

**Autoreferat przedstawiający opis
dorobku i osiągnięć naukowych**

dr Katarzyna Dorota Raczyńska

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Ekspresji Genów**

Poznań 2016

1. Imię i nazwisko: Katarzyna Dorota Raczyńska

Dane kontaktowe:

Zakład Ekspresji Genów

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań

Tel. 618295953

e-mail: doracz@amu.edu.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

doktor nauk biologicznych – 19 maja 2006 r., Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza 3' końców mitochondrialnych transkryptów genów *nad6* i *nad9* kalafiora oraz identyfikacja białek wiążących się z 3' końcem genu *nad9*” (praca obroniona z wyróżnieniem).

Promotor: prof. dr hab. Halina Augustyniak (Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu).

Recenzenci: prof. dr hab. Zofia Szweykowska-Kulińska (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu); prof. dr hab. Piotr Stępień (Uniwersytet Warszawski).

magister nauk biologicznych – 25 kwietnia 2001 r., Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł pracy magisterskiej: „Ekspresja genów *nad3* i *nad6* kompleksu I łańcucha oddechowego podczas rozwoju siewek łubinu”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2006 – obecnie: adiunkt, Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

01.11.2010-30.06.2012 - Postdoc (Postdoctoral research associate); Department of Cell Biology, University of Bern, Bern, Szwajcaria

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Rola białek kompleksu CBC i SERRATE w regulacji splicingu alternatywnego u roślin”.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Raczyńska K.D., Simpson C.G., Ciesiołka A., Szewc L., Lewandowska D., McNicol J., Szweykowska-Kulińska Z., Brown J., Jaromłowski A. (2010) Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 38:265-278. doi: 10.1042/BST0380667. **IF 2010 = 7.836; 40 pkt MNiSW.**

Raczyńska K.D. (2010) Splicing alternatywny jako jeden z mechanizmów regulacji ekspresji genów u roślin i zwierząt. *Na pograniczu chemii i biologii*, Wydawnictwo UAM, 24:63-100.

Raczyńska K.D., Stępień A., Kierzkowski D., Kalak M., Bajczyk M., McNicol J., Simpson C.G., Szweykowska-Kulińska Z., Brown J. W., Jarmołowski A. (2014) The SERRATE protein is involved in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 42(2):1222-1244. doi: 10.1093/nar/gkt894. **IF 2014 = 9.112; 40 pkt MNiSW.**

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

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl trzech publikacji, które powstały podczas mojej pracy w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na stanowisku adiunkta, pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Jarmołowskiego i prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej. Praca moja koncentrowała się wówczas na procesie splicingu alternatywnego, czyli ko-transkrypcyjnej modyfikacji genów zachodzącej na terenie jądra komórkowego. Materiałem badawczym był rzodkiewnik pospolity *Arabidopsis thaliana*. Nadrzędnym celem pracy było określenie udziału białek kompleksu CBC oraz białek biorących udział w biogenezie roślinnych miRNA na splicing alternatywny transkryptów wybranych genów. W okresie tym intensywnie współpracowaliśmy z ośrodkiem Scottish Crop Research Institute (SCRI) w Dundee, w Szkocji, z grupą prof. Johna Browna.

Splicing jest jednym z etapów dojrzewania transkryptów, który zachodzi na terenie jądra komórkowego, w ciałkach zwanych „spackles”. Podczas tego procesu w ściśle określonych miejscach splicingowych z prekursorowego RNA usuwane są introny, natomiast końce pozostałych fragmentów RNA są łączone i tworzą ciągłą cząsteczkę mRNA. Struktura trzeciorzędowa pre-mRNA, umożliwiająca splicing, powstaje w obrębie wielkiego, dynamicznego kompleksu nazywanego spliceosomem, złożonego z około 300 białek u roślin i około 170 białek u człowieka. Część tych białek oddziałuje z bogatymi w uracyl cząsteczkami U snRNA, tworząc główne cząstki spliceosomu - rybonukleoproteiny: U1 snRNP, U2 snRNP, U4 snRNP, U5 snRNP i U6 snRNP. Cząstki te w kolejnych etapach splicingu oddziałują z pre-mRNA na zasadzie parowania komplementarnych zasad pomiędzy zachowawczymi sekwencjami w pre-mRNA i U snRNA. Dokładną budowę miejsc splicingowych oraz przebieg procesu opisałam w rozdziale „Splicing alternatywny jako jeden z mechanizmów regulacji ekspresji genów u roślin i zwierząt” wydawnictwa UAM „Na pograniczu chemii i biologii” (**Raczyńska, 2010**).

Splicing alternatywny to proces dojrzewania transkryptów, który umożliwia powstanie więcej niż jednej, dojrzałej cząsteczki mRNA z pojedynczego pre-mRNA. Powstające izoformy mRNA mogą kodować odmienne białka, które różnią się funkcją, stabilnością, lokalizacją w komórce czy aktywnością enzymatyczną. Dlatego splicing alternatywny wpływa na wzrost zróżnicowania transkryptomu i proteomu a tym samym na wzrost pojemności kodującej genów u organizmów wyższych. Ponadto, splicing alternatywny wpływa na wiele etapów metabolizmu RNA, takich jak degradacja transkryptów, wiązanie mRNA do rybosomów oraz wydajność translacji. Splicing alternatywny obejmuje następujące zdarzenia: zachowanie intronu, pominięcie egzonu, wzajemnie wykluczające się egzony, wybór alternatywnego miejsca donorowego (miejsce splicingowe 5') lub/i akceptorowego (miejsce splicingowe 3'). Około 1/5 transkryptów posiada więcej niż jedno alternatywne zdarzenie splicingowe w jednym pre-mRNA (Graveley, 2001; Black, 2003; Blencow, 2006; Reddy, 2007; de Klerk i Hoen, 2015). Szacuje się, że liczba transkryptów podlegających splicingowi alternatywnemu u człowieka może dochodzić aż do 95% (Pan i wsp., 2008; Wang i wsp., 2008; Lu i wsp., 2012), podczas gdy u *Arabidopsis thaliana* procesowi temu podlega ~60% genów

(Filichkin i wsp., 2010; Marquez i wsp., 2012; Syed i wsp., 2012; Meyer i wsp., 2015). W przypadku roślin liczba ta wciąż jednak wydaje się być niedoszacowana. Wynika to, między innymi, z niekompletnych baz danych roślinnych sekwencji EST (ang. expressed sequence tag) i cDNA, w których na przykład, brak niskokopijnych transkryptów. Ponadto, wiele transkryptów podlega splicingowi alternatywnemu tylko w określonej tkance, czasie lub warunkach rozwoju, co zawęża kompletne analizy.

Splicing i splicing alternatywny to procesy regulowane przez czynniki białkowe, zwane czynnikami splicingowymi. Co ciekawe, niemal połowa z nich sama dosyć intensywnie podlega zdarzeniom splicingu alternatywnego w sposób czasowo lub tkankowo-specyficzny (Wang i Brendel, 2004; Ru i wsp., 2008; Meyer i wsp., 2015). Do najlepiej poznanych czynników splicingowych należą: i) białka SR (bogate w reszty serynowe (S) i argininowe (R)), które wiążą się do sekwencji wzmacniających wspomagając splicing oraz ii) heterogenne, jądrowe cząstki hnRNP, zwykle związane z sekwencjami wyciszającymi. Sposób ich działania polega często na wprowadzaniu lokalnych zmian struktury RNA lub „ściągnięcia” kolejnych białek, co w efekcie powoduje zablokowanie lub wzmocnienie wiązania do miejsc splicingowych cząstek U1 snRNP i U2 snRNP (Chen i Manley, 2009; szerzej opisane w **Raczyńska, 2010**). Pełny obraz regulacji splicingu alternatywnego u roślin nie jest jednak wyjaśniony. **W dwóch pracach eksperymentalnych, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, scharakteryzowałam nowe białka regulatorowe tego procesu: białko jądrowego kompleksu CBC (CBP20 i CBP80) (Raczyńska i wsp., 2010) i białko SERRATE (SE) (Raczyńska i wsp., 2014).**

Badania przeprowadziłam we współpracy z grupą badawczą prof. Johna Browna (SCRI, Dundee, Szkocja) z wykorzystaniem platformy AS RT-PCR (Alternative Splicing RT-PCR, nazywanej również platformą high resolution RT-PCR) (Simpson i wsp., 2008; Simpson i wsp., 2008b). Platforma zawiera wyznakowane fluorescencyjnie pary starterów zaprojektowane do analizy ~450 alternatywnych zdarzeń splicingowych w genach *Arabidopsis thaliana*. Uzyskany, wyznakowany produkt PCR jest rozdzielany w warunkach elektroforezy kapilarnej a następnie analizowany z wykorzystaniem programu PeakScanner (Applied Biosystems). Zastosowane podejście badawcze pozwala na ilościową analizę porównawczą otrzymanych izoform splicingowych i precyzyjny pomiar ich długości. Większość starterów platformy zaprojektowana została w Szkocji, około 60 dodatkowych par zaprojektowałam w Poznaniu. Transkrypty, które wybraliśmy do analiz, obejmowały geny: czynników transkrypcyjnych (179 genów), czynników splicingowych (88 genów), białek odpowiedzi na stres środowiskowy (51 genów), białek regulujących kwitnienie (16 genów) i innych białek (91 genów). Analizowane zdarzenia splicingowe obejmowały: alternatywne miejsce donorowe (Alt 5' ss, 118 zdarzeń), alternatywne miejsce akceptorowe (Alt 3' ss, 225 zdarzeń), alternatywne miejsce donorowe i akceptorowe w tym samym intronie (Alt P, 10 zdarzeń), usunięcie egzonu (ES, 40 zdarzeń) i pozostawienie intronu (IR, 51 zdarzeń).

Warto w tym miejscu wspomnieć typowy rozkład alternatywnych zdarzeń splicingowych w komórkach roślinnych. Pozostawienie intronu jest najczęstszym zdarzeniem, podlega mu aż ponad 50% alternatywnie składanych transkryptów, a najrzadziej występującym zdarzeniem jest wycięcie egzonu (8%). Około 22% i 10% przypadków dotyczy, odpowiednio, występowania alternatywnego miejsca akceptorowego lub donorowego (Ner-Gaon i wsp., 2004; Wang i Brendel, 2006; Reddy, 2007; Simpson i wsp., 2008; Simpson i wsp., 2010). Co interesujące, w przeciwieństwie do roślin, u zwierząt wycięcie egzonu jest najczęstszym zdarzeniem (58% zdarzeń), natomiast, tylko 5% dojrzałych transkryptów zawiera zachowany intron (Reddy, 2007; Kim i wsp., 2007). Różnice te pochodzą z odmiennych sposobów rozpoznawania miejsc splicingowych (model definiowania intronu u roślin i model definiowania egzonu u zwierząt), a to z kolei wynika ze zróżnicowania w składzie i długości roślinnych i zwierzęcych genów (opisane szerzej w pracy **Raczyńska, 2010**). Warto wyjaśnić,

że w naszej platformie zdarzenia typu IR stanowią tylko ~10% wszystkich analizowanych zdarzeń. Wynika to stąd, że niewycięte introny powodują najczęściej przesunięcie ramki odczytu lub wprowadzenie nowego kodonu stop i rzadko pełnią jakąś biologiczną rolę. Aczkolwiek, zdarzenia typu IR zachodzą u roślin preferencyjnie w pre-mRNA genów kodujących białka odpowiedzi na stres, białka uczestniczące w transdukcji sygnałów, dojrzewaniu RNA, a także białka uczestniczące w fotosyntezie i kwitnieniu (opisane szerzej w pracy **Raczyńska, 2010**). Natomiast, alternatywne miejsca donorowe i akceptorowe położone są zazwyczaj w odległości 3 lub wielokrotności 3 nukleotydów, co powoduje wprowadzenie nowych kodonów.

