

**Autoreferat przedstawiający opis
dorobku i osiągnięć naukowych**

dr Edyta Kościańska

**Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Biomedycyny Molekularnej**

Poznań 2017

1. Imię i nazwisko: Edyta Kościańska

Miejsce pracy:

Zakład Biomedycyny Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
email: edytak@ibch.poznan.pl
tel.: 61 852 85 03, wew. 160

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca, roku i daty ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

2005 - Doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, specjalność biochemia, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Stopień doktora nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii UAM z dnia 21 października 2005r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Charakterystyka procesu potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów reporterowych GFP i GUS u roślin*”. Praca wykonana w ramach Studium Doktoranckiego na Wydziale Biologii UAM. Promotor: Prof. dr hab. Jan Sadowski. Recenzenci: Prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski, Prof. dr hab. Artur Jarmołowski.

1991 - Magister biologii, specjalność biologia molekularna, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca magisterska wykonana w Zakładzie Biochemii Biopolimerów, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii. Temat: „*Analiza wybranych sekwencji RNA-3 wirusa nekrotycznej plamistości drzew pestkowych PNRSV*”. Promotor: Dr Krzysztof Wypijewski. Recenzent: Prof. dr hab. Jacek Augustyniak.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**12/2007 – obecnie**

Adiunkt, Zakład Biomedycyny Molekularnej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań;
od 06/2014 do 06/2016 członek w Zespole Terapii Genetycznej

12/2006 – 11/2007

Asystent, Pracownia Genetyki Nowotworów, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań

10/2005 – 11/2006

Post-doctoral scientist, Institute of Molecular Biology and Biotechnology FoRTH, Heraklion (Kreta, Grecja)

10/1999 – 06/2005

Doktorant, Studium Doktoranckie, Zakład Biochemii Biopolimerów później przekształcony w Zakład Biotechnologii, Wydział Biologii UAM, Poznań

05/2003 – 12/2003 oraz 03/2004 – 08/2004

Doktorant, stypendium Marii Curie, 12-miesięczny pobyt naukowy w IMBB-FoRTH w Heraklionie (Kreta, Grecja), kontrakt nr HPMT-GH-00-00175-05/-08

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

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl sześciu publikacji z lat 2011-2015, opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, których sumaryczny *impact factor* wynosi **30,99** (wg roku publikacji), 5-letni IF = **31,57** a liczba punktów MNiSW (wg roku publikacji) = **220**. Liczba cytowań tych publikacji, według bazy *Web of Science Core Collection* (do dnia złożenia wniosku), wynosi **362**. W trzech publikacjach jestem pierwszym autorem, natomiast w dwóch publikacjach współautorem korespondencyjnym.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Biogeneza i funkcja mikroRNA w dziedzicznych chorobach neurologicznych

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Starega-Roslan J, Krol J, **Koscińska E**, Kozłowski P, Szlachcic WJ, Sobczak K and Krzyżosiak WJ*. *Structural basis of microRNA length variety*. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan 1;39(1):257-68.

IF₂₀₁₁ = 8,026; punkty MNiSW = 40; liczba cytowań = 79

2. **Koscińska E**, Starega-Roslan J, Sznajder LJ, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Krzyżosiak WJ*. *Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers*. *BMC Mol Biol.* 2011 Apr 11;12:14.

IF₂₀₁₁ = 2,857; punkty MNiSW = 30; liczba cytowań = 21

3. **Koscińska E**, Starega-Roslan J, Krzyżosiak WJ*. *The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors*. *PLoS ONE.* 2011;6(12):e28548.

IF₂₀₁₁ = 4,092; punkty MNiSW = 40; liczba cytowań = 51

4. Witkos TM, **Koscińska E**, Krzyżosiak WJ*. *Practical aspects of microRNA target prediction*. *Curr Mol Med.* 2011 Mar 1;11(2):93-109.

IF₂₀₁₁ = 4,476; punkty MNiSW = 40; liczba cytowań = 190

5. Kozłowska E, Krzyżosiak WJ* and **Koscińska E***. *Regulation of huntingtin gene expression by miRNA-137, -214, -148a, and their respective isomiRs*. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14(8), 16999-17016.

IF₂₀₁₃ = 2,339; punkty MNiSW = 30; liczba cytowań = 19

6. **Koscińska E***, Witkos TM, Kozłowska E, Wojciechowska M, Krzyżosiak WJ*. *Cooperation meets competition in microRNA-mediated DMPK transcript regulation*. *Nucleic Acids Res.* 2015 Oct 30;43(19):9500-18. Epub 2015 Aug 24.

IF₂₀₁₅ = 9,202; punkty MNiSW = 40; liczba cytowań = 2

(* autor korespondencyjny)

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

Cel naukowy pracy:

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl 6 publikacji, które powstały podczas mojej pracy w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej (wcześniej funkcjonującym pod nazwą Pracownia Genetyki Nowotworów), w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, pod kierunkiem Prof. dr hab. Włodzimierza Krzyżosiaka. W pracach, które wskazuję jako osiągnięcie naukowe opublikowałam wyniki badań związanych z detekcją i analizą ludzkich mikroRNA (miRNA). Początkowo moja praca koncentrowała się głównie na biogenezie miRNA u człowieka, zwłaszcza na badaniu heterogennych wariantów długości miRNA. Następnie skupiłam się na funkcjonowaniu miRNA i ich roli w regulacji ekspresji wybranych genów, których mutacje prowadzą do chorób neurologicznych wywołanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych (ang. *trinucleotide repeat expansion diseases*, TREDs).

Moje badania, których wyniki składają się na osiągnięcie naukowe, miały dwa główne cele: (1) Poznanie procesu biogenezy miRNA, ze szczególnym uwzględnieniem czynników wpływających na powstawanie miRNA o zróżnicowanej długości (heterogenne miRNA, izomiRy), (2) Identyfikację miRNA regulujących ekspresję genów sprawczych chorób z grupy TREDs, a także poznanie roli miRNA oraz niektórych mechanizmów ich działania w dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1) oraz chorobie Huntingtona (HD).

