, Houston, Texas, USA. Tam prowadziłam badania związane z wyjaśnieniem mechanizmów niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych zaangażowanych w choroby neurodegeneracyjne człowieka. W 2006 r. odbyłam sześciomiesięczny staż w laboratorium profesora Jacka Puymirata w Laval University, Human Genetics Department, Quebec City, Quebec, Kanada, gdzie zdobyłam doświadczenie w molekularnej analizie objawów toksyczności zmutowanych transkryptów *DMPK* w patomechanizmie DM1 z wykorzystaniem mysich modeli tej choroby. W 2007 r. rozpoczęłam drugi staż podoktorski w laboratorium Profesora Ralfa Krahe w University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Genetics Department, Houston, Texas, USA gdzie pracowałam nad molekularną charakterystyką nowego modelu mysiego DM2. W 2009 r. wróciłam do Polski i podjęłam pracę adiunkta w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w ówczesnym laboratorium Genetyki Nowotworów kierowanym przez Profesora Włodzimierza J. Krzyżosiaka, gdzie kontynuowałam badania mające związek z patomechanizmami chorób neurodegeneracyjnych człowieka związanych z niestabilnością prostych sekwencji powtórzonych. Tą tematyką badań zajmuję się do chwili obecnej w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.



.....
Podpis