Do poszukiwań nowych regulatorów splicingu alternatywnego wybrałam białka, co do których potencjalnej roli regulatorowej w tym procesie istniały pewne przypuszczenia. Jądrowy kompleks CBC (ang. cap binding complex) złożony jest z dwóch dobrze scharakteryzowanych białek, CBP20 i CBP80 (Kmieciak i wsp., 2002), które jako kompleks wiążą się z 7-metyloguanozyną (czapeczką) obecną na końcu 5' transkryptów syntetyzowanych przez polimerazę RNA II (RNAP2). Jego funkcje w komórkach drożdżowych i zwierzęcych są dobrze opisane: kompleks CBC uczestniczy w dojrzewaniu końca 3' transkryptów (Cooke i Alwine, 1996; Flaherty i wsp., 1997), chroni transkrypty przed degradacją nukleolityczną (Furuichi i wsp., 1997; Balatsos i wsp., 2006), bierze udział w eksporcie mRNA z jądra (Hamm i Mattaj, 1990; Izauralde i wsp., 1992; Jaromłowski i wsp. 1994; Izauralde i wsp., 1995) i pozostaje związany z transkryptem podczas pierwszej rundy translacji (Ishigaki i wsp., 2001) i degradacji na drodze NMD (ang. nonsense mediated mRNA decay) (Hosoda i wsp., 2005). Co wzbudziło moje największe zainteresowanie, wykazano, że u drożdży i zwierząt kompleks CBC wspomaga oddziaływanie U1 snRNP z miejscem splicingowym 5' pierwszego intronu, zwiększając tym samym efektywność splicingu konstytutywnego (Izauralde i wsp., 1994; Ohno i wsp., 1987; Patzelt i wsp., 1987; Lewis i wsp., 1996; Lewis i wsp., 1996b). Co jednak najważniejsze, wpływ CBC na splicing potwierdzono również w komórkach roślinnych. W mutantach białka CBP20 lub CBP80 obserwowano wzrost ilości transkryptów z pozostawionym, najczęściej niewyciętym pierwszym intronem (Laubinger i wsp., 2008, Szarzyńska i wsp., 2009). Pytanie, które zadałam brzmiało: **czy roślinny kompleks CBC zaangażowany jest również w wybór alternatywnych miejsc splicingowych? Czy kompleks ten może promować składanie spliceosomu na pierwszym intronie?**

Aby odpowiedzieć na te pytania wykorzystałam liście z 35-dniowych roślin mutantów insercyjnych T-DNA *Arabidopsis thaliana* z unieczynnionymi genami *CBP20* lub/i *CBP80*: mutanty pojedyncze *cbp20* i *cbp80*, oraz mutantu podwójnego *cbp20/80*, który powstał ze skrzyżowania dwóch mutantów pojedynczych (**Raczyńska i wsp., 2010**). Wyizolowany RNA użyłam w reakcji RT-PCR z wykorzystaniem wspomnianej wyżej platformy AS RT-PCR. Zmiany w poziomie alternatywnie składanych izoform w przynajmniej jednym z mutantów zaobserwowałam w przypadku 101 analizowanych zdarzeń. W 41% tych przypadków zmiany były wspólne u wszystkich trzech analizowanych mutantów, co sugerowało, że wynikały one z zaburzenia składania kompleksu CBC. W przypadku więc tych transkryptów to kompleks, a nie poszczególne białka CBP, jest bezpośrednio zaangażowany w regulację splicingu alternatywnego. Analizy poziomu ekspresji tych transkryptów z wykorzystaniem dostępnych danych mikromacierzowych nie wykazały istotnych fluktuacji, wykluczając wpływ zmniejszonej stabilności pre-mRNA w mutantach CBC na poziom alternatywnie składanych izoform. Analizując te zdarzenia splicingowe głębiej dostrzegłam, że większość zmian obserwowanych u wszystkich trzech mutantów zlokalizowana jest w obrębie intronu położonego najbliższej struktury czapeczki, obecnej na końcu 5' pre-mRNA. Tak więc **roślinny, jądrowy kompleks CBC promuje splicing alternatywny w obrębie pierwszego intronu**, w czym przypomina działanie zwierzęcego kompleksu CBC podczas splicingu konstytutywnego. Jako że funkcja ta u zwierząt opiera się na wzmacnianiu oddziaływania U1 snRNP z miejscem

splicingowym 5', sprawdziłam udział zmienionych zdarzeń splicingowych w analizowanych mutantach *cbp*. Tak jak przypuszczałam, w obrębie pierwszego intronu najczęściej zmian dotyczyło wyboru alternatywnego miejsca splicingowego 5'. Nie zauważyłam preferencji w wyborze proksymalnego lub dystalnego miejsca splicingowego, co sugeruje, że nie tylko odległość od struktury czapeczki ale też siła poszczególnych miejsc splicingowych oraz obecność innych sekwencji (wzmacniających i wyciszających) może mieć znaczenie w regulacji splicingu alternatywnego z udziałem kompleksu CBC. Warto w tym miejscu wspomnieć, że stopień zachowawczości sekwencji w miejscach splicingowych wpływa na siłę oddziaływania z cząstkami rybonukleoprotein. U roślin zaobserwowano, że im mniejsza komplementarność w obrębie 9-nukleotydowej sekwencji zgodnej z U1 snRNA, tym większa częstotliwość alternatywnych zdarzeń splicingowych. Jakkolwiek, pełna komplementarność również może stymulować splicing alternatywny, gdyż wtedy opóźnione jest oddysocjowanie U1 snRNP i spowolnione są dalsze procesy składania spliceosomu (Baek i wsp., 2007). Podsumowując tę część, proponowałam, że **roślinny jądrowy kompleks CBC promuje wybór alternatywnych miejsc splicingowych 5' w obrębie pierwszego intronu, zwiększając tym samym poziom alternatywnie składanych transkryptów**.

Co ciekawe, w analizowanych mutantach nie zauważyłam znaczącej akumulacji transkryptów z pozostawionym, niewyciętym intronem pierwszym, opisywanej przez grupę Weigel'a (Laubinger i wsp., 2008). Prawdopodobnie wynika to z różnych podejść eksperymentalnych: wykorzystanie naszej platformy pozwala na głębsze, bardziej precyzyjne analizy niż ma to miejsce przy zastosowaniu mikromacierzy i umożliwia rozróżnienie konkretnych zdarzeń splicingowych w danym intronie. Z kolei zmiany, jakie zaobserwowałam, dotyczące zdarzeń zlokalizowanych w dalszych i ostatnich intronach, mogą wynikać z pośredniego wpływu białek CBP na ekspresję innych czynników splicingowych lub z oddziaływań przestrzennych pomiędzy czynnikami. Warte wspomnienia jest również to, że wśród pozostałych, zmienionych zdarzeń, najczęściej zmian obserwowałam w roślinach z mutacją białka CBP80, co sugeruje, że to właśnie ta podjednostka kompleksu, przypuszczalnie stanowiąca platformę oddziaływania z innymi czynnikami splicingowymi, ma większy wpływ na splicing alternatywny niż białko CBP20. Obserwacje te korelują z innymi doniesieniami naszej grupy wskazującymi, że w komórkach roślinnych CBP20 jest niestabilne poza kompleksem CBC. Mutant *cbp80* odpowiada więc niejako mutantowi podwójnemu *cbp20/cbp80* (Kierzkowski i wsp., 2009).

Podsumowując, w pracy **Raczyńska i wsp., 2010 pokazaliśmy po raz pierwszy wpływ jądrowego kompleksu CBC na splicing alternatywny**, skoncentrowany głównie, podobnie jak w przypadku splicingu konstytutywnego, na pierwszym intronie i oddziaływaniu U1 snRNP z miejscem donorowym. Taka funkcja kompleksu CBC **nie była dotychczas opisana ani w świecie roślin, ani w świecie zwierząt**, skąd pierwsze doniesienia na ten temat pojawiły się dopiero w 2011 roku (Lenasi i wsp., 2011).

Co ciekawe, w pracy Laubinger i wsp., 2008 pokazano, że podobny wpływ na zahamowanie splicingu konstytutywnego, co kompleks CBC, ma białko SE (SERRATE) - istotny czynnik w szlaku biogenezy roślinnych miRNA (Grigg i wsp., 2005; Lobbes i wsp., 2006; Yang i wsp., 2006; Dong i wsp., 2008; Rogers i Chen, 2013). Co więcej, zarówno w komórkach roślin jak i zwierząt SE i jego ludzki homolog, białko Ars2, lokalizowano w ciałkach jądrowych, bogatych w czynniki splicingowe (Fang i Spector, 2007; Gruber i wsp., 2009). Wspólny mianownik między opisywanymi białkami wyznacza też fakt, że podobnie jak w mutancie roślinnym z unieczynnionym białkiem SE, w mutantach *cbp* obserwowano obniżony poziom dojrzałych miRNA przy jednoczesnej akumulacji ich prekursorów (Gregory i wsp., 2008; Kim i wsp., 2008; Laubinger i wsp., 2008). Co więcej, fenotyp pojedynczych mutantów białek kompleksu CBC (*cbp20*, *cbp80*) i podwójnego mutantu (*cbp20/80*) oraz mutantu z niefunkcyjnym białkiem SE jest dosyć podobny: rośliny wykazują opóźnione

kwitnienie, ząbkowanie liści i nadwrażliwość na kwas abscysynowy (Hugouvieux i wsp., 2001; Bezzera i wsp., 2004; Papp i wsp., 2004; Grigg i wsp., 2005). Z uwagi więc na nakładające się funkcje CBC i SE w splicingu konstytutywnym i dojrzewaniu miRNA u roślin, kolejne pytania, jakie zadałam, brzmiały: **czy białko SE może regulować splicing alternatywny? Czy SE oddziałuje z białkami kompleksu CBC?** Uzyskane odpowiedzi opisałam w kolejnej pracy, **Raczyńska i wsp., 2014.**