Omówienie uzyskanych wyników:

MikroRNA (miRNA) to krótkie, ok. 22-nukleotydowe cząsteczki RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym, poprzez wpływ na translację mRNA lub jego stabilność [1]. Biogeneza miRNA jest procesem dwuetapowym, rozpoczyna się na terenie jądra komórkowego a kończy w cytoplazmie. Najważniejsze są dwie rybonukleazy, Drosha i Dicer (RNaza Drosha generuje jeden koniec dojrzałego miRNA a drugi RNaza Dicer). Pierwotne transkrypty pri-miRNA są transkrybowane przy udziale polimerazy II lub III a następnie cięte przez rybonukleazę Drosha, działającą z białkiem DGCR8 w kompleksie zwanym Mikroprocesorem, w wyniku czego powstają prekursorzy pre-miRNA. Prekursory te są transportowane do cytoplazmy przy udziale Eksportyny-5, której kofaktorem jest białko Ran zależne od GTP. Tam podlegają dalszej obróbce przez rybonukleazę Dicer, działającą razem z białkami TRBP i AGO2. W wyniku cięcia pre-miRNA powstaje dupleks składający się z aktywnej nici miRNA oraz nieaktywnej nici miRNA, która ulega degradacji. Aktywny miRNA oraz białko AGO2 są następnie włączane do kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), który (w zależności od stopnia komplementarności między miRNA a mRNA) indukuje blokowanie translacji lub degradację mRNA. Mechanizm obniżania ekspresji genów przez miRNA polega na wiązaniu się miRNA do sekwencji regulatorowych, znajdujących się głównie (choć nie tylko) w regionie 3' UTR docelowych transkryptów [2-4]. Najważniejszym elementem w rozpoznawaniu docelowego mRNA jest tzw. region "seed" cząsteczki miRNA, czyli fragment obejmujący nukleotydy od 2 do 8, licząc od końca 5' cząsteczki miRNA [5]. Parowanie w tym regionie jest wystarczające do zajścia oddziaływania miRNA-mRNA, jednak parowanie innych nukleotydów jest również ważne i może być

wymagane np. do wzmocnienia wiązania i funkcji miRNA w przypadku, kiedy komplementarność w regionie "seed" nie jest pełna [6].

Biogeneza miRNA oraz różne mechanizmy ich działania zostały szczegółowo opisane w wielu pracach przeglądowych, np. [7-9], w tym w pracy naszego Zespołu, której jestem współautorką [10] (praca wymieniona w załączniku 6, punkt II.A, pozycja nr 5). Jednakże 10 lat temu, kiedy rozpoczynałam badania nad miRNA (w roku 2007 dołączyłam do grupy Profesora Krzyżosiaka zajmującej się biogenezą miRNA), wiele aspektów dotyczących ich powstawania oraz funkcjonowania było nieznanych lub niejasnych. W badaniach wykorzystujących metody głębokiego sekwencjonowania (na potrzeby identyfikacji oraz badania ekspresji miRNA) obserwowano, że większość miRNA występuje w wielu wariantach długości [11-13]. Zjawisko to nazwano heterogennością długości miRNA, występowaniem kilku wariantów długości tego samego miRNA - izomiRów (ang. *isomiRs*) lub polimorfizmem końców miRNA. Obserwacja ta nasunęła kilka pytań, zarówno odnośnie powstawania heterogennych wariantów miRNA, jak i ich funkcji. Ponadto, ciekawe i konieczne okazało się opracowanie szybkiej i wiarygodnej metody ich detekcji. Wyniki trzech pierwszych prac, które wskazują jako osiągnięcie naukowe, odpowiadają na pytania związane z biogenezą ludzkich miRNA i heterogennością miRNA (publikacje nr 1-3), które mają ogromne znaczenie dla dalszych badań prowadzonych dalej w tym nurcie ale już pod kątem funkcji miRNA w chorobach typu TREDs, opisanych w trzech kolejnych pracach wchodzących w skład mojego osiągnięcia (publikacje nr 4-6).

W publikacji zatytułowanej **"Structural basis of microRNA length variety"** (**Nucleic Acids Res. 2011, pozycja 1**) badaliśmy strukturalne aspekty biogenezy miRNA. Wykazaliśmy, że struktura RNA odgrywa ważną rolę w kształtowaniu zróżnicowania długości miRNA a obecność „nadmiarowych” nukleotydów w jednym z ramion prekursora pre-miRNA powoduje powstawanie dłuższych produktów z tego ramienia. Przeprowadzone szczegółowe analizy działania rybonukleazy Dicer na pre-miRNA pozwoliły nam wskazać elastyczność struktury RNazy Dicer jako potencjalny czynnik, który może kształtować heterogenność miRNA. Ważnym wynikiem uzyskanym w tej pracy było określenie specyficzności działania endogennych RNaz Drosha i Dicer oraz wykazanie, że nieprecyzyjne cięcie przez obie RNazy ma wpływ na generowanie heterogenności końców miRNA. Analizy specyficzności cięcia Drosha i Dicer w liniach komórkowych zostały przeprowadzone dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczej metody hybrydyzacji typu *northern blot*. Ulepszona przeze mnie metoda hybrydyzacji umożliwiła detekcję wariantów długości miRNA oraz pre-miRNA z jednonukleotydomą rozdzielczością i potwierdziła tezę o udziale obu nukleaz szlaku biogenezy miRNA w generowaniu finalnej heterogenności miRNA. Badanie heterogenności miRNA przeprowadziliśmy na dużą skalę, w różnych liniach komórkowych, analizując zarówno endogenne miRNA, jak i miRNA generowane w wyniku nadekspresji z wektorów plazmidowych. Zastosowany system nadekspresji miRNA wymagał wcześniejszego potwierdzenia, że heterogenność endogennych miRNA jest taka sama jak miRNA generowanych z egzogennych prekursorów wprowadzonych na wektorach ekspresyjnych ale umożliwił nam przeprowadzenie analiz w szerszym zakresie. Jednocześnie, wyniki naszych badań wykonanych na tak dużej puli prekursorów miRNA mogą stanowić praktyczne

wskazówki do konstrukcji kaset ekspresyjnych wykorzystywanych w technologii interferencji RNA (ang. *RNA interference*, RNAi).

Metodyczne aspekty detekcji miRNA i pre-miRNA metodą *northern blot*, która została zoptymalizowana do badania ekspresji wariantów długości niskocząsteczkowych RNA różniących się długością o jeden nukleotyd omówiłam w kolejnej pracy, zatytułowanej **"Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers"** (BMC Mol Biol. 2011, pozycja 2). W tej publikacji przedstawiliśmy możliwości wykorzystania metody *northern* w badaniach biogenezy miRNA (ta część pracy jest uzupełnieniem wątku dotyczącego badania specyficzności cięcia przez RNazy Drosha i Dicer opublikowanego w publikacji dotyczącej strukturalnych aspektów biogenezy miRNA (Nucleic Acids Res. 2011, pozycja 1)), a także przy charakterystyce narzędzi technologii RNAi. Przede wszystkim wykazaliśmy, że stosując hybrydyzację krótkich RNA (w przedziale ~20-70 nt) możemy uzyskać precyzyjną i wiarygodną informację dotyczącą długości poszczególnych wariantów (izoform) siRNA (ang. *short interfering RNA*), miRNA oraz ich prekursorów występujących w komórkach. Jest to niezwykle ważna informacja, ponieważ zarówno miRNA o różnej długości/sekwencji, jak i uwalniane z odpowiednio zaprojektowanych kaset ekspresyjnych siRNA mogą regulować inne geny, natomiast zaproponowana metoda detekcji tych cząsteczek jest stosunkowo prosta i tania. Na uwagę zasługuje fakt, że nasze wyniki analizy heterogennych, endogennych miRNA, uzyskane zoptymalizowaną metodą *northern blot*, są spójne z opublikowanymi wynikami głębokiego sekwencjonowania. Wszystkie przedstawione w tej pracy wyniki demonstrują użyteczność opracowanego przeze mnie protokołu wysokorozdzielczej hybrydyzacji niskocząsteczkowych RNA, natomiast sam protokół i techniczne aspekty detekcji heterogennych miRNA i pre-miRNA omówiłam w pracy pt. **"High-resolution northern blot for a reliable analysis of microRNAs and their precursors"**, która nie została włączona do osiągnięcia naukowego (praca wymieniona w załączniku 6, punkt II.A, pozycja nr 4).

