

Autoreferat

Regulacja ekspresji genów na poziomie RNA w mózgu i patologiach ośrodkowego układu nerwowego

Dr Monika Piwecka

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Poznań 2024

1. IMIĘ I NAZWISKO

Monika Piwecka

Nazwisko panięskie: **Nowak**

2. DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

Doktor nauk chemicznych, specjalizacja: biochemia, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Rok przyznania: 2012

Tytuł pracy dyplomowej: „*Terapeutyczne zastosowanie kwasów nukleinowych*”

Promotor: Prof. dr hab. Jan Barciszewski

Magister biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Rok przyznania: 2005

Tytuł pracy dyplomowej: „*Inhibicja wirusa mozaiki tytoniu przy pomocy katalitycznego RNA*”

Promotor: Prof. dr hab. Jan Barciszewski

Licencjat z biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Rok przyznania: 2003

Tytuł pracy dyplomowej: "*Rola telomerów i telomerazy w procesie transformacji nowotworowej*"

Promotor: Dr Przemysław Nuc

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

11/2019 – obecnie **Kierownik Zakładu Niekodujących RNA**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

02/2015 – 10/2019 **Pracownik naukowy ze stopniem doktora (typu post-doc)**

Berlin Institute for Medical Systems Biology, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Helmholtz Association, Berlin, Niemcy

02/2012 – 01/2015 **Asystent**

Zakład Biologii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

10/2005 – 01/2012 **Doktorant**

Zakład Biochemii tRNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

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

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Regulacja ekspresji genów na poziomie RNA w mózgu i patologiach ośrodkowego układu nerwowego

4.2. PUBLIKACJE (P) WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

P1

Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues.

Piwecka M*, Rolle K*, Belter A, Barciszewska AM, Żywicki M, Michalak M, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J#. *Molecular Oncology* 2015 Aug; 9(7):1324-40. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.03.007

IF 2014 = 5.367; MNiSW 2015 = 40; MNiSW 2021 =140; Cyt=78

Moja kontrybucja: sformułowanie problemu badawczego i koncepcji pracy, wybór metodyki badawczej, zaplanowanie i wykonanie eksperymentów: otrzymanie oraz przygotowanie materiału RNA do mikromacierzy RNA oraz bibliotek RNA-seq, meta-analiza danych literaturowych, zestawienie wyników własnych z danymi literaturowymi, analiza i interpretacja uzyskanych danych, przygotowanie rysunków i tabel do manuskryptu, napisanie w całości pierwszej wersji manuskryptu, rewizja manuskryptu, redakcja ostatecznej wersji manuskryptu (przy udziale pozostałych współautorów).

P2

Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function.

Piwecka M*, Głażar P*, Hernandez-Miranda LR*, Memczak S, Wolf SA, Rybak-Wolf A, Filipchuk A, Klironomos F, Cerda Jara CA, Fenske P, Trimbuch T, Zywitza V, Plass M, Schreyer L, Ayoub S, Kocks C, Kühn R, Rosenmund C, Birchmeier C, Rajewsky N#. *Science* 2017 Sep 22;357(6357). DOI: 10.1126/science.aam8526

IF 2016 = 37.205; MNiSW 2016 = 50; MNiSW 2021 = 200; Cyt=881

Moja kontrybucja: sformułowanie problemu badawczego i koncepcji pracy – współudział wraz z autorem korespondencyjnym; wybór metodyki badawczej, zaplanowanie i wykonanie eksperymentów: CRISPR/Cas9 (zaprojektowanie, klonowanie, przygotowanie, przetestowanie konstruktyw), zaprojektowanie genetycznie zmutowanej linii myszy Cdr1as KO, opracowanie i wdrożenie procedury genotypowania, namnożenie kolonii zmutowanych myszy, zaplanowanie fenotypowania, analizy transkryptomyczne (wszystkie total RNA-seq, poly(A)-selected RNA-seq, small RNA RNA-seq, wykonanie bibliotek, sekwencjonowanie i współudział w analizie wyników, interpretacja wyników), nadzór nad analizami elektrofizjologicznymi, przeprowadzenie wszystkich reakcji walidacyjnych qRT-PCR i TaqMan assay, przygotowanie analiz walidacyjnych smRNA

FISH oraz Nanostring, przeprowadzenie części eksperymentów behawioralnych, koordynacja wszystkich eksperymentów behawioralnych, koordynowanie współprac naukowych, analiza i interpretacja wszystkich uzyskanych danych, napisanie części pierwszej wersji manuskryptu (wyniki i dyskusja), wykonanie draftu rysunków do manuskryptu, koordynacja i/lub wykonanie ostatecznych rysunków do manuskryptu, redakcja i poprawa ostatecznej wersji manuskryptu (przy udziale pozostałych współautorów).