W celu analizy wzajemnych oddziaływań wykorzystaliśmy technikę mikroskopową BIFC (ang. *Bimolecular Fluorescence Complementation*), którą przeprowadziliśmy we współpracy z Zakładem Biologii Molekularnej i Komórkowej IBMiB UAM, oraz technikę „pull down”. Rezultaty tych eksperymentów wykazały, że białko SE kolokalizuje i oddziałuje w jądrze komórkowym zarówno z białkiem CBP20 jak i CBP80. Wyniki te potwierdziłam następną techniką immunoprecypitacji, do której użyłam ekstraktów białkowe izolowane z roślin wykazujących nadekspresję białek FLAG-CBP oraz FLAG-SE. Podobnie, ludzki homolog SE, białko Ars2, oddziałuje z białkami kompleksu CBC w jądrze komórek ludzkich (Gruber i wsp., 2009). Nasze wyniki odbiegały jednak nieco od wcześniejszych doniesień z komórek roślinnych, w których pokazano, że białko SE oddziałuje tylko z mniejszą podjednostką kompleksu - CBP20 (Wang i wsp., 2013). We wspomnianych analizach nie uwzględniono jednak wszystkich możliwych kombinacji eksperymentalnych, uzyskując w efekcie fałszywie negatywne wyniki. Podsumowując, w niniejszej pracy **pokazaliśmy po raz pierwszy oddziaływanie białka SERRATE z obydwooma białkami kompleksu CBC, CBP20 i CBP80, w jądrze komórek roślinnych.**

Aby odpowiedzieć na inne, nurtujące nas pytanie, czy białko SE, podobnie jak białka kompleksu CBC, reguluje splicing alternatywny, wykorzystaliśmy ponownie naszą platformę AS RT-PCR. Eksperyment wykonałam na materiale pochodzącym z mutantu *se-1*, gdzie 7-nukleotydowa delecja w obrębie genu *SE* prowadzi do powstania нефunkcjonalnego, skróconego białka SE. W mutancie *se-1* w porównaniu do rośliny dzikiej zmiany w poziomie alternatywnie złożonych transkryptów zaobserwowałam w ~25% wszystkich, przeanalizowanych przypadków. Dodatkowo, wykorzystując rośliny z nadekspresją białka FLAG-SE i przeciwciał anty-FLAG wykonałam eksperyment typu immunoprecypitacji RNA (RIP, ang. *RNA immunoprecipitation*) dla 6 losowo wybranych genów i wykazałam, że SE może bezpośrednio wiązać pre-mRNA, których alternatywny splicing reguluje. Kolejne analizy, jakie przeprowadziłam, potwierdziły, że **SE, podobnie jak białka CBP, wpływa preferencyjnie na wybór alternatywnego miejsca donorowego w obrębie pierwszego intronu.** Podobnie jak w przypadku CBC, nie zaobserwowałam preferencji w wyborze proksymalnego lub dystalnego miejsca splicingowego. Co jednak istotne, 1/3 zmian w profilu splicingu alternatywnego obserwowanych w mutancie *se-1* pokrywała się ze zmianami obserwowanymi w mutantach kompleksu CBC, zmiany te dotyczyły preferencyjnie zdarzeń typu Alt 5' ss zlokalizowanych w pierwszym intronie. Natomiast wśród zdarzeń, które były zmienione jedynie w mutancie *se-1*, nie zaobserwowałam takiej korelacji. Wskazuje to na dwa aspekty: 1) zarówno SE jak i białka CBP nie są generalnymi czynnikami splicingowymi, jako że każdy z nich reguluje splicing alternatywny wybranej grupy transkryptów, prawdopodobnie oddziałując również z innymi faktorem; 2) profil zmian obserwowanych w mutantach *cbp* i *se-1* i wzajemne oddziaływanie tych białek wskazuje, że **dla pewnej grupy genów kompleks CBC i SE działają w sposób skoordynowany promując wybór alternatywnego miejsca splicingowego 5' w pierwszym intronie.**

Wciąż jednak nierozstrzygnięta pozostała kwestia, w jaki sposób SE reguluje splicing alternatywny pozostałych transkryptów. Zadałam więc pytanie, **czy inne białka, związane z biogenezą roślinnych miRNA, są również zaangażowane, wraz z SE, w regulację splicingu alternatywnego?**

Kolejne analizy z wykorzystaniem platformy AS RT-PCR wykonałam na materiale pochodzącym z mutantów białek HYL1 (ang. *HYPONASTIC LEAVES 1*) i DCL1 (ang. *DICER-LIKE 1*) - istotnych czynników szlaku dojrzewania roślinnych miRNA, o których wiadomo, że oddziałują z SE (Yang i wsp., 2006; Fujioka i wsp., 2007). Mutant *hyl1-2* to mutant insercyjny T-DNA, pozbawiony białka HYL1; mutant *dcl1-7* to mutant z mutacją punktową genu *DCL1* w obrębie domeny helikazowej białka, która prowadzi do powstania niefunkcjonalnego katalitycznie białka DCL1. Wśród 122 zmian w poziomie alternatywnie składanych izoform, jakie zaobserwowałam, tylko 9 okazało się być takich samych u wszystkich trzech mutantów: *se-1*, *hyl1-2* i *dcl1-7*. Głębsze analizy pozwoliły na wysunięcie dwóch, najważniejszych wniosków: 1) podobne zmiany obserwowane u wszystkich trzech mutantów nie wykazywały preferencji w wyborze miejsc splicingowych; 2) większość zmian obserwowałam u pojedynczych mutantów, co wskazuje, że chociaż SE, HYL1 i DCL1 wpływają na splicing alternatywny, obserwowany efekt jest prawdopodobnie pośredni, niezwiązany z udziałem dojrzałych cząsteczek miRNA. Podsumowując, **efekt, jaki na splicing alternatywny wywierają białka CBP i SE w kompleksie, ma inne podłoże niż wpływ wywierany przez pozostałe białka szlaku biogenezy miRNA**. Przypuszczamy, że funkcję regulatorowe mogłyby, na przykład, pełnić małe RNA nieprawidłowo wycinane z prekursorów na skutek zaburzonego szlaku biogenezy miRNA lub inne małe RNA których dojrzewanie również może zależeć od białek HYL1, SE i DCL1. Takie cząsteczki mogłyby nakierowywać jedną z alternatywnych izoform do degradacji, podobnie do roli jaką pełnią miRNA i siRNA. Badania pod tym kątem są obecnie kontynuowane w Zakładzie Ekspresji Genów.

Podsumowując nasze podejście badawcze - platforma AS RT-PCR jest dobrym i wciąż stosowanym narzędziem do analiz splicingu alternatywnego na mniejszą skalę (Schlaen i wsp., 2015, Simpson i wsp., 2016). Choć narzędzie to nie pozwala na globalną analizę jaką możemy uzyskać z zastosowaniem macierzy splicingowych (macierze zaprojektowane na egzony lub połączenia egzon-intron), czy wysokoprzepustowego sekwencjonowania transkryptomu, liczba możliwych do analizowania zdarzeń jest na tyle wysoka by wskazać generalny kierunek, w jakim dane białko reguluje splicing alternatywny (Raczyńska, i wsp., 2010; Raczyńska i wsp., 2014; Simpson i wsp., 2016). Ponadto, pozwala na głębsze analizy niż ma to miejsce przy zastosowaniu mikromacierzy, umożliwiając rozróżnienie konkretnych zdarzeń splicingowych w danym intronie. Proponowanym przez nas rozszerzeniem jest systematyczne dokumentowanie wszystkich uzyskanych w RT-PCR form splicingowych (poprzez ich klonowanie i sekwencjonowanie), co stanowi klucz do pełnej identyfikacji alternatywnie składanych izoform w komórkach roślinnych.

Podsumowując natomiast najważniejsze wyniki mojego osiągnięcia naukowego, wykazałam, że:

- białka jądrowego kompleksu CBC oraz białko SERRATE regulują splicing alternatywny wybranych genów *Arabidopsis thaliana*, promując wybór alternatywnych miejsc splicingowych 5' w obrębie pierwszego intronu;
- białko SE oddziałuje z białkami CBP20 i CBP80 w jądrze komórkowym *Arabidopsis thaliana*; kompleks CBC/SE wspólnie reguluje splicing alternatywny wybranej grupy genów;
- wpływ działania kompleksu CBC/SE na splicing alternatywny jest różny od wpływu, jaki na splicing alternatywny wywierają inne białka szlaku biogenezy miRNA.

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl **trzech** prac, których sumaryczny współczynnik wpływu IF (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi **16,948**, a liczba punktów **MNiSW** wynosi **80**. W ich skład wchodzi dwie oryginalne prace eksperymentalne, opublikowane w czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, znajdującym się w bazie *Journal Citation Reports*. Łączna liczba cytowań na chwilę obecną wynosi **42**. W obu publikacjach jestem pierwszym

autorem, który miał decydujący wpływ na ich powstanie wykonując większość analiz i prac eksperymentalnych oraz pisząc oba manuskrypty. W pracy przeglądowej stanowiącej rozdział w książce „Na pograniczu chemii i biologii” jestem jedynym autorem.