W ludzkich komórkach RNaza Dicer nie działa sama, a współdziała w obrębie RLC (ang. *RISC loading complex*) z białkami TRBP, PACT oraz AGO [14-19]. Rola tych białek w generowaniu dojrzałych miRNA nie jest jeszcze dokładnie poznana. W pracy pt. **"The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors"** (PLoS ONE 2011, pozycja 3) podjęliśmy się odpowiedzi na pytanie odnośnie wpływu partnerów białkowych Dicer na proces powstawania i heterogenność miRNA. W celu oceny wpływu środowiska komórkowego na specyficzność cięcia pre-miRNA przez RNazę Dicer zastosowaliśmy dwa podejścia: (1) wyciszenie ekspresji genów kodujących AGO2, TRBP, PACT w komórkach HeLa z użyciem specyficznych siRNA, a następnie ocenę heterogenności endogennych i egzogennych miRNA oraz (2) transfekcję syntetycznych prekursorów pre-miRNA do komórek HeLa. Do oceny wpływu partnerów białkowych Dicer na działanie RNazy i generowanie heterogennych miRNA wykorzystaliśmy opracowaną i opisaną wcześniej wysokorozdzielczą metodę hybrydyzacji typu *northern*. Wyniki uzyskane dla egzogennych miRNA były zgodne z wynikami uzyskanymi dla endogennych miRNA i wykazały, że wyciszenie ekspresji partnerów białkowych Dicer istotnie wpływa na poziom zarówno dojrzałego miRNA, jak i na poziom pre-miRNA w komórkach. Wzory heterogenności miRNA nie były jednak istotnie zmienione. Uzyskane wyniki wskazują na udział partnerów

białkowych Dicer w powstawaniu dojrzałych miRNA, natomiast ich wpływ na specyficzność cięcia Dicer wydaje się być niewielki.

Potencjał regulacyjny miRNA jest ogromny; do tej pory zidentyfikowano ponad 2,5 tys. dojrzałych miRNA (miRBase, Release 21) [20,21], które przypuszczalnie regulują ponad 60% ludzkich genów [22,23]. Częsteczki miRNA pełnią ważną rolę w wielu podstawowych procesach biologicznych, a zmiany w poziomie ich ekspresji mogą być cechą charakterystyczną wielu różnych chorób, w tym chorób neurologicznych. Rolę jaką miRNA mogą pełnić w grupie chorób znanych jako TREDs omówiłam szczegółowo w publikacji przeglądowej stanowiącej rozdział książki, zatytułowanej *"MicroRNA deregulation in trinucleotide repeat expansion disorders"*, która nie została włączona do osiągnięcia naukowego (praca wymieniona w załączniku 6, punkt II.D, pozycja nr 1). Duży potencjał regulacyjny miRNA związany jest z możliwością wyciszania ekspresji wielu różnych genów przez pojedynczą cząsteczkę miRNA (jedną sekwencję). Analizowana w naszym Zespole heterogenność miRNA, wynikająca w dużym stopniu z niespecyficznego cięcia przez RNazy Drosha i Dicer (opisana w publikacjach 1-3), znacznie powiększa pulę generowanych cząsteczek miRNA powodując zwielokrotnienie ich potencjału regulatorowego. Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej fakty, moja uwaga skupiła się na identyfikacji miRNA, zarówno kanonicznych cząsteczek miRNA, jak i ich wariantów długości (izomiRów), które mogłyby regulować ludzkie geny związane z chorobami neurodegeneracyjnymi typu TREDs. Badania oddziaływań miRNA z transkryptami genów zaangażowanych w patogenezę niektórych chorób TREDs realizowałam w ramach pozyskanego przeze mnie grantu „Walidacja oddziaływań mikroRNA z mRNA w kontekście patogenezы i terapii niektórych dziedzicznych chorób neurologicznych” (KBN N N301 523038). Wyniki tych badań zostały przedstawione m.in. w trzech kolejnych publikacjach składających się na wskazane osiągnięcie naukowe (pozycje 4-6).

Wnikliwa analiza danych literaturowych dotyczących zagadnienia przewidywania funkcjonalnych oddziaływań miRNA-mRNA zaowocowała powstaniem publikacji przeglądowej ***"Practical aspects of microRNA target prediction"*** (Curr Mol Med. 2011, **pozycja 4**). W tej pracy, oprócz analizy i dyskusji wyników już opublikowanych w tematyce regulacji ekspresji genów przez miRNA, przedstawiliśmy również wyniki badań własnych dotyczących przewidywania miejsc wiązania miRNA do transkryptów genów zaangażowanych w patogenezę chorób typu TREDs, a także omówiliśmy praktyczne aspekty przewidywania oddziaływań miRNA z mRNA. Bioinformatyczna identyfikacja miejsc oddziaływania miRNA z mRNA polega na szukaniu cząsteczek miRNA o jak największym stopniu komplementarności w stosunku do 3' UTR badanych mRNA. Złożoność oddziaływań miRNA-mRNA powoduje, że algorytmy służące do przewidywania tych interakcji, oparte jedynie na dopasowywaniu sekwencji miRNA i mRNA, są mało skuteczne. Dlatego też, w komputerowej predykcji miejsc oddziaływania miRNA z mRNA muszą być brane pod uwagę również inne parametry, takie jak np. porównywanie ortologicznych sekwencji 3' UTR, kontekst UTR i energia swobodna kompleksów. W niniejszej pracy przeanalizowane zostały dostępne programy komputerowe służące do przewidywania oddziaływań miRNA-mRNA, a najlepsze z nich zostały użyte do wyszukania potencjalnych oddziaływań miRNA-mRNA w badanej grupie chorób. Analizę przeprowadzono dla 19 „genów sprawczych”

chorób typu TREDs, takich jak: ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 1 (*ATXN1*), typu 2 (*ATXN2*), typu 3 (*ATXN3*), typu 6 (*CACNA1A*), typu 7 (*ATXN7*), typu 8 (*ATXN8*), typu 10 (*ATXN10*), typu 12 (*PPP2R2B*), typu 17 (*TBP*), choroba Huntingtona (*HTT*), choroba fenotypowo podobna do HD (*JPH3*), dystrofia miotoniczna typu 1 (*DMPK*), dystrofia miotoniczna typu 2 (*CNBP*), dystrofia oczno-gardłowa (*PABPN1*), zespół łamliwego chromosomu X (*FMR1*), zespół FRAXE (*AFF2*), zależny od chromosomu X rdzeniowo-opuszkowy zanik rdzeniowy (*AR*), choroba Friedreicha (*FXN*) oraz zanik zębato-czerwienno-pallidoniskowzgorzowy (*ATN1*). Tak wnikliwa analiza bioinformatyczna możliwości wiązania się miRNA z wybranymi transkryptami pozwoliła na wytypowanie potencjalnie ważnych oddziaływań miRNA-mRNA („oddziaływań-kandydatów”) do dalszej weryfikacji eksperymentalnej, która stała się kolejnym etapem prowadzonych badań. Wyniki walidacji oddziaływań miRNA z transkryptami *HTT* oraz *DMPK*, a także ich dalszej charakterystyki funkcjonalnej zostały opublikowane w dwóch pracach składających się na osiągnięcie naukowe, opisanych poniżej (pozycje 5 i 6).