P3

Single-Molecule Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) of Circular RNA CDR1as.

Kocks C, Boltengagen A, **Piwecka M**, Rybak-Wolf A, Rajewsky N#. *Methods in Molecular Biology* 2018;1724:77-96. DOI: 10.1007/978-1-4939-7562-4_7

IF= n.d. (rozdział w książce); MNiSW: n.d. (rozdział w książce); Cyt=27

Moja kontrybucja: walidacja opublikowanego protokołu w hodowlach komórek P19, w tym: zaplanowanie i wykonanie eksperymentów (hodowla i stymulacja różnicowania komórek P19 w kierunku neuronów, utrwalenie i przygotowanie neuronów do detekcji RNA - wyniki w Fig. 2 oraz Fig. 3), analiza i interpretacja uzyskanych danych smRNA FISH, współudział w pisaniu i redagowaniu manuskryptu (przy udziale pozostałych współautorów).

P4

miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells.

Grabowska M*, Kuczyński K*, **Piwecka M**, Rabiasz A, Zemła J, Głodowicz P, Wawrzyniak D, Lekka M, Rolle K#. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2022, 26(14):3913-3930. DOI: 10.1111/jcmm.17428

IF 2021 = 5.295; MNiSW 2021 = 100; Cyt=4

Moja kontrybucja: współudział w formułowaniu problemu badawczego i koncepcji pracy, zaplanowanie i wykonanie eksperymentów z zastosowaniem suplementacji miRNA, opracowanie i wybór metodyki badawczej w części dotyczącej pracy z kulturami komórek glejaka, analiza i interpretacja uzyskanych danych, udział w redagowaniu rysunków do manuskryptu, redagowanie ostatecznej wersji manuskryptu (przy udziale pozostałych współautorów).

P5

Single-cell and spatial transcriptomics: deciphering brain complexity in health and disease.

Piwecka M, Rajewsky N, Rybak-Wolf A#. *Nature Reviews Neurology* 2023, 19(6):346-362. DOI: 10.1038/s41582-023-00809-y

IF 2021 = 44.711; MNiSW 2021 = 200; Cyt =45

Moja kontrybucja: sformułowanie tematyki i zakresu pracy przeglądowej, studium literaturowe obejmujące >200 oryginalnych prac badawczych, wykonanie rysunków do manuskryptu (Fig. 1-

4), wiodący udział w napisaniu pierwszej i kolejnych wersji manuskryptu, redagowanie i poprawa ostatecznej wersji manuskryptu (przy udziale pozostałych współautorów).

Nazwisko habilitantki jest wytłuszczone;

#autor korespondencyjny;

*autorzy, którzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy,

Cyt – liczba cytowań.

n.d. – brak danych.

Dane naukometryczne dotyczące osiągnięcia habilitacyjnego podano wg bazy *Web of Science Core Collection*, z dnia 16/08/2024.

Sumaryczny *Impact Factor* z roku poprzedzającego ukazanie się publikacji = **92.578**

Łączna liczba punktów MNiSW z roku poprzedzającego ukazanie się publikacji = **390**

Łączna liczba punktów MNiSW zgodnie z najnowszą listą opublikowaną 05.01.2024 = **640**

Łączna liczba cytowań = **1035**

Oświadczenia potwierdzające wkład habilitantki w powstanie prac zamieszczono w **Załączniku nr 5**. Kopie powyższych publikacji zamieszczono w **Załączniku nr 6**.

4.3. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Omówione poniżej badania składające się na moje osiągnięcie naukowe zatytułowane „*Regulacja ekspresji genów na poziomie RNA w mózgu i patologiach ośrodkowego układu nerwowego*”, realizowałam w latach 2013-2023 w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN (ICHB PAN) w Poznaniu oraz w Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC) w Berlinie. Moje osiągnięcie naukowe stanowi zbiór pięciu wieloautorskich publikacji, z których trzy przedstawiają wyniki oryginalnych badań, jedna jest rozdziałem książki, w której opublikowano protokół badawczy poparty wynikami własnymi, a jedna jest rozległym studium literaturowym i pracą przeglądową. Jestem pierwszą autorką trzech spośród tych prac. Wybór publikacji do osiągnięcia naukowego podyktowany został wpływem tych prac na rozwój dziedziny i środowiska naukowego, a także na mój osobisty rozwój naukowy.

Pliki zawierające rzeczony publikacje w formacie PDF zostały dołączone do elektronicznej wersji wniosku.