Literatura dodatkowa do punktu 4

- Baek J.M., Han P., Iandolino A., Cook D.R. (2008) Characterization and comparison of intron structure and alternative splicing between *Medicago truncatula*, *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol. Biol.*, 67:499-510.
- Balatsos N.A., Nilsson P., Mazza C., Cusack S., Virtanen A. (2006) Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J Biol. Chem.*, 281:4517-4522.
- Bezerra I.C., Michaels S.D., Schomburg F.M., Amasino R.M. (2004) Lesions in the mRNA cap-binding gene ABA HYPERSENSITIVE 1 suppress FRIGIDA-mediated delayed flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 40:112-119.
- Black D.L. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing, *Annu. Rev. Biochem.*, 72:291-336.
- Blencowe B.J. (2006) Alternative splicing: new inside from global analysis. *Cell*, 126:37-47.
- Chen M., Manley J.L. (2009) Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10:741-754.
- Cooke C., Alwine J.C. (1996) The cap and the 3' splice site similarly affect polyadenylation efficiency. *Mol. Cell Biol.*, 16:2579-2584.
- Dong Z., Han M.H., Fedoroff N. (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 105:9970-9975.
- Fang Y., Spector D.L. (2007) Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr. Biol.*, 17:818-823.
- Filichkin S.A., Priest H.D., Givan S.A., Shen R., Bryant D.W., Fox S.E., Wong W.K., Mockler T.C. (2010) Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 20:45-58.
- Flaherty S.M., Fortes P., Izaurralde E., Mattaj I.W., Gilmartin G.M. (1997) Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94:11893-11898.
- Fujioka Y., Utsumi M., Ohba Y., Watanabe Y. (2007) Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 48:1243-1253.
- Furuichi Y., LaFiandra A., Shatkin A.J. (1997) 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature*, 266:235-239.
- Graveley B.R. (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.*, 17:100-107.
- Grigg S.P., Canales C., Hay A., Tsiantis M. (2005) SERRATE coordinates shoot meristem function and leaf axial patterning in *Arabidopsis*. *Nature*, 437:1022-1026.
- Gregory B.D., O'Malley R.C., Lister R., Urlich M.A., Tonti-Filippini J., Chen H., Millar A.H., Ecker J.R. (2008) A link between RNA metabolism and silencing affecting *Arabidopsis* development. *Dev. Cell*, 14:854-866.
- Gruber J.J., Zatechka D.S., Sabin L.R., Yong J., Lum J.J., Kong M., Zong W.X., Zhang Z., Lau C.K., Rawlings J., Cherry S., Ihle J.N., Dreyfuss G., Thompson C.B. (2009) Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell*, 138:328-339.
- Hamm J. and Mattaj I.W. (1990) Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell*, 63:109-118.
- Hosoda N., Kim Y.K., Lejeune F., Maquat L.E. (2005) CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12:893-901.
- Hugouvieux V., Kwak J.M., Schroeder J.I. (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell*, 106:477-487.
- Ishigaki Y., Li X., Serin G. and Maquat L.E. (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*, 106:607-617.
- Izaurralde E., Stepinski J., Darzynkiewicz E., Mattaj I.W. (1992) A cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs. *J. Cell Biol.*, 118:1287-1295.
- Izaurralde E., Lewis J., McGuigan C., Jankowska M., Darzynkiewicz E., Mattaj I.W. (1994) A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell*, 78:657-668.
- Izaurralde E., Lewis J., Gamberi C., Jarmolowski A., McGuigan C., Mattaj I.W. (1995) A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature*, 376:709-712.
- Jarmolowski A., Boelens W.C., Izaurralde E., Mattaj I.W. (1994) Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* 124:627-635.

- Kierzkowski D., Kmiecik M., Piontek P., Wojtaszek P., Szweykowska-Kulinska Z., Jarmolowski A. (2009) The *Arabidopsis* CBP20 targets the cap-binding complex to the nucleus and is stabilized by CBP80. *Plant J.*, 59:813-823.
- Kim E., Magen A., Ast G. (2007) Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, 35:125-131.
- Kim S., Yang J.Y., Xu J., Jang I.C., Prigge M.J., Chua N.H. (2008) Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary MicroRNAs. *Plant Cell. Physiol.*, 49:1634-1644.
- de Klerk E., 't Hoen P.A. (2015) Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genet.*, 31(3):128-139.
- Kmiecik M., Simpson C.G., Lewandowska D., Brown J.W.S., Jarmolowski A. (2002) Cloning and characterization of two subunits of *Arabidopsis thaliana* nuclear cap-binding complex. *Gene*, 283: 171-183.
- Laubinger S., Sachsenberg T., Zeller G., Busch W., Lohmann J.U., Ratsch G., Weigel D. (2008) Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105:8795-8800.
- Lenasi T., Peterlin B.M., Barboric M. (2011) Cap-binding protein complex links pre-mRNA capping to transcription elongation and alternative splicing through positive transcription elongation factor b (P-TEFb). *J Biol. Chem.*, 286:22758-22768.
- Lewis J.D., Izaurralde E., Jarmolowski A., McGuigan C., Mattaj I.W. (1996) A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site. *Genes Dev.*, 10:1683-1698.
- Lewis J.D., Görlich D., Mattaj I.W. (1996) A yeast cap binding protein complex (yCBC) acts at an early step in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.*, 24:3332-3336.
- Lobb D., Rallapalli G., Schmidt D.D., Martin C., Clarke J. (2006) SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Rep.*, 7:1052-1058.
- Lu Z.X., Jiang P., Xing Y. (2012) Genetic variation of pre-mRNA alternative splicing in human populations. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 3(4):581-592.
- Marquez Y., Brown J.W., Simpson C., Barta A., Kalyna M. (2012) Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Res.*, 22(6):1184-1195.
- Meyer K., Koester T., Staiger D. (2015) Pre-mRNA splicing in plants: *in vivo* functions of RNA-binding proteins implicated in the splicing process. *Biomolecules*, 5:1717-1740.
- Ner-Gaon H., Halachmi R., Savaldi-Goldstein S., Rubin E., Ophir R., Fluhr R. (2004) Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 39:877-885.
- Ohno M., Sakamoto H., Shimura Y. (1987) Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84:5187-5191.
- Pan Q., Shai O., Lee L.J., Frey B.J., Blencowe B.J. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.*, 40:1413-1415.
- Papp I., Mur L.A., Dalmadi A., Dulai S., Koncz C. (2004) A mutation in the cap binding protein 20 gene confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 55:679-686.
- Patzelt E., Thalmann E., Hartmuth K., Blaas D., Kuechler E. (1987) Assembly of pre-mRNA splicing complex is cap dependent. *Nucleic Acids Res.*, 15:1387-1399.
- Raczyńska K.D.** (2010) Splicing alternatywny jako jeden z mechanizmów regulacji ekspresji genów u roślin i zwierząt. *Na pograniczu chemii i biologii*, Wydawnictwo UAM, 24:63-100.
- Raczyńska K.D.**, Simpson C.G., Ciesiołka A., Szelew L., Lewandowska D., McNicol J., Szweykowska-Kulińska Z., Brown J., Jarmolowski A. (2010) Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic. Acids Res.*, 38:265-278.
- Raczyńska K.D.**, Stępień A., Kierzkowski D., Kalak M., Bajczyk M., McNicol J., Simpson C.G., Szweykowska-Kulińska Z., Brown J. W., Jarmolowski A. (2014) The SERRATE protein is involved in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic. Acids Res.*, 42(2):1222-1244.
- Reddy A.S.N. (2007) Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58:267-294.
- Rogers K., Chen X. (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 25(7):2383-2399.
- Ru Y., Wang B.B., Brendel V. (2008) Spliceosomal proteins in plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 326:1-15. In: Reddy A.S.N., Golovkin M. (ed.), *Nuclear pre-mRNA processing in plants*. Springer, Heidelberg, 326:1-15
- Schlaen R.G., Mancini E., Sanchez S.E., Perez-Santángelo S., Rugnone M.L., Simpson C.G., Brown J.W., Zhang X., Chernomoretz A., Yanovsky M.J. (2015) The spliceosome assembly factor GEMIN2 attenuates the effects of temperature on alternative splicing and circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 112(30):9382-9387.
- Simpson C.G., Lewandowska D., Fuller J., Maronova M., Kalyna M., Davidson D., McNicol J., **Raczyńska D.**, Jarmolowski A., Barta A., Brown J.W.S. (2008) Alternative splicing in plants. *Biochem. Soc. Trans.*, 36:508-510.

- Simpson, C.G., Fuller, J., Maronova, M., Kalyna, M., Davidson, D., McNicol, J., Barta, A., Brown, J.W.S. (2008b) Monitoring changes in alternative precursor messenger RNA splicing in multiple gene transcripts. *Plant J.*, 53:1035–1048.
- Simpson C.G., Manthri S., **Raczyńska K.D.**, Kalyna M., Lewandowska D., Kusenda B., Maranova M., Szweykowska-Kulińska Z., Jarmolowski A., Barta A., Brown J.W.S. (2010) Regulation of plant gene expression by alternative splicing. *Biochem. Soc. Trans.*, 38:667-671.
- Simpson C.G., Fuller J., Calixto C.P., McNicol J., Booth C., Brown J.W., Staiger D. (2016) Monitoring alternative splicing changes in Arabidopsis circadian clock genes. *Methods Mol. Biol.*, 1398:119-132.
- Szarzynska B., Sobkowiak L., Pant B.D., Balazadeh S., Scheible W.R., Mueller-Roeber B., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulinska Z. (2009) Gene structures and processing of Arabidopsis thaliana HYL1-dependent pri-miRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 37(9):3083-3093.
- Syed N.H., Kalyna M., Marquez Y., Barta A., Brown J.W. (2012) Alternative splicing in plants--coming of age. *Trends Plant Sci.*, 17(10):616-623.
- Wang B.B., Brendel V. (2004) The ASRG database: identification and survey of Arabidopsis thaliana genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biol.* 5, R102.
- Wang B.B., Brendel V. (2006) Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103:7175-7180.
- Wang E.T., Sandberg R., Luo S., Khrebtkova I., Zhang L., Mayr C., Kingsmore S.F., Schroth G.P., Burge C.B. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456:470-476.
- Wang L., Song X., Gu L., Li X., Cao S., Chu C., Cui X., Chen X., Cao X. (2013) NOT2 proteins promote polymerase II-dependent transcription and interact with multiple MicroRNA biogenesis factors in Arabidopsis. *Plant Cell.*, 25:715-727.
- Yang L., Liu Z., Lu F., Dong A., Huang H. (2006) SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J.*, 47:841-850.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy należący do pozostałych osiągnięć, niezwiązanych z publikacjami do przewodu habilitacyjnego, obejmuje **9 prac**, w tym 4 prace eksperymentalne (**Rurek i wsp., 2003; Pawłowski i wsp., 2005; Raczyńska i wsp., 2006; Raczyńska i wsp., 2015**) i 5 prac przeglądowych (**Raczyńska i Augustyniak, 2003; Raczyńska i Augustyniak, 2005; Raczyńska i Augustyniak, 2007; Simpson i wsp., 2008, Simpson i wsp., 2010**).

Główny nurt mojej pracy naukowo-badawczej prowadzonej do czasu uzyskania stopnia doktora dotyczył badań związanych z biologią molekularną mitochondriów roślinnych, który to temat rozpoczęłam już na studiach, podczas wykonywania pracy magisterskiej w Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin (obecnie Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej) IBMiB UAM pod kierunkiem prof. dr hab. Haliny Augustyniak. Z tym okresem ściśle wiążą się 3 prace doświadczalne (**Rurek i wsp., 2003; Pawłowski i wsp., 2005; Raczyńska i wsp., 2006**) oraz 3 prace przeglądowe (**Raczyńska i Augustyniak, 2003; Raczyńska i Augustyniak, 2005, Raczyńska i Augustyniak, 2007**). W tym czasie współpracowałam z grupą dr José Gualberto z Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, w Strasbourgu we Francji. Tematyka mitochondriów roślinnych była prowadzona w Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin od wielu lat, mitochondria stanowią bowiem niezwykle ciekawy obiekt badawczy nie tylko ze względu na swoją istotną funkcję ale również na złożony i bardzo mało poznany genom.