Weryfikację eksperymentalną wybranych oddziaływań miRNA-mRNA, ważnych w kontekście chorób TREDs, przeprowadziłam wykorzystując w dużej mierze system reporterowy i doświadczenie zdobyte wcześniej przy publikacji o regulacji onkogenów przez miRNA (praca wymieniona w załączniku 6, punkt II.A, pozycja nr 3). System reporterowy jest standardowo wykorzystywany do badania regulacji ekspresji genów, w tym również oddziaływań miRNA z mRNA. Jest to wiarygodna metoda, która umożliwia weryfikację pojedynczego oddziaływania cząsteczki miRNA z docelową sekwencją w mRNA. Ponad 5 tysięcy oddziaływań miRNA-mRNA, opisanych w bazie miRTarBase, która gromadzi dane dotyczące regulacji genów przez miRNA, zostało potwierdzonych właśnie przy użyciu systemu reporterowego [24,25]. Przeprowadzenie eksperymentów wymagało skonstruowania szeregu wektorów reporterowych zawierających różne fragmenty 3' UTR badanych genów. Zostały one zaprojektowane w taki sposób, aby oprócz zasadniczego pytania czy badane miRNA regulują dany transkrypt można było uzyskać także pewne informacje na temat mechanizmów działania tych miRNA oraz ich roli w patogenezie badanych chorób. Konstrukty reporterowe wprowadzane były do komórek HEK293T i/lub HeLa. Większość eksperymentów wykonywano w warunkach nadekspresji miRNA, po wprowadzeniu wektora ekspresyjnego kodującego odpowiedni miRNA lub syntetycznego oligonukleotydu (mimetyku miRNA). Wykorzystano plazmidy do nadekspresji miRNA dostępne komercyjnie lub/i wektory przygotowane w laboratorium. Poziom badanych miRNA (a także ich heterogenność) sprawdzano opracowaną metodą *northern blot*, natomiast stopień wyciszenia regulowanego transkryptu i białka metodami RT-PCR i *western blotting*.

W publikacji zatytułowanej ***"Regulation of huntingtin gene expression by miRNA-137, -214, -148a, and their respective isomiRs"*** (Int. J. Mol. Sci. 2013, pozycja 5), wykorzystując wspomniany powyżej system reporterowy, pozytywnie zwalidowaliśmy oddziaływanie miR-137, miR-214 i miR-148a z 3' UTR *HTT*, natomiast negatywnie oddziaływanie miR-107 z 3' UTR *HTT*. Nadekspresja miR-214, miR-137 i miR-148a w komórkach HEK293T skutkowałą również obniżeniem poziomu regulowanego transkryptu oraz białka. Nasza publikacja stanowi pierwsze doniesienie o regulacji genu *HTT* przez miR-137 i miR-148a oraz potwierdzenie wcześniej obserwowanej funkcjonalności miR-214 [26].

Co ważniejsze, w kontekście badania roli miRNA w patogenezie choroby Huntingtona, w tej pracy skupiliśmy się na możliwości regulacji ekspresji huntingtyny przez heterogenne warianty miRNA (izomiRy). W tkankach nerwowych pochodzących od pacjentów z HD obserwowano heterogenne sekwencje miRNA [11], natomiast nie pokazywano bezpośrednich dowodów na ich funkcjonalność. Zmiana sekwencji na końcu 5' kanonicznego miRNA może mieć istotny wpływ na możliwość regulacyjną danego miRNA, ponieważ region 5' odpowiada za parowanie miRNA z docelowym mRNA (region "seed"). Wcześniej sugerowano, że niektóre izomiRy mogą regulować inne geny [13,27]. W związku z tym, w podjętych badaniach skupiliśmy się na izomiRach o zmienionym, w stosunku do sekwencji kanonicznej, końcu 5'. Nasza analiza bioinformatyczna wykazała, że jakiegokolwiek modyfikacje końca 5' miR-137, -214 oraz -148a uniemożliwiają wiązanie tych miRNA do 3' UTR HTT i skuteczne wyciszanie ekspresji huntingtyny. Przeprowadzone badania eksperymentalne wykazały natomiast, że zmiana polegająca na wydłużeniu lub skróceniu danego miRNA (dodanie lub obcięcie 1-2 nukleotydów na końcu 5' cząsteczki) nie zawsze powoduje zaburzenie oddziaływania tego miRNA z mRNA huntingtyny, np. w przypadku izomiRów 214, co świadczy o możliwości jednoczesnej regulacji danego "targetu" (genu) zarówno przez kanoniczny miRNA jak i jego izomiRy. Wiązanie miR-214 do 3' UTR HTT skutkuje silniejszym parowaniem na jego końcu 3', co może tłumaczyć dlaczego ten miRNA nie traci zdolności wiązania pomimo przesunięcia sekwencji "seed" i w konsekwencji izomiRy 214 są funkcjonalne. Co więcej, obecnie postuluje się, że specyficzność wiązania sekwencji docelowej przez AGO jest w dużej mierze zależna od końca 3' a nie końca 5' cząsteczki miRNA [28]. Ponadto, nasze badania dotyczące regulacji genu *DMPK* przez miRNA (publikacja nr 6) również potwierdzają, że koniec 3' miRNA stanowi ważny element stabilizujący/dopełniający oddziaływanie miRNA-mRNA.