A. WPROWADZENIE

Regulacja ekspresji genów w komórkach układu nerwowego

Ośrodkowy układ nerwowy ssaków składa się z kilku tysięcy typów i podtypów komórek, które muszą harmonijnie rozwijać się i współpracować tak, aby stworzyć funkcjonalne obwody neuronowe. Mózg musi również zachować wysoki stopień elastyczności (tzw. neuroplastyczność),

który umożliwia organizmowi dostosowywanie się do środowiska i jest podstawowym czynnikiem wpływającym na funkcjonowanie adaptacyjne. Taka plastyczność jest osiągnięta poprzez wdrożenie programów ekspresji i regulacji genów, wysoce wyspecjalizowanych w komórkach nerwowych. Historycznie większość badań nad RNA koncentrowała się na otwartych ramkach odczytu (ORF) w mRNA ze względu na ich właściwość tj. kodowanie białek. Obecnie jednak uznaje się, że niekodujące, niepodlegające translacji regiony na końcach 5' i 3' mRNA UTR (ang. *untranslated regions*) odgrywają znaczącą rolę regulacyjną, m.in. w lokalizacji transkryptu, jego stabilności i regulacji translacji poprzez elementy *cis*, które rekrutują białka wiążące RNA oraz niekodujące RNA.

Neurony stanowią jedną z najbardziej zróżnicowanych podklas wśród wszystkich typów komórek [Zeng, 2022]. Wyjątkowa różnorodność tych komórek wraz z ich złożonością strukturalną i unikalną fizjologią, w połączeniu z ich długim okresem życia obejmującym całe życie organizmu, prawdopodobnie leży u podstaw wyjątkowych strategii regulacyjnych neuronów. W ciągu ostatnich 10–15 lat z coraz większą częstotliwością publikowane są wyniki dowodzące, że komórki nerwowe posiadają i wykorzystują **wielopoziomowe strategie regulacyjne**, które kierują przetwarzaniem i translacją izoform mRNA specyficznych dla neuronów. Wiele neuronalnych mRNA wskutek alternatywnego składania genów (ang. *alternative splicing*) podlega alternatywnej selekcji eksonów i wytworzeniu różnych izoform mRNA, m.in. w odpowiedzi na stymulację neuronalną. **Alternatywny splicing (AS)** jest szczególnie silny i rozpowszechniony w układzie nerwowym, co ma odzwierciedlenie w największej liczbie eksonów wzbogaconych w tkance nerwowej w porównaniu do innych tkanek i organów. Kluczowa rola AS została opisana w rozwoju neuronów oraz w tworzeniu i funkcjonowaniu sieci neuronowych [Yeo et al., 2004; Barbosa-Morais et al. 2012; Raj & Blencowe, 2015; Vuong et al., 2016; Weyn-Vanhentenryck et al., 2018]. Programy AS i całego splicingu neuronalnego są koordynowane przez działanie białek wiążących RNA (ang. *RNA binding proteins*, RBPs), w tym tych swoiście eksprymowanych lub wzbogaconych w komórkach nerwowych (np. z rodzin Rbfox, Nova, Ptpb, Mbnl). Pojedyncze RBP modulują setki decyzji dotyczących splicingu w całym genomie [Raj & Blencowe, 2015]. AS i wybory eksonów ulegających AS w mózgu mają bardzo duże znaczenie. Zaburzenia tych procesów w neuronach prowadzą do zmian neurologicznych, co zostało rozpoznane m.in. w spektrum autyzmu, rdzeniowym zaniku mięśni, stwardnieniu zanikowym bocznym, ataksjach, demencji, chorobie Huntingtona, chorobach psychicznych (np. schizofrenii) i niepełnosprawności intelektualnej [Licatalosi DD & Darnell, 2006; Nik & Browman, 2019; Nussbacher et al., 2019]. Warto wspomnieć, iż wiele spośród zaburzeń splicingu w chorobach neurologicznych, zwłaszcza neurodegeneracyjnych, jest bezpośrednio powiązane z mutacjami w genach kodujących specyficzne RBP lub innymi patologicznymi zdarzeniami w funkcjonowaniu RBP w określonych podtypach neuronów, np. z agregacją RBP, ich zmienioną lokalizacją komórkową, czy też sekwestracją przez nieprawidłowe RNA [Nussbacher et al., 2019]. Zakłócenie funkcji pojedynczego białka wiążącego RNA może mieć wpływ na zmieniony program splicingu dla wielu genów i transkryptów, setek a nawet tysięcy z nich, co coraz częściej rozpoznawane jest jako zjawisko typowe dla chorób neurologicznych.