Mitochondria są uważane za „centra energetyczne” komórek eukariotycznych. Dominującą funkcją tych organelli jest bowiem wytwarzanie wysokoenergetycznego przenośnika energii - cząsteczki ATP. Stopniowe uwalnianie i gromadzenie energii odbywa się wzdłuż zlokalizowanego na wewnętrznej błonie mitochondrialnej łańcucha oddechowego, który jest zespołem oksydacyjno-redukcyjnych przenośników uszeregowanych według wzrastającego powinowactwa do elektronów. Co interesujące, mitochondria posiadają własny, ulegający ekspresji materiał genetyczny, który, w porównaniu do genomu mitochondrialnego zwierząt i grzybów, charakteryzuje się znaczną wielkością oraz zmiennością organizacji i składu w obrębie gatunków. W mitochondrialnym DNA (mtDNA) roślin wyższych

zidentyfikowano 50-60 genów, co stanowi średnio tylko 10% całego genomu; pozostałą część obejmują sekwencje powtórzone, pseudogeny, introny, fragmenty sekwencji przeniesionych z jądra i chloroplastów oraz sekwencje o nieznannej jeszcze funkcji. Geny mitochondrialne stanowią sekwencje kodujące około 20 cząsteczek tRNA, trzech rRNA oraz 35 białek, wśród których najliczniejszą grupę stanowią geny *nad*, kodujące podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego - oksydoreduktazy NADH:ubichinon (Bendich, 1996; Jańska i Wołoszyńska, 1997; Burger i wsp., 2003; Knoop, 2004).

Główny cel badawczy realizowany wówczas w Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin krystalizował się wokół procesu biogenezy mitochondriów roślinnych z uwzględnieniem warunków stresu temperaturowego oraz analizy poziomu ekspresji wybranych genów kodujących podjednostki kompleksu I. W okresie mojej pracy badawczej wiele genomów mitochondrialnych zostało już zsekwencjonowanych, w tym mtDNA roślin: *Marchantia polymorpha* (Oda i wsp., 1992), *Arabidopsis thaliana* (Unselid i wsp., 1997), *Beta vulgaris* (Kubo i wsp., 2000), *Oryza sativa* (Notsu i wsp., 2002), *Brassica napus* (Handa, 2003), *Zea mays* (Clifton i wsp., 2004), *Nicotiana tabacum* (Sugiyama i wsp., 2005) i *Triticum aestivum* (Ogihara i wsp., 2005). Znajomość genomów pozwoliła na przeprowadzenie wstępnych analiz porównawczych. I tak, okazało się, że lokalizacja genów *nad* w mtDNA jest dość nieokreślona i wykazuje zróżnicowanie nawet u spokrewnionych organizmów. Porównanie poznanych sekwencji ujawniło natomiast duży stopień homologii w obrębie sekwencji kodujących; zachowawczość wykazują też miejsca redagowania. Dużą zmiennością charakteryzują się natomiast sekwencje niekodujące, a wśród nich rejony 5'UTR i 3'UTR genów. Ponadto, okazało się, że mRNA genów *nad* może wchodzić w skład różnych jednostek transkrypcyjnych lub ko-transkrypcyjnych (Haouazine i wsp., 1993; Itchoda i wsp., 2002).

Liczba pojawiających się transkryptów mitochondrialnych zależy w dużej mierze od wydajności transkrypcji, której przebieg ma ścisły związek z budową promotorów i liczbą kopii genu (Kühn i wsp., 2005). Na poziom stabilnych transkryptów wpływają również procesy potranskrypcyjne, obejmujące: *cis* i *trans* splicing, redagowanie RNA oraz obróbkę końców 5' i 3' (Giege i wsp., 2000; Giege i Brennicke, 2001; Hoffmann i wsp., 2001; Binder i Brennicke, 2003). Poziom stabilnych RNA zależy również od występowania specyficznych struktur i sekwencji w rejonie 3'UTR. Za czynnik stabilizujący przyjmuje się obecność na końcu 3' sekwencji odwrotnie powtórzonych, tworzących struktury pętli. Natomiast, czynnikiem destabilizującym mitochondrialny mRNA roślin jest dołączanie do końca 3' ogonów poliadenylowanych, co zwiększa podatność transkryptu na działanie nukleaz i indukuje jego degradację. Wiele zagadnień związanych z dojrzewaniem i stabilnością transkryptów, oraz zaangażowanych w te procesy białek omówiłam w pracy przeglądowej „Wpływ dojrzewania mitochondrialnych transkryptów roślin na ich stabilność” (**Raczyńska i Augustyniak, 2003**).

Podsumowując, liczne rearanżacje DNA, specyficzna budowa niektórych genów, oraz złożone procesy dojrzewania mRNA utrudniają często interpretację obrazu mitochondrialnych transkryptów roślin. W cyklu doświadczeń opisanych w publikacji **Rurek i wsp., 2003** podjęliśmy się próby zbadania organizacji genów *nad6* i *nad9* w mtDNA wybranych gatunków łubinu i określenia transkryptów tych genów. Analizy zostały przeprowadzone z wykorzystaniem etiolowanych siewek czterech gatunków łubinu: łubinu żółtego (*Lupinus luteus*), łubinu białego (*L. albus*), łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) oraz łubinu andyjskiego (*L. mutabilis*). Wykazaliśmy, że sekwencja nukleotydowa *nad6* i *nad9* oraz organizacja obu genów w genomie mitochondrialnym rodzaju *Lupinus* jest silnie zachowawcza. Ponadto, oba geny syntetyzowane są jako monocistronowe transkrypty niezależnie od analizowanej tkanki (hipokotyle, korzenie, kalus, kultury zawieszinowe). Wyniki te kontrastowały z dotychczasowymi doniesieniami, które opisywały zmienną lokalizację tych genów w mtDNA roślin nasiennych oraz zróżnicowaną budowę ich jednostek transkrypcyjnych. (Kubo i wsp., 2000; Notsu i wsp., 2002; Lu i Hanson, 1996; Nakazono i

wsp., 1996). Analizy stopnia redagowania mRNA genu *nad6* i *nad9* wskazały niewielkie zróżnicowanie u różnych przedstawicieli rodzaju *Lupinus*. Analiza miejsca startu transkrypcji wykazała natomiast, że promotor genu *nad9* wykazuje zróżnicowaną budowę w łubinie żółtym w porównaniu do łubinu wąskolistnego, co wpływa na odmienny obraz startu transkrypcji *nad9* we wspomnianych gatunkach. Zasugerowaliśmy, że zmienność ta mogłaby zostać wykorzystana jako molekularny marker służący w studiach populacyjnych do rozróżnienia niektórych gatunków łubinów. Opisywana praca przedstawiała po raz pierwszy bardziej całościowy obraz transkrypcji mitochondrialnych genów *nad*, na przykładzie genów *nad6* i *nad9*, u przedstawicieli rodziny motylkowatych.

Warto w tym miejscu wspomnieć, że niedawno zidentyfikowano białko odpowiedzialne za dojrzewanie końca 5' genu *nad6* rzodkiewnika, należące do rodziny białek wiążących kwasy nukleinowe - białek PPR (Hauler i wsp. 2013). Nazwa tych białek pochodzi od występowania w nich 2-26 zdegenerowanych, 35-aminokwasowych powtórzeń (ang. *pentatricopeptide repeat*) ułożonych tandemowo przynajmniej w jednej parze (Small i Peeters, 2000). Białka PPR są szczególnie rozpowszechnione u roślin wyższych (około 450 zidentyfikowanych białek), a zlokalizowane są w większości w mitochondriach i chloroplastach, gdzie pełnią różnorakie funkcje związane z metabolizmem RNA: redagowanie, splicing czy dojrzewanie transkryptów. Charakterystykę ich budowy i znane ówczesznie funkcje białek PPR szerzej opisałam w pracy przeglądowej „Białka PPR wiążące kwasy nukleinowe” (Raczyńska i Augustyniak, 2005).

W kolejnych latach mojej pracy naukowej skoncentrowałam swoje badania na innym materiale - kalafiorze. Było to podyktowane tym, że genom mitochondrialny gatunków blisko spokrewnionych, w tym *Arabidopsis thaliana* i *Brassica napus* był już znany (Unselid i wsp., 1997; Handa, 2003), co ułatwiało ewentualne porównanie sekwencji mitochondrialnych DNA, a co stanowiło duży problem przy analizach mtDNA łubinu. Ponadto, zawiązki kwiatostanów kalafiora okazały się bogatym źródłem sprzężonych mitochondriów o wysokim stopniu czystości. W okresie tym uczestniczyłam w eksperymentach mających na celu wstępne scharakteryzowanie proteomu mitochondrialnego *Brassica oleracea* var. *botrytis* (Pawłowski i wsp., 2005). Frakcje białek błonowych i białek rozpuszczalnych analizowane były w warunkach dwukierunkowej elektroforezy łączącej ogniskowanie izoelektryczne z rozdziałem w denaturującym żelu poliakrylamidowym (IEF/ SDS-PAGE). Uzyskane mapy proteomu mitochondrialnego kalafiora porównaliśmy z dostępnymi danymi odnośnie proteomu mitochondrialnego *A. thaliana* (Kruft i wsp., 2001; Millar i wsp., 2001). Mapy obu proteomów okazały się być bardzo podobne, udało się nawet wytypować 30 białek mitochondrialnych kalafiora będących przypuszczalnymi homologami odpowiednich białek mitochondrialnych rzodkiewnika. Należy podkreślić, że analizowany przez nas proteom mitochondrialny kalafiora był wówczas pierwszym opublikowanym proteomem mitochondrialnym przedstawiciela rodzaju *Brassica* i drugim proteomem mitochondrialnym przedstawiciela rodziny Brassicaceae. Warto również wspomnieć, że stopień złożoności roślinnego proteomu mitochondrialnego jest wciąż zagadnieniem dyskusyjnym; uważa się, że może on zawierać przynajmniej 1500 różnych białek (Taylor i wsp., 2011).

Do najważniejszej publikacji mojego dorobku z tego okresu zaliczam pracę bezpośrednio związaną z pobytem w Institut de Biologie Moléculaire des Plantes w Strasbourgu (Francja). Wizyty tam odbywałam w 2003-2004 roku w ramach dwóch, trzymiesięcznych grantów przyznanych mi przez fundację EMBO i FEBS, oraz dwóch krótkoterminowych pobytów (opisane w załączniku nr 3). Publikacja (Raczyńska i wsp., 2006) powstała w wyniku współpracy z dwiema grupami badawczymi tego ośrodka, kierowanymi przez dr G r ldine Bonnard i dr José Gualberto. Podjęliśmy w niej pr b  charakterystyki ekspresji mitochondrialnych genów *nad6* i *ccmC* kalafiora i rzodkiewnika na poziomie RNA i białka. Należy podkreślić, że w trakcie tych analiz sekwencja genomu mitochondrialnego kalafiora nie była wciąż jeszcze znana - opublikowana została dopiero niedawno (Grewe i wsp., 2014;

Tanaka i wsp., 2014). Szersza charakterystyka rejonów 5'UTR genów mitochondrialnych *Arabidopsis thaliana* również została opisana dopiero w późniejszym okresie (Kühn i wsp., 2009). Wszystkie wyniki badań uzyskane w naszej pracy były więc pierwszymi doniesieniami na temat budowy transkryptów mitochondrialnych genów *nad* kalafiora w literaturze.