Ostatnia publikacja wchodząca w skład osiągnięcia naukowego, zatytułowana **"Cooperation meets competition in microRNA-mediated *DMPK* transcript regulation"** (*Nucleic Acids Res.* 2015, pozycja 6), jest pewnym zwieńczeniem moich badań nad regulacją ekspresji genów przez miRNA. Nie tylko kompleksowo ujmuje zagadnienie regulacji ekspresji genu *DMPK* przez miRNA, ale również odnosi się do roli jaką miRNA mogą odgrywać w patogenezie dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1). W tej pracy wykorzystałam swoje dotychczasowe doświadczenie w zakresie przewidywania oraz eksperymentalnego potwierdzania oddziaływań miRNA-mRNA, a także wiedzę w zakresie biogenezy i funkcjonowania cząsteczek miRNA. Zaplanowane eksperymenty obejmowały cały wachlarz technik biologii molekularnej oraz techniki biologii komórki, które wykonałam z pomocą Współautorów. Co ciekawe, w przypadku genu *DMPK* powtórzenia CTG, których ekspansja powoduje DM1, zlokalizowane są w sekwencji 3' UTR a więc w regionie wiązania miRNA. Niniejsza publikacja miała więc na celu dogłębną analizę regulacji ekspresji genu *DMPK* przez miRNA, nie tylko przez miRNA wiążące się do specyficznej sekwencji ale również miRNA wiążące się do regionu powtórzeń. Zasadniczo podjęłam się w niej rozwiązania czterech problemów badawczych, kolejno: (1) eksperymentalnego potwierdzenia, że „typowe” miRNA regulują ekspresję *DMPK*, (2) sprawdzenia czy miRNA mogą współdziałać w wyciszaniu genu, (3) wykazania funkcjonalności wiązania się miRNA do sekwencji powtórzonej, (4) zbadania czy wiązanie się miRNA do zmutowanych transkryptów

może odgrywać rolę w patogenezie DM1. Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że miR-206 oraz miR-148a regulują ekspresję DMPK wiążąc się do transkryptu w sposób typowy dla miRNA, w wyniku czego hamują jego translację nie powodując degradacji. Ponadto, miR-15b/16 zawierający powtórzenia CAG w regionie źródłowym (regionie "seed") może efektywnie wiązać się z obecnym w 3' UTR ciągiem powtórzeń CUG, przy czym ta efektywność wzrasta wraz ze wzrostem liczby powtórzeń. Na uwagę zasługuje fakt, że wykazana regulacja ekspresji genu *DMPK* przez te trzy miRNA stanowi pierwsze doniesienie o regulacji genu *DMPK* przez miRNA. Co więcej, układ potencjalnie funkcjonalnych miejsc wiązania miRNA w 3' UTR *DMPK* umożliwił nam zbadanie niektórych aspektów mechanizmu działania miRNA, w tym możliwości interakcji pomiędzy blisko leżącymi miejscami wiązania. Wykorzystując konstrukty reporterowe zawierające miejsca wiązania miR-206 i miR-148a rozdzielone wstawkami o różnej długości wykazaliśmy, że para miR-206/148a może współdziałać. Jest to tzw. zjawisko kooperatywności miRNA, które zostało opisane również dla innych miRNA [29-32]. W naszych badaniach, najsilniejsze wyciszenie ekspresji *DMPK* obserwowaliśmy po transfekcji komórek konstruktem, w którym miejsca wiązania dla pary miR-206/148a były rozsunięte tylko nieznacznie, co świadczy o tym, że istnieje pewna optymalna odległość w jakiej powinny znajdować się miejsca wiązania dla dwóch miRNA. Ciekawym wynikiem jest również potwierdzenie roli końca 3' cząsteczki miRNA (co wcześniej zaobserwowaliśmy w przypadku funkcjonalnych izomiRów 214), który tutaj może determinować specyficzność miejsca docelowego dla miRNA należących do jednej rodziny – miejsce wiązania miR-206 w 3' UTR *DMPK* jest również miejscem wiązania miR-1. W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że miR-1 nie reguluje lub reguluje bardzo słabo (w sposób statystycznie nieistotny) ekspresję *DMPK* a tym samym, że parowanie poza regionem "seed" (oddziaływanie 3' kompensujące) ma duże znaczenie dla aktywności tego miRNA. W aspekcie badań nad udziałem miRNA w patogenezie DM1 wykazaliśmy, że wiązanie miR-15b/16 do powtórzeń CUG w 3' UTR *DMPK* jest uzależnione od długości ciągu CUG. Ponadto, pokazaliśmy również kolokalizację miR-16 i cytoplazmatycznych inkluzji tworzących się w komórkach w wyniku nadekspresji egzogenne RNA z ciągiem powtórzeń CUG. Wyniki te sugerują, że zmutowane transkrypty *DMPK* mogą stanowić gąbki dla miRNA, jeśli te miRNA mają komplementarną do powtórzeń sekwencję w regionie "seed". Sekwestrowane miRNA nie pełnią swoich normalnych funkcji, co prowadzi do ogólnego upośledzenia mechanizmów regulacji ekspresji genów przez miRNA.

Podsumowanie najważniejszych wyników przedstawionych w publikacjach składających się na osiągnięcie naukowe:

- Zróznicowanie długości miRNA (*miRNA length diversity*) zależy w dużym stopniu od struktury pre-miRNA
- Heterogenność długości miRNA (*miRNA length heterogeneity*) jest wynikiem nieprecyzyjnego cięcia przez RNazę Drosha i Dicer
- Partnerzy białkowi RNazy Dicer wpływają zarówno na ilość miRNA jak i pre-miRNA ale mają tylko niewielki wpływ na specyficzność cięcia Dicer

- Technika wysokorozdzielczej hybrydyzacji typu *northern blot* może stanowić przydatne narzędzie stosowane do (lub wspomagające inne metody) detekcji i charakterystyki miRNA (oraz innych małych RNA)
- Transkrypty genów zaangażowanych w patogenezę niektórych chorób neurologicznych wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych (TREDs) mogą podlegać regulacji przez miRNA
- miRNA regulują ekspresję huntingtyny, przy czym funkcjonalne mogą być też niektóre izomiRy (heterogenność miRNA zwiększa potencjał regulacyjny miRNA)
- miRNA regulują ekspresję transkryptu DMPK, wiążą się nie tylko do sekwencji specyficznej ale również do sekwencji z powtórzeniami CUG
- miRNA mogą współdziałać w wyciszaniu ekspresji DMPK (wykazują kooperatywność jeśli znajdują się w pewnej, optymalnej odległości)
- Sekwestracja miRNA bogatych w sekwencje CAG w regionie "seed" może być czynnikiem patogennym w DM1 - zmutowane transkrypty DMPK mogą stanowić gąbki dla miRNA, jeśli te miRNA mają komplementarną do powtórzeń CUG sekwencję CAG w regionie "seed"

Przyszłe plany badawcze:

Regulacja ekspresji genów przez miRNA jest już stosunkowo dobrze poznana, natomiast coraz większą uwagę zwraca się obecnie na pozostałe niekodujące RNA (ang. *non-coding RNA*, ncRNA), np. długie lncRNA, koliste circRNA czy pseudogeny. Istnieje hipoteza, że wszystkie endogenne cząsteczki RNA, zarówno kodujące białko transkrypty mRNA jak i ncRNA, komunikują się wzajemnie poprzez miejsca wiązania miRNA (ang. *competing endogenous RNA hypothesis*, *ceRNA hypothesis*) [33]. Cząsteczki te konkurują ze sobą o zasoby miRNA i tworzą ogromną sieć regulatorową w komórce. Mechanizmy tej regulacji są jednak jeszcze słabo poznane.