Jedną z analiz przeprowadzonych w celu bliższej charakterystyki mitochondrialnych genów kalafiora (między innymi *nad6*, *nad9* i *ccmC*) było określenie sekwencji rejonów 3'UTR, z zastosowaniem techniki cRT-PCR (ang. circular *RT-PCR*). Podczas tych analiz zauważyłam, że 3' koniec transkryptu genu *nad6* znajduje się w obrębie sekwencji kodującej genu, powyżej kodonu stop. Skrócony transkrypt był obecny w materiale izolowanym zarówno z mitochondriów kalafiora jak i *Arabidopsis thaliana*. W kolejnych analizach wykluczyłam wpływ redagowania, obecność dodatkowego egzonu czy poliadenylacji w powstawaniu alternatywnego kodonu stop oraz nie wykazałam tkankowo-specyficznych różnic w obrazie dojrzewania transkryptów genu *nad6* kalafiora ani rzodkiewnika. Taka sytuacja była wyjątkowa - zarówno w przypadku pszenicy (Haouazine i wsp., 1993) jak i różnych gatunków łubinu (moje nieopublikowane dane) transkrypt genu *nad6* identyfikowany był jako mRNA pełnej długości, posiadający kodon stop. Natomiast, podobny obraz skróconego transkryptu genu *nad6* opisano dopiero później w mtDNA słonecznika (Placido i wsp., 2009). Wreszcie, wykorzystując ultrawirowanie kompleksów zawierających transkrypty mitochondrialne w gradiencie sacharozowym stwierdziłam, że mRNA genu *nad6* oddziałuje z frakcją polisomów o wysokiej masie cząsteczkowej, co sugerowało, że transkrypt taki może podlegać translacji prowadząc do syntezy skróconego o 5-6 aminokwasów białka NAD6. Równolegle, podobne obserwacje poczyniliśmy analizując transkrypt genu białka biogenezy cytochromu C, *ccmC* rzodkiewnika, który również kończył się przed kodonem stop i był identyfikowany na polisomach. Mimo, że obecność transkryptów na polisomach nie jest jeszcze bezpośrednim dowodem na zachodzenie translacji, przypuszczaliśmy, że białka te są syntetyzowane, jako że oba są silnie zakonserwowane w świecie ożywionym i niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Ponadto, dzięki dostępności specyficznych przeciwciał anti-CcmC byliśmy w stanie wykazać obecność we frakcji mitochondrialnych białek *Arabidopsis* sygnału, którego masa cząsteczkowa odpowiadała teoretycznej wielkości białka syntetyzowanego z wykorzystaniem transkryptów *ccmC* nie zawierających kodonu stop. Reasumując, opisaliśmy wówczas po raz pierwszy obecność w genomie mitochondrialnym roślin wyższych funkcjonalnych transkryptów, które mimo braku kodonu stop wiążą się do polisomów i prawdopodobnie są przepisywane na białka. Praca (**Raczyńska i wsp., 2006**) jest bardzo dobrze cytowana, co podkreśla jej pionierski charakter na tym polu. Jedyna, do tego czasu podobna obserwacja pochodziła z badań nad mitochondriami komórek ludzkich, gdzie zidentyfikowano skrócony, pozbawiony kodonu stop transkrypt genu *atp6*, który pozostawał stabilny i podlegał translacji oraz wbudowaniu w funkcjonalny kompleks V - syntazę ATP (Chrzanowska-Lightowlers i wsp., 2004).

Wciąż niejasne pozostaje, jak takie transkrypty bez kodonu stop uwalniane są z rybosomów, sugerowaliśmy nawet mechanizm trans-translacji podobny do tego, występującego w komórkach bakterii, wykorzystujący cząsteczkę tmRNA (ang. transfer-messenger RNA). W tym jednak mechanizmie polipeptydy uwalniane z rybosomów są kierowane do degradacji (opisane szerzej w pracy przeglądowej **Raczyńska i Augustyniak, 2007**). Podobnie, w przypadku transkryptów pozbawionych kodonu stop w komórkach drożdży i ssaków translacja jest wcześniej hamowana, a skrócone transkrypty i wadliwe polipeptydy po uwolnieniu z rybosomów są degradowane (Frishmeyer i wsp., 2002, van Hoof, 2002 i wsp., Akimitsu i wsp., 2007; Inada, 2013). Wiele zagadnień związanych z degradacją nieprawidłowych transkryptów omówiłam we wspomnianej wyżej pracy przeglądowej (**Raczyńska i Augustyniak, 2007**). Opisałam znane wówczas szlaki degradacji prawidłowych transkryptów w komórkach zwierzęcych, roślinnych i drożdżowych. Następnie, przedstawiłam

mechanizmy rozpoznawania transkryptów wadliwych, posiadających przedwczesny kodon stop i ich degradację na drodze NMD. Wreszcie, opisałam mechanizm degradacji transkryptów bez kodonu stop w komórkach bakteryjnych z udziałem cząsteczki tmRNA.

W okresie tym rozpoczęłam już pracę w nowej grupie badawczej, w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej i prof. dr hab. Artura Jarmołowskiego. Praca moja koncentrowała się wówczas na procesie splicingu alternatywnego i została szeroko opisana w ramach osiągnięcia habilitacyjnego. Warto jednak w tej części wspomnieć o dwóch pracach przeglądowych, jakie się również pojawiły w tym czasie, których byłam współautorem. W roku 2008 powstała praca opisująca dotychczasowy stan wiedzy na temat zdarzeń splicingu alternatywnego zachodzących u roślin, ich znaczenia i sposobów detekcji (**Simpson i wsp., 2008**). Opisał w niej system monitorowania poziomu alternatywnie składanych izoform czyli platformę AS RT-PCR zawierającą ponad 400 par starterów, która została stworzona pierwotnie w SCRI i uzupełniona potem również o zestaw starterów, które zaprojektowałam w Poznaniu (Simpson i wsp., 2008b). W kolejnej pracy przeglądowej (**Simpson i wsp., 2010**) opisałam szerzej białka regulujące splicing alternatywny u roślin, włączając białka z rodziny SR oraz białka kompleksu CBC (doniesienie naszej grupy opisane w pracy **Raczyńska i wsp., 2010**). Ponadto, opisałam związek pomiędzy splicingiem alternatywnym a NMD, prowadzący do regulacji poziomu alternatywnych izoform z przedwczesnym kodonem stop.

W październiku 2010 roku rozpoczęłam staż doktorski w Zakładzie Biologii Komórki na Uniwersytecie Berneńskim w Szwajcarii, pod kierunkiem profesora Daniela Schümperli. Ten światowej sławy naukowiec zaproponował mi współpracę w tematyce związanej z dojrzewaniem końca 3' transkryptów genów zachowawczych histonów rdzeniowych w komórkach ludzkich. W okresie tym, wciąż koncentrując się na jakże bliskiej mi tematyce RNA oraz analizy potranskrypcyjnych procesów dojrzewania mRNA, zmieniałam więc całkowicie materiał badawczy – rozpoczęłam pracę na komórkach ludzkich HEK293T i HeLa. Powodów takiego działania było kilka. Najważniejsze z nich to, po pierwsze, rozwinięcie mojego warsztatu badawczego. Podczas stażu doktorskiego zdobyłam ogromną wiedzę eksperymentalną dotyczącą ludzkich linii komórkowych, ich hodowli, transformacji czy synchronizacji komórek, co pozwoliło mi płynnie przejść z badań na roślinach do badań na komórkach zwierzęcych. Dodatkowo, poszerzałam swoją wiedzę na temat różnych mechanizmów biochemicznych, które do tej pory analizowałam głównie w komórkach roślinnych, o aspekt zwierzęcy. Praca w dobrym laboratorium pod okiem wyśmienitego naukowca, jakim jest profesor Daniel Schümperli, i jego grupy badawczej pozwoliła mi na znaczne rozwinięcie się w tym obszarze. Drugim powodem, równie istotnym, było znalezienie obszaru badawczego w rozbudowanym świecie badań molekularnych RNA, który w przyszłości miałaby umożliwić mi stworzenie własnej grupy badawczej, skoncentrowanej na tematyce, którą rozpoczęłam podczas stażu doktorskiego i kontynuuję do dziś. Opisane poniżej, uzyskane do tej pory wyniki i sukcesy, jakie odniosłam, pozwalają mi śmiało stwierdzić, że droga, którą wybrałam jest słuszna.

Ekspresja genów zachowawczych histonów rdzeniowych (histony H2A, H2B, H3 i H4 oraz histon łącznikowy H1) w komórkach *Metazoa* jest regulowana cyklem komórkowym. Aktywację transkrypcji, wydajnego dojrzewania końca 3' i zwiększoną stabilność histonowych mRNA obserwujemy na granicy faz G1/S. W efekcie poziom histonowych transkryptów wzrasta ~35-krotnie w fazie replikacji (faza S), gdy zapotrzebowanie na histony, wymagane do upakowania nowo zsyntetyzowanego DNA, jest największe (Lüscher i Schümperli, 1987; Harris i wsp., 1991). Pod koniec fazy S, kiedy ilość histonowych białek musi być zredukowana, ekspresja tych genów zostaje zahamowana. Taka ścisła regulacja gwarantuje wysoki poziom histonów na potrzeby upakowania nowo zsyntetyzowanego DNA i zapobiega toksycznemu gromadzeniu się nadmiaru białek poza fazą S, kiedy nie są one już potrzebne. Deregulacja może

prowadzić do zaburzeń w ekspresji innych genów, zatrzymania cyklu komórkowego (areszt komórki) czy niestabilności chromosomów.

Wśród istotnych czynników regulujących ekspresję histonowych genów jest czynnik transkrypcyjny NPAT, który aktywuje transkrypcję oddziałując z promotorami genów histonowych w fazie S (Ma i wsp., 2000). Wzrost wydajności dojrzewania końca 3' gwarantuje natomiast kompleks HCC (ang. *Histone Cleavage Complex*), w skład którego wchodzi wiele białek kompleksu „cięcia i poliadenylacji” oraz unikatowe czynniki, wśród nich: kompleks U7 snRNP i białko SLBP (ang. *Stem Loop Binding Protein*) (Müller i Schümperli, 1997; Pillai i wsp., 2001; Pillai i wsp., 2003). Dojrzewanie końca 3' histonowych pre-mRNA w komórkach *Metazoa* jest unikatowym procesem, jako że transkrypty te nie są poliadenylowane, a jedynie przecinane z udziałem endonukleazy CPSF73 (Domiński i Marzluff, 2007, Romeo i Schümperli, 2016). U7 snRNP i białko SLBP rozpoznają specyficzne elementy *cis* położone w rejonie 3'UTR transkryptów histonowych. Koniec 5' U7 snRNA oddziałuje na zasadzie parowania komplementarnych zasad z motywem HDE (ang. *Histone Downstream Element*) położonym poniżej specyficznej struktury drugorzędowej, rozpoznawanej z kolei przez SLBP. Oddziaływania te definiują miejsce cięcia tuż za strukturą drugorzędową, powyżej motywu HDE (Schaufele i wsp., 1986; Bond i wsp., 1991, Wang i wsp., 1996; Martin i wsp., 1997).