W swoich obecnych i przyszłych badaniach planuję skupić się na pogłębieniu wiedzy dotyczącej regulacji ekspresji genów, roli ncRNA oraz sieci powiązań funkcjonalnych pomiędzy różnymi cząsteczkami RNA. Celem tych badań jest potwierdzenie hipotezy ceRNA dotyczącej komunikacji pomiędzy różnymi typami RNA zawierającymi powtórzenia sekwencji. W ostatnim czasie wykazaliśmy, że transkrypty HTT, ATXN3 i DMPK podlegają regulacji przez miRNA [34-37] a także, że miRNA zawierające powtórzenia CAG w regionie "seed" mogą wiązać się do powtórzeń CUG obecnych w transkrypcie DMPK [35]. Wyniki te sugerują, że zmutowane transkrypty DMPK mogą stanowić gąbki dla miRNA, jeśli te miRNA mają komplementarną do powtórzeń sekwencję w regionie "seed". Wyniki innych badań prowadzonych w naszym Zakładzie pokazują, że zmutowany transkrypt HTT może być celem dla miRNA-podobnych siRNA, które celują w powtórzenia CAG [38]. Jest więc bardzo prawdopodobne, że transkrypty genów zmutowanych w chorobach typu TREDs oraz inne transkrypty zawierające powtórzenia sekwencji mogą działać jak gąbki, konkurować o miRNA i uczestniczyć w komunikacji pomiędzy różnymi rodzajami RNA, zgodnie z postulowaną hipotezą ceRNA. Hipoteza ceRNA ma wielu zwolenników ale również wielu przeciwników [39-42]. Argumentem przemawiającym przeciwko tej hipotezie jest fakt, że zmiana wywołana przez związanie części miRNA w komórce może nie mieć znaczenia

biologicznego. Ekspansja powtórzeń trójnukleotydowych, do których potencjalnie mogłyby być wiązane cząsteczki miRNA, znacząco zwiększa możliwość funkcjonowania RNA z powtórzeniami jako gąbka.

Mając na uwadze ww. przesłanki, a przede wszystkim wyniki badań własnych opublikowanych w pracy o regulacji genu *DMPK* (pozycja 6), chciałabym kontynuować badania dotyczące identyfikacji funkcjonalnych oddziaływań pomiędzy miRNA i różnego typu powtórzeniami występującymi zarówno w mRNA jak i ncRNA. Głównym celem planowanych badań jest poznanie aktywności ceRNA w chorobach typu TREDs oraz potencjalnie innych chorobach wywołanych ekspansją powtórzeń. Planuję przeanalizować interakcje pomiędzy różnymi ceRNA w komórkowych modelach wybranych chorób, sprawdzić zależność takich interakcji od długości i typu powtórzonej sekwencji oraz eksperymentalnie zweryfikować "targety" dla miRNA wiążących się do powtórzeń. Realizacja tego zadania miałaby na celu dokładną charakterystykę wybranych ceRNA oraz analizę wzajemnej komunikacji między badanymi RNA. Na razie moje badania eksperymentalne są na etapie planowania, natomiast w zakresie badań ceRNA w kontekście chorób TREDs udało się już zebrać dużo wyników bioinformatycznych. Wykonana została szczegółowa analiza *in silico* wszystkich potencjalnych ceRNA (mRNA, lncRNA, circRNA i pseudogenów) zawierających krótkie powtórzenia sekwencji. Zidentyfikowane zostały również miRNA, które potencjalnie mogą się wiązać do wszystkich rodzajów trójnukleotydowych powtórzeń obecnych w genomie człowieka oraz innych powtórzonych motywów sekwencyjnych. Wyniki badań *in silico* stały się podstawą do napisania publikacji zatytułowanej "*A Dialect of Stuttering Sequences in the Competing Endogenous RNA Crosstalk*", której jestem współautorką (Witkos TM, Koscińska E, Fiszer A, Krzyzosiak WJ; praca w przygotowaniu/recenzji).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy należący do pozostałych osiągnięć, niezwiązanych z publikacjami do przewodu habilitacyjnego, obejmuje **9 prac**, w tym **6 prac eksperymentalnych**: (1) Koscińska *et al.*, 2001, Acta Biochim Pol; (2) Koscińska *et al.*, 2005, Plant Mol Biol; (3) Koscińska *et al.*, 2007, BMC Mol Biol; (4) Koscińska *et al.*, 2011, ScientificWorldJournal; (5) Figura *et al.*, 2015, Int. J. Mol. Sci; (6) Bartz *et al.*, 2015, Livestock Science) i **3 prace przeglądowe**: (7) Starega-Roslan *et al.*, 2011; Cell Mol Life Sci; (8) Koscińska *et al.*, 2014, rozdział w książce; (9) Koscińska i Krzyzosiak, 2014, Cerebellum & Ataxias). Wszystkie prace zostały omówione w załączniku 6, w punktach II.A oraz II.D. Ich sumaryczny współczynnik wpływu IF (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi **20,17**, liczba punktów MNiSW = **212**, natomiast liczba cytowań (wg bazy *Web of Science Core Collection*) = **176**. W sześciu publikacjach jestem pierwszym autorem, w jednej z nich autorem pierwszym i współautorem korespondencyjnym.

Zdecydowana większość mojego dorobku naukowego obejmuje badania wyciszania ekspresji genów przez małe, niekodujące RNA. Główny nurt mojej pracy naukowo-badawczej prowadzonej do czasu uzyskania stopnia doktora dotyczył badań związanych z interferencją RNA (RNAi), szczególnie z charakterystyką siRNA u roślin. Z tego okresu

pochodzą dwie publikacje naukowe (wymienione w załączniku 6, punkt II.A, poz. 1 i 2). Pracę doktorską wykonałam w zespole Profesora Jana Sadowskiego, w Zakładzie Biotechnologii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM (ale rozpoczynałam jeszcze pod kierunkiem Profesora Jacka Augustyniaka w Zakładzie Biochemii Polimerów). Przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej była charakterystyka potranskrypcyjnego procesu wyciszania genów reporterowych *GFP* i *GUS* u roślin. Część badań wykonałam w IMBB-FoRTH (Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas) w Grecji (Heraklion/Kreta) w ramach uzyskanego stypendium Marii Curie, pod kierunkiem Profesora Martina Tablera. Najważniejszą część tych badań stanowiła analiza różnej długości siRNA u roślin, w której wykazałam powstawanie siRNA różniących się ilościowo oraz jakościowo, głównie w zależności od rodzaju sekwencji docelowej (transgen czy endogen) oraz rodzaju użytego konstruktów wyciszającego. Była to ważna obserwacja, ponieważ u roślin występują dwa rodzaje cząsteczek siRNA: krótsze (o długości 21-22 nt) oraz dłuższe (24-26 nt), pełniące odmienną funkcję w procesie wyciszania [43]. Efektem mojej pracy jest publikacja "*Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of Nicotiana benthamiana and Nicotiana tabacum*" (Plant Mol Biol. 2005, załącznik 6, punkt II.A, poz. 2), którą uważam za najważniejsze osiągnięcie z tego okresu. Praca w zespole Profesora Martina Tablera, który wówczas był uznanym autorytetem w zakresie badań RNA i potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów, była dla mnie cennym doświadczeniem. Nauczyłam się wielu technik eksperymentalnych (w tym metody *northern blot*, którą później optymalizowałam do analizy heterogenności miRNA) oraz znacznie poszerzyłam swoją wiedzę w dziedzinie RNAi. Praca w dobrym laboratorium pod okiem wyśmienitego naukowca i jego grupy badawczej, a także udział w realizacji międzynarodowych grantów miały ogromne znaczenie dla mojego rozwoju naukowego.

Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem w październiku 2005r. na UAM w Poznaniu i uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych. Zaraz po obronie doktoratu odbyłam 13-miesięczny staż podoktorski w IMBB-FoRTH w Grecji, w zespole Doktora Kritona Kalantidisa, w czasie którego kontynuowałam badania mechanizmu procesu wyciszania genów u roślin (poprzez siRNA i miRNA), a także zajmowałam się analizą regulacji ekspresji genów (głównie onkogenów) poprzez miRNA u człowieka. Rezultatem tych badań jest publikacja zatytułowana "*Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs*" (BMC Mol Biol. 2007, załącznik 6, punkt II.A, poz. 3), dzięki której zdobyłam wiedzę i umiejętności w zakresie przewidywania i weryfikacji eksperymentalnej oddziaływań miRNA z mRNA u człowieka, co bardzo wykorzystałam w swojej dalszej pracy naukowej, w tym w trzech pracach wskazanych jako moje osiągnięcie naukowe.

Najważniejszy nurt moich badań po uzyskaniu stopnia doktora skupia się wokół badań związanych z biogenezą ludzkich miRNA oraz ich rolą w regulacji ekspresji genów sprawczych chorób typu TREDs, co zostało szczegółowo przedstawione w opisie cyklu publikacji składających się na osiągnięcie naukowe. W nurcie tej samej tematyki powstały także cztery inne prace, których nie włączałam do osiągnięcia naukowego (wymienione w załączniku 6). Pierwsza publikacja ("*High-resolution northern blot for a reliable analysis of microRNAs and their precursors*", ScientificWorldJournal 2011, załącznik 6, punkt II.A, poz. 4) to protokół zoptymalizowanej metody *northern blot*, którą wykorzystaliśmy do

detekcji heterogennych, krótkich cząsteczek RNA. Pozostałe trzy to prace przeglądowe, jedna dotyczy biogenezy miRNA i porusza wątek heterogenności miRNA oraz aspekty strukturalne biogenezy miRNA ("*The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA*", Cell Mol Life Sci. 2011, załącznik 6, punkt II.A, poz. 5), natomiast dwie kolejne opisują i dyskutują znaczenie miRNA w grupie chorób TREDs. W publikacji stanowiącej rozdział w książce ("*MicroRNA deregulation in trinucleotide repeat expansion disorders*", załącznik 6, punkt II.D, poz. 1) szczegółowo przedstawiłam literaturę, w której opisano zmiany w profilach ekspresji miRNA w chorobach typu TREDs, a także nowoczesne metody badania ekspresji miRNA, podejścia terapeutyczne oraz związek biogenezy miRNA z patogenezą chorób TREDs. Druga publikacja przeglądowa ("*Current understanding of the role of microRNAs in spinocerebellar ataxias*", Cerebellum & Ataxias 2014, załącznik 6, punkt II.D, poz. 2) dotyczy roli miRNA w grupie ataksji rdzeniowo-mózdkowych ale zawiera dodatkowo elementy badań własnych, przedstawiających wyniki analiz dotyczących regulacji transkryptu ataksyny-3 przez miR-181a i miR-9. Poza ww. pracami mam w swoim dorobku również pracę dotyczącą roli miRNA u świni ("*Polymorphism of the porcine miR-30d is associated with adipose tissue accumulation, its fatty acid profile and the ME1 gene expression*", Livestock Science 2015, załącznik 6, punkt II.A, poz. 7), będącą owocem współpracy z zespołem Profesora Marka Świtońskiego w ramach realizacji grantu „Znaczenie mikroRNA (miRNA) w kontroli ekspresji genów kandydujących dla cech otluszczenia świni” (KBN N N311 029039). Ponadto, w ramach realizacji swojego grantu (KBN N N301 523038) badałam deregulację miRNA w mysim modelu choroby Huntingтона. Tak więc moje doświadczenie naukowo-badawcze w zakresie badań miRNA jest bogate i obejmuje analizy tych cząsteczek w różnych organizmach. Dodatkowo, pełniłam funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim dotyczącym związku miRNA z patobiologią choroby Huntingтона i dystrofii miotonicznej typu 1, oraz byłam opiekunem naukowym kilku prac magisterskich dotyczących tematyki miRNA (co zostało opisane w załączniku nr 7).

Poza problematyką miRNA, drugim ważnym obszarem moich zainteresowań jest badanie toksyczności RNA, a zwłaszcza rozróżnienie toksyczności RNA od toksyczności białka w chorobach poliglutaminowych (poliQ). Jestem wykonawcą projektu badawczego, uzyskanego w ramach konkursu MAESTRO 3 „*Toksyczność RNA w patogenezie chorób poliglutaminowych*” (NCN 2012/06/A/NZ1/00094), którego kierownikiem jest Profesor Włodzimierz Krzyżosiak. W ramach realizacji tego projektu biorę udział w poszukiwaniu nowych markerów toksyczności RNA, a przede wszystkim w tworzeniu modeli komórkowych SCA3, w których ekspresji ulegać będą oba czynniki toksyczne, tj. transkrypt i białko lub tylko jeden z nich. Do tworzenia takich modeli są wykorzystywane konstrukty plazmidowe kodujące transkrypty ulegające lub nie ulegające translacji, które zawierają różnej długości powtórzenia CAG lub CAA. Rezultatem moich badań w tym temacie jest na razie jedna publikacja naukowa, której jestem współautorką. Jest to publikacja metodyczna, przedstawiająca wyniki badań uzyskanych w czasie generowania konstruktyw plazmidowych z długimi ciągami powtórzeń (Figura *et al.*, "*In Vitro Expansion of CAG, CAA, and Mixed CAG/CAA Repeats*", Int J Mol Sci. 2015; załącznik 6, punkt II.A, poz. 6). Ponadto, jednym z problemów badawczych podejmowanych w projekcie Maestro jest analiza zmian miRNomu wywołanych obecnością toksycznego RNA lub/i białka w chorobach wywołanych ekspansją

powtórzeń trójnukleotydowych. W realizacji tego zadania wykorzystuję więc swoje doświadczenie w zakresie badań miRNA. Oprócz planowanego profilowania ekspresji miRNA w nowych modelach komórkowych, w ramach realizacji projektu prowadzone są również badania dotyczące wiązania się miRNA do powtórzeń trójnukleotydowych oraz potencjalnej sekwestracji tych miRNA przez toksyczne transkrypty RNA.