Choć, podobnie jak w przypadku poliadenylowanych mRNA, transkrypcja i dojrzewanie 3' końca histonowych pre-mRNA to procesy skorelowane, wciąż nie do końca wiadomo jak wzajemnie interagują ze sobą wszystkie czynniki. Projekt, który rozpoczęłam podczas stażu podoktorskiego skupiał się na poszukiwaniu nowych białek zaangażowanych w ekspresję histonowych genów. Postawiłam sobie za cel poszerzenie wiedzy na temat ścisłej regulacji tego procesu podczas cyklu komórkowego i specyficznego dojrzewania końca 3' histonowych transkryptów. Przedmiotem moich dociekań stały się zwłaszcza białka oddziałujące z U7 snRNP, uczestniczące w rozpoznaniu histonowych pre-mRNA i „ładowaniu” kompleksu HCC w pobliże miejsca cięcia.

Do realizacji projektu przygotowałam stabilne linie komórkowe wykazujące nadekspresję U7 snRNA wydłużonego o specyficzne struktury drugorzędowe MS2. Częsteczki U7 snRNAxMS2 prawidłowo składały się w kompleks U7 snRNP i posłużyły następnie w technice chromatografii powinowactwa do precypitacji białek oddziałujących z U7 snRNP. Wśród zidentyfikowanych białek moje szczególne zainteresowanie wzbudziło białko FUS, na którym następnie skoncentrowałam największą uwagę. Wyniki eksperymentów, które uzyskałam w tym okresie zostały już dobrze opublikowane (**Raczyńska i wsp., 2015**). Jeszcze podczas stażu podoktorskiego na Uniwersytecie Berneńskim potwierdziłam techniką immunoprecypitacji oddziaływanie FUS z U7 snRNA/U7 snRNP i transkryptami genów histonowych. Co ciekawe, najsilniejsze wiązanie obserwowałam podając do eksperymentu ekstrakty z komórek synchronizowanych do fazy S, co wskazywało, że oddziaływania te są zależne od cyklu komórkowego. Badania te kontynuowałam następnie po powrocie do Polski, dzięki finansowaniu w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki program OPUS (UMO-2012/05/B/NZ2/00826, czas realizacji 2013-2016), którego byłam kierownikiem: „Analiza nowych białek oddziałujących z U7 snRNA i poszukiwanie nowych funkcji cząsteczki U7 snRNP”. W kolejnych eksperymentach pokazałam, że dojrzewanie końca 3' transkryptów histonowych jest zaburzone w komórkach z wyciszeniem białka FUS, w komórkach tych zaobserwowałam również ogólny spadek poziomu histonowych mRNA. Dowodem na to, że FUS może być czynnikiem łączącym transkrypcję i dojrzewanie końca 3' histonowych pre-mRNA było wykazanie, że FUS oddziałuje nie tylko z U7 snRNP ale również z aktywatorem transkrypcyjnym genów histonowych NPAT oraz represorem transkrypcyjnym hnRNP UL1 (Ideue i wsp., 2012). Oddziaływania te były najsilniejsze, odpowiednio, w fazie S i poza fazą S cyklu, wskazując, że FUS uczestniczy w regulacji ekspresji genów histonowych podczas cyklu komórki. Następnie, w eksperymencie typu ChIP (ang. *Chromatine*

Immunoprecipitation) pokazaliśmy, że białko FUS może regulować poziom polimerazy RNAP2 na histonowych promotorach, zwiększając jej frakcję w fazie S, a obniżając w fazie G1. Podsumowując, w pracy **Raczyńska i wsp., 2015** opisaliśmy białko FUS jako pozytywny regulator ekspresji histonowych genów podczas cyklu komórkowego oraz czynnik białkowy łączący dwa mechanizmy: transkrypcję i dojrzewanie końca 3' histonowych pre-mRNA.

Opisane w publikacji wyniki stały się przyczynkiem kolejnego projektu OPUS, jaki otrzymałam z Narodowego Centrum Nauki (2015/19/B/NZ1/00233, okres realizacji 2016-2019). Projekt ten zakłada, że kompleks U7 snRNP może pełnić zróżnicowane funkcje w czasie trwania cyklu komórkowego. Swoją hipotezę oparłam na fakcie, że U7 snRNP ulega stabilnej ekspresji i pozostaje na podobnym poziomie podczas trwania całego cyklu komórkowego (Bond i Yario, 1994 oraz własne, nieopublikowane obserwacje), choć jedyna znana funkcja wiąże się z replikacją DNA. Jedną z hipotez zakłada, że poprzez zmianę partnera zależnie od fazy cyklu komórkowego U7 snRNP może pełnić w komórce dwie przeciwstawne funkcje: aktywatora ekspresji histonowych genów w fazie syntezy DNA, a represora ekspresji poza fazą S cyklu, zabezpieczając tym samym komórkę przed syntezą nadmiernej ilości histonów. W zmiennych oddziaływaniach i funkcjach U7 snRNP uczestniczyłoby, między innymi, białko FUS. Wyjaśnienie tego mechanizmu będzie niezwykle istotnym krokiem w kierunku zrozumienia złożonej regulacji ekspresji genów histonowych w czasie trwania cyklu komórkowego i być może opisanym po raz pierwszy mechanizmem zależnej od U7 snRNP kontroli ich transkrypcji.

Eksperymenty z ostatnich lat mojej pracy naukowej zaowocowały już dobrą publikacją w *Nucleic Acids Research*, w której jestem pierwszym autorem i współautorem korespondencyjnym (**Raczyńska i wsp., 2015**). Ponadto, wyniki badań skupionych wokół tematyki ekspresji histonowych genów prezentowałam do tej pory w postaci posterów na 5 międzynarodowych konferencjach i 2 wygłoszonych referatów, w tym na prestiżowej konferencji RNA2015. Tematyka związana z analizą nowych, zidentyfikowanych białek, określenie ich roli i położenie w sieci wzajemnie reagujących czynników związanych z zależną od replikacji regulacją ekspresji genów histonowych jest tematyką wciąż otwartą. Wśród innych, zidentyfikowanych przeze mnie białek oddziałujących z U7 snRNP znajduje się czynnik transkrypcyjny PC4 i helikazy RNA: DDX5 i DDX17. Białka te są aktualnie analizowane. Rola helikaz DDX5 i DDX17 jako potencjalnych czynników, które uczestniczą w formowaniu/rozplataniu dupleksu U7 snRNA:HDE lub białek wspomagających cięcie histonowych transkryptów przez endonukleazę CPSF73 jest obecnie testowana przez członka mojego zespołu, doktorantkę Aleksandrę Brzęk. Jej badania są częściowo finansowane w ramach grantu NCN program PRELUDIUM (UMO-2013/11/N/NZ1/00010, czas trwania: 2014-2017, "Rola helikazy DDX5 w dojrzewaniu końca 3' transkryptów zachowawczych histonów rdzeniowych w komórkach ludzkich"). Wierzę, że zbadanie funkcji tych białek pod kątem zaangażowania w proces dojrzewania histonowych transkryptów przyniesie wkrótce niezwykle ciekawe wyniki i konkluzje, które również zostaną dobrze opublikowane.

Podsumowując, tematyka metabolizmu RNA była obecna od początku mojej kariery naukowej. Rozpoczynając od analiz związanych z roślinnym transkryptem mitochondrialnym, poprzez procesy ko-transkrypcyjne w jądrze komórkowym rzodkiewnika, kończąc na badaniach dojrzewania pre-mRNA w komórkach zwierzęcych. Kilkakrotna zmiana tematyki badawczej stanowiła pewnego rodzaju utrudnienie, aczkolwiek znacznie ważniejsze są korzyści wynikające z możliwości poznania tak wielu procesów w tak wielu układach i co tym idzie, wielu podejść eksperymentalnych. Na obecnym etapie mojej kariery planuję pozostać przy ostatnio podjętej tematyce zależnej od replikacji ekspresji histonowych genów w komórkach zwierzęcych. Jak pokazałam, jej realizacja pozwala mi na stopniowe planowanie nowych zadań, nowych projektów, a więc i poszerzania grupy badawczej. Skutkiem takiego rozwoju jest formowanie nowego zespołu pracującego w obrębie Zakładu Ekspresji Genów,

którym to zespołem będę kierować. Wiąże się to również z rozszerzaniem współpracy i wymiany z innymi ośrodkami na całym świecie. Jednocześnie, kontakt z grupą berneńską, od lat związaną z tematyką ekspresji histonowych genów, jest wciąż utrzymywany.

Podsumowując, mój dorobek naukowy należący do pozostałych osiągnięć, niezwiązanych z publikacjami do przewodu habilitacyjnego, obejmuje **9 prac**, w tym 4 prace eksperymentalne i 5 prac przeglądowych. Sumaryczny współczynnik wpływu IF (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi **22,585**, a liczba punktów **MNiSW** wynosi **155**. Wszystkie prace eksperymentalne i 2 prace przeglądowe opublikowane są w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*.