6. Podsumowanie dorobku naukowego

Pełna informacja dotycząca wszystkich opublikowanych prac naukowych znajduje się w załączniku nr 6, natomiast informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki w załączniku nr 7.

Liczba publikacji: **14** (2/12 – przed/po uzyskaniu stopnia doktora)

Rozdziały w monografiach: **1**

Sumaryczny IF (wg *Journal Citation Reports*): **51,16**

Liczba punktów MNiSW: **432**

Liczba cytowań (wg *Web of Science Core Collection*): **538**

Liczba cytowań bez auto-cytowań: **512**

Indeks Hirscha: **9**

Udział w konferencjach krajowych i międzynarodowych: **16**

Udział w projektach badawczych: **10** (w tym jako kierownik projektu: **1**)

Recenzje dla czasopism: **15**

Recenzje projektów: **1**

Literatura:

1. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, 102-114.
2. Doench, J.G. and Sharp, P.A. (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 18, 504-511.
3. Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*, 12, 225-232.
4. Lai, E.C. (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, 30, 363-364.
5. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3, e85.
6. Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-233.
7. Ha, M. and Kim, V.N. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15, 509-524.
8. Kim, V.N., Han, J. and Siomi, M.C. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 126-139.
9. Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11, 597-610.
10. Starega-Roslan, J., Koscianska, E., Kozłowski, P. and Krzyzosiak, W.J. (2011) The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2859-2871.
11. Marti, E., Pantano, L., Banez-Coronel, M., Llorens, F., Minones-Moyano, E., Porta, S., Sumoy, L., Ferrer, I. and Estivill, X. (2010) A myriad of miRNA variants in control and Huntington's

- disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res*, 38, 7219-7235.
12. Morin, R.D., O'Connor, M.D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M. *et al.* (2008) Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*, 18, 610-621.
 13. Wu, H., Neilson, J.R., Kumar, P., Manocha, M., Shankar, P., Sharp, P.A. and Manjunath, N. (2007) miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One*, 2, e1020.
 14. Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436, 740-744.
 15. Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A. and Filipowicz, W. (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep*, 6, 961-967.
 16. Kok, K.H., Ng, M.H., Ching, Y.P. and Jin, D.Y. (2007) Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem*, 282, 17649-17657.
 17. Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R. and Kim, V.N. (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J*, 25, 522-532.
 18. MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V. and Doudna, J.A. (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 512-517.
 19. Maniataki, E. and Mourelatos, Z. (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*, 19, 2979-2990.
 20. Griffiths-Jones, S. (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*, 32, D109-111.
 21. Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42, D68-73.
 22. Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19, 92-105.
 23. Selbach, M., Schwanhauss, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455, 58-63.
 24. Chou, C.H., Chang, N.W., Shrestha, S., Hsu, S.D., Lin, Y.L., Lee, W.H., Yang, C.D., Hong, H.C., Wei, T.Y., Tu, S.J. *et al.* (2016) miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res*, 44, D239-247.
 25. Hsu, S.D., Lin, F.M., Wu, W.Y., Liang, C., Huang, W.C., Chan, W.L., Tsai, W.T., Chen, G.Z., Lee, C.J., Chiu, C.M. *et al.* (2011) miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*, 39, D163-169.
 26. Sinha, M., Ghose, J. and Bhattacharyya, N.P. (2011) Micro RNA -214,-150,-146a and-125b target Huntingtin gene. *RNA Biol*, 8, 1005-1021.
 27. Chiang, H.R., Schoenfeld, L.W., Ruby, J.G., Auyeung, V.C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W.K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J.E. *et al.* (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*, 24, 992-1009.
 28. Moore, M.J., Scheel, T.K., Luna, J.M., Park, C.Y., Fak, J.J., Nishiuchi, E., Rice, C.M. and Darnell, R.B. (2015) miRNA-target chimeras reveal miRNA 3'-end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nat Commun*, 6, 8864.
 29. Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engle, P., Lim, L.P. and Bartel, D.P. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27, 91-105.
 30. Rinck, A., Preusse, M., Lagerbauer, B., Lickert, H., Engelhardt, S. and Theis, F.J. (2013) The human transcriptome is enriched for miRNA-binding sites located in cooperativity-permitting distance. *RNA Biol*, 10, 1125-1135.
 31. Saetrom, P., Heale, B.S., Snove, O., Jr., Aagaard, L., Alluin, J. and Rossi, J.J. (2007) Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res*, 35, 2333-2342.
 32. Schmitz, U., Lai, X., Winter, F., Wolkenhauer, O., Vera, J. and Gupta, S.K. (2014) Cooperative gene regulation by microRNA pairs and their identification using a computational workflow. *Nucleic Acids Res*, 42, 7539-7552.

33. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L. and Pandolfi, P.P. (2011) A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*, 146, 353-358.
34. Koscińska, E. and Krzyzosiak, W. (2014) Current understanding of the role of microRNAs in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum & Ataxias*, 1.
35. Koscińska, E., Witkos, T.M., Kozłowska, E., Wojciechowska, M. and Krzyzosiak, W.J. (2015) Cooperation meets competition in microRNA-mediated DMPK transcript regulation. *Nucleic Acids Res*, 43, 9500-9518.
36. Kozłowska, E., Krzyzosiak, W.J. and Koscińska, E. (2013) Regulation of huntingtin gene expression by miRNA-137, -214, -148a, and their respective isomiRs. *Int J Mol Sci*, 14, 16999-17016.
37. Witkos, T.M., Koscińska, E. and Krzyzosiak, W.J. (2011) Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med*, 11, 93-109.
38. Fiszer, A., Olejniczak, M., Galka-Marciniak, P., Mykowska, A. and Krzyzosiak, W.J. (2013) Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression. *Nucleic Acids Res*, 41, 10426-10437.
39. Bosson, A.D., Zamudio, J.R. and Sharp, P.A. (2014) Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Mol Cell*, 56, 347-359.
40. Broderick, J.A. and Zamore, P.D. (2014) Competitive endogenous RNAs cannot alter microRNA function in vivo. *Mol Cell*, 54, 711-713.
41. Denzler, R., Agarwal, V., Stefano, J., Bartel, D.P. and Stoffel, M. (2014) Assessing the ceRNA hypothesis with quantitative measurements of miRNA and target abundance. *Mol Cell*, 54, 766-776.
42. Jens, M. and Rajewsky, N. (2015) Competition between target sites of regulators shapes post-transcriptional gene regulation. *Nat Rev Genet*, 16, 113-126.
43. Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J*, 21, 4671-4679.

Edyta Kościńska

Poznań, dn. 04.05.2017