Literatura dodatkowa do punktu 5

- Akimitsu N., Tanaka J., Pelletier J. (2007) Translation of nonSTOP mRNA is repressed post-initiation in mammalian cells. *EMBO J.*, 26(9):2327-2338.
- Bendich A.J. (1996) Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 255(4):564-588.
- Binder S., Brennicke A. (2003) Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1429):181-188.
- Bond U.M., Yario T.A., Steitz J.A. (1991) Multiple processing-defective mutations in a mammalian histone premessenger RNA are suppressed by compensatory changes in U7 RNA both in vivo and in vitro. *Genes Dev.*, 5: 1709-1722.
- Bond U., Yario T.A. (1994) The steady state levels and structure of the U7 snRNP are constant during the human cell cycle: lack of cell cycle regulation of histone mRNA 3' end formation. *Cell Mol. Biol. Res.*, 40(1):27-34.
- Burger G., Gray M.W., Lang B.F. (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.*, 19(12):709-716.
- Chrzanowska-Lightowlers Z.M., Temperley R.J., Smith P.M., Seneca S.H., Lightowlers R.N. (2004) Functional polypeptides can be synthesized from human mitochondrial transcripts lacking termination codons. *Biochem. J.* 377:725-731
- Clifton S.W., Minx P., Fauron C.M., Gibson M., Allen J.O., Sun H., Thompson M., Barbazuk W.B., Kanuganti S., Tayloe C., Meyer L., Wilson R.K., Newton K.J. (2004) Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol.*, 136(3):3486-3503.
- Dominski Z., Marzluff W.F. (2007) Formation of the 3' end of histone mRNA: Getting closer to the end. *Gene*, 396:373-390.
- Frishmeyer, P. A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrero, A. L., Parker, R. and Dietz, H. C. (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science*, 295:2258-2261.
- Giege P., Brennicke A. (2001) From gene to protein in higher plant mitochondria. *C R Acad Sci III.* 324(3):209-217.
- Giege P., Hoffmann M., Binder S., Brennicke A. (2000) RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria. *EMBO Rep.* 1(2):164-170.
- Grewe F., Edger P.P., Keren I., Sultan L., Pires J.C., Ostersetter-Biran O., Mower J.P. (2014) Comparative analysis of 11 Brassicales mitochondrial genomes and the mitochondrial transcriptome of *Brassica oleracea*. *Mitochondrion*, 19:135-143.
- Handa H. (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.*, 31(20):5907-5916.
- Haouazine N., Takvorian A., Jubier M.F., Michel F., Lejeune B. (1993) The nad6 gene and the exon d of nad1 are co-transcribed in wheat mitochondria. *Curr. Genet.*, 24(6):533-538.
- Harris M.E., Böhm R., Schneiderman M.H., Ramamurthy L., Schümperli D., Marzluff W.F. (1991) Regulation of histone mRNA in the unperturbed cell cycle: Evidence suggesting control at two posttranscriptional steps. *Mol. Cell. Biol.*, 11:2416-2424.
- Hauler A., Jonietz C., Stoll B., Stoll K., Braun H.P., Binder S. (2013) RNA Processing Factor 5 is required for efficient 5' cleavage at a processing site conserved in RNAs of three different mitochondrial genes in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, 74(4):593-604.
- Hoffmann M., Kuhn J., Daschner K., Binder S. (2001) The RNA world of plant mitochondria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 70:119-154.
- van Hoof A., Frishmeyer P.A., Dietz H.C., Parker R. (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*, 295(5563):2262-2264.

- Ideue T., Adachi S., Naganuma T., Tanigawa A., Natsume T., Hirose T. (2012) U7 small nuclear ribonucleoprotein represses histone gene transcription in cell cycle-arrested cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 109:5693–5698.
- Inada T. (2013) Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochim. Biophys. Acta*, 1829(6-7):634-642.
- Itchoda N., Nishizawa S., Nagano H., Kubo T., Mikami T. (2002) The sugar beet mitochondrial nad4 gene: an intron loss and its phylogenetic implication in the Caryophyllales. *Theor. Appl. Genet.*, 104(2-3):209-213.
- Janska H., Woloszynska M. (1997) The dynamic nature of plant mitochondrial genome organization. *Acta Biochim. Pol.*, 44(2):239-250.
- Knoop V. (2004) The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective. *Curr. Genet.*, 46:123–139.
- Kruft V., Eubel H., Jansch L., Werhahn W., Braun H.-P. (2001) Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 127:1694-1710.
- Kubo T., Nishizawa S., Sugawara A., Itchoda N., Estiati A., Mikami T. (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). *Nucleic Acids Res.*, 28(13):2571-2576.
- Kühn K., Weihe A., Börner T. (2005) Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.*, 33(1):337-46.
- Kühn K., Richter U., Meyer E.H., Delannoy E., Falcon de Longevialle A., O'Toole N., Börner T., Millar A.H., Small I.D., Whelan J. (2009) Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *A. thaliana*. *Plant Cell*, 21:2762–2779.
- Lu B., Hanson M.R. (1996) Fully edited and partially edited nad9 transcripts differ in size and both are associated with polysomes in potato mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 24(7):1369-1374.
- Lüscher B., Schümperli D. (1987) RNA 3' processing regulates histone mRNA levels in a mammalian cell cycle mutant. A processing factor becomes limiting in G1-arrested cells. *EMBO J.*, 6:1721–1726.
- Ma T., Van Tine B.A., Wei Y., Garrett M.D., Nelson D., Adams P.D., Wang J., Qin J., Chow L.T., Harper J.W. (2000) Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev.*, 14:2298–2313.
- Martin F., Schaller A., Eglite S., Schümperli D., Müller B. (1997) The gene for histone RNA hairpin binding protein is located on human chromosome 4 and encodes a novel type of RNA binding protein. *EMBO J.* 15:769–778.
- Millar A.H., Sweetlove L.J., Giegé P., Leaver C.J. (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.*, 127:1711-1727.
- Müller B. and Schümperli D. (1997) The U7 snRNP and the hairpin binding protein: Key players in histone mRNA metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 8:567–576.
- Nakazono M., Ito Y., Tsutsumi N., Hirai A. (1996) The gene for a subunit of an ABC-type heme transporter is transcribed together with the gene for subunit 6 of NADH dehydrogenase in rice mitochondria. *Curr. Genet.*, 29(5):412-416.
- Notsu Y., Masood S., Nishikawa T., Kubo N., Akiduki G., Nakazono M., Hirai A., Kadowaki K. (2002) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet. Genomics*, 268(4):434-445.
- Oda K., Yamato K., Ohta E., Nakamura Y., Takemura M., Nozato N., Akashi K., Kanegae T., Ogura Y., Kohchi T. (1992) Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome. *J Mol Biol.* 223(1):1-7
- Ogihara Y., Yamazaki Y., Murai K., Kanno A., Terachi T., Shiina T., Miyashita N., Nasuda S., Nakamura C., Mori N., Takumi S., Murata M., Futo S., Tsunewaki K. (2005) Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.*, 33(19):6235-6250.
- Pawłowski T., Rurek M., Janicka S., **Raczyńska K.D.**, Augustyniak H. (2005) Preliminary analysis of the cauliflower mitochondrial proteome. *Acta Physiol. Plant.*, 27:275-281.
- Pillai R.S., Grimm M., Meister G., Will C.L., Lührmann R., Fischer U., Schümperli D. (2003) Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes Dev.*, 17:2321–2333.
- Pillai R.S., Will C.L., Lührmann R., Schümperli D., Müller B. (2001) Purified U7 snRNPs lack the Sm proteins D1 and D2 but contain Lsm10, a new 14 kDa Sm D1-like protein. *EMBO J.*, 20:5470–5479.
- Placido A., Regina T.M., Quagliarello C., Volpicella M., Gallerani R., Ceci L.R. (2009) Mapping of 5' and 3'-ends of sunflower mitochondrial nad6 mRNAs reveals a very complex transcription pattern which includes primary transcripts lacking 5'-UTR. *Biochimie*, 91(7):924-932.
- Raczyńska K.D.**, Augustyniak H. (2003) Wpływ dojrzewania mitochondrialnych transkryptów roślin na ich stabilność. *Postępy Biologii Komórki*, 30(2):243–258.

- Raczyńska K.D.**, Augustyniak H. Białka PPR wiążące kwasy nukleinowe. *Postępy Biochem.* (2005); 51(4):440-446.
- Raczyńska K.D.**, Le Ret M., Rurek M., Bonnard G., Augustyniak H., Gualberto J.M. (2006) Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons. *FEBS Letters*, 580(24):5641-5646.
- Raczyńska K.D.**, Augustyniak H. (2007) Degradacja nieprawidłowych transkryptów w komórkach eukariotycznych i prokariotycznych. *Postępy Biologii Komórki*, 34:283-297.
- Raczyńska K.D.**, Simpson C.G., Ciesiołka A., Szewc L., Lewandowska D., McNicol J., Szweykowska-Kulińska Z., Brown J., Jarmolowski A. (2010) Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.*, 38:265-278.
- Raczyńska K.D.**, Ruepp M.D., Brzek A., Romeo V., Rindlisbacher B., Heller M., Szweykowska-Kulinska Z., Jarmolowski A., Schümperli D. (2015) FUS/TLS contributes to replication-dependent histone gene expression by interaction with U7 snRNP. *Nucleic Acids Res.*, 43(20):9711-9728.
- Romeo V., Schümperli D. (2016) Cycling in the nucleus: regulation of RNA 3' processing and nuclear organization of replication-dependent histone genes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 40:23-31.
- Rurek M., Nuc K., **Raczyńska K.D.**, Augustyniak H. (2003) Lupin *nad9* and *nad6* genes and their expression: 5' termini of the *nad9* gene transcripts differentiate lupin species. *Gene*, 315:123-132.
- Schaufele F., Gilmartin G.M., Bannwarth W., Birnstiel M.L. (1986) Compensatory mutations suggest that base-pairing with a small nuclear RNA is required to form the 3' end of H3 messenger RNA. *Nature*, 323:777-781.
- Simpson C.G., Lewandowska D., Fuller J., Maronova M., Kalyna M., Davidson D., McNicol J., **Raczyńska D.**, Jarmolowski A., Barta A., Brown J.W.S. (2008) Alternative splicing in plants. *Biochem. Soc. Trans.*, 36:508-510.
- Simpson, C.G., Fuller, J., Maronova, M., Kalyna, M., Davidson, D., McNicol, J., Barta, A., Brown, J.W.S. (2008b) Monitoring changes in alternative precursor messenger RNA splicing in multiple gene transcripts. *Plant J.*, 53:1035-1048.
- Simpson C.G., Manthri S., **Raczyńska K.D.**, Kalyna M., Lewandowska D., Kusenda B., Maranova M., Szweykowska-Kulińska Z., Jarmolowski A., Barta A., Brown J.W.S. (2010) Regulation of plant gene expression by alternative splicing. *Biochem. Soc. Trans.*, 38:667-671.
- Small I.D., Peeters N. (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 25:46-47.
- Sugiyama Y, Watase Y, Nagase M, Makita N, Yagura S, Hirai A, Sugiura M (2005) The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol. Genet. Genomics*, 272(6):603-615.
- Tanaka Y., Tsuda M., Yasumoto K., Terachi T., Yamagishi H. (2014) The complete mitochondrial genome sequence of *Brassica oleracea* and analysis of coexisting mitotypes. *Curr. Genet.* 60:277-284.
- Taylor N.L., Heazlewood J.L., Millar A.H. (2011) The *Arabidopsis thaliana* 2-D gel mitochondrial proteome: Refining the value of reference maps for assessing protein abundance, contaminants and post-translational modifications. *Proteomics*, 11:1720-1733.
- Unseld M., Marienfeld J.R., Brandt P., Brennicke A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.*, 15(1):57-61.
- Wang Z.F., Whitfield M.L., Ingledue T.C., Dominski Z., Marzluff W.F. (1996) The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. *Genes Dev.*, 10:3028-3040.

Raczyńska