W odniesieniu do alternatywnego splicingu w komórkach układu nerwowego należy również wspomnieć o tzw. splicingu wstecznym (ang. *backsplicing*, BS). W konsekwencji BS powstają **koliste RNA** (cyrkularne, ang. *circular RNAs*, **circRNA**). circRNA stanowią formę nietypowych izoform splicingowych, które występują szczególnie obficie w neuronach i układzie nerwowym w porównaniu do innych typów komórek i tkanek [Westholm et al., 2014; Rybak-Wolf et al., 2015, You et al., 2015]. Choć circRNA najczęściej są generowane z genów kodujących białka i powstają w wyniku cyrkularyzacji kilku eksonów, to bardzo rzadko zawierają otwartą ramkę odczytu i zaliczane są do niekodujących RNA. Bardziej szczegółowa charakterystyka tej grupy transkryptów zawarta jest w kolejnej sekcji „Wprowadzenia” dot. niekodujących RNA.

Końce 3' transkryptów kodujących białka ulegają alternatywnemu cięciu i alternatywnej poliadenylacji (ang. *alternative polyadenylation*, APA), przy czym większość genów posiada wiele funkcjonalnych miejsc poliadenylacji. Badania genomiczne i transkryptomyczne, w tym analizy pojedynczych komórek, dowodzą, że **neurony cechują się zdecydowanie najdłuższymi sekwencjami 3' UTR spośród wszystkich typów komórek** [Miura et al., 2012; Smibert et al., 2012; Agarwal et al., 2021]. Co więcej, wśród różnych typów i podtypów neuronów obserwuje się zróżnicowane wzory rozmieszczenia przestrzennego mRNA w różnych obszarach neuronalnych w zależności od izoformy APA i w odpowiedzi na aktywność neuronu [Tushev et al., 2018]. Izofomy mRNA z dłuższymi APA cechują się większą stabilnością i dłuższymi czasami półtrwania w komórce i takie właśnie bardziej stabilne mRNA są transportowane do wypustek nerwowych [Tushev et al., 2018].

Neurony, komórki o długich wypustkach i spolaryzowanej strukturze, muszą posiadać mechanizmy umożliwiające kontrolę syntezy białka w różnych, czasem dalekich od ciała komórki, przedziałach komórkowych. Co ważne, mechanizmy te muszą być niezwykle efektywne i skoordynowane czasowo, dając neuronom możliwość reakcji na bodźce. Ważnymi mechanizmami regulującymi powstawanie sub-komórkowego proteomu w neuronach są: (1) **sortowanie mRNA do odpowiednich przedziałów komórkowych** i (2) **lokalna translacja białek**. Wykazano, że różne grupy mRNA są obecne w dendrytach i aksonach komórek nerwowych [Cajigas et al., 2012]. Ponadto, wysiłki mające na celu scharakteryzowanie transportu mRNA w neuronach wykazały, że depolaryzacja błony komórkowej prowadzi do wzrostu ilości mRNA w dendrytach np. mRNA kodujących kinazę białkową II alfa zależną od wapnia/kalmoduliny (α CaMKII), BDNF lub β -aktynę [Yoon et al., 2016]. Lokalna translacja w neuronach jest obecnie intensywnie badany i dobrze rozpoznawanym zjawiskiem [Holt et al., 2019]. Badania ta stymulują kolejne pokolenia badaczy do identyfikowania czynników związanych z lokalną translacją w innych typach komórek o złożonej morfologii, m.in. w komórkach glejowych. Lokalna translacja w astrogleju, oligodendrocytach i mikrogleju jest procesem regulującym podstawowe funkcje tych komórek, np. efektywną fagocytozę przez obwodowe wypustki mikrogleju [Vasek et al., 2023]. Innym interesującym zjawiskiem, które zostało niedawno opisane w odniesieniu do komórek nerwowych, jest **alternatywna translacja**, proces, który zależy od zróżnicowanego wykorzystania miejsc inicjacji translacji w obrębie pojedynczego transkryptu. Podobnie jak alternatywny splicing, alternatywna translacja wpływa na dywersyfikację proteomu i umożliwia uzyskanie większej

złożoności biologicznej z tego samego zestawu genów. W laboratorium Dougherty'ego wykazano, że wybór miejsca inicjacji translacji na mRNA może być zależny od aktywności neuronów [Sapkota et al., 2019].

Wyżej wymienione przykłady nie wyczerpują listy procesów regulacyjnych, które działają na poziomie RNA i różnicują programy ekspresji genów w komórkach nerwowych. Inne ważne warstwy regulacyjne obejmują **edycję RNA**, tj. post-transkrypcyjne modyfikacje adenozyliny do inozyny, które są coraz częściej rozpoznawane, jako specyficzne dla typu komórki w odniesieniu do różnych populacji neuronów i gleju [Cuddleston et al., 2022], inne **modyfikacje RNA**, np. N6-metyloadenozylna (m6A) najczęściej spotykana w mRNA [Mathoux et al., 2021], oraz wpływ **regulacyjnych niekodujących RNA**. **Regulacyjne niekodujące RNA**, podobnie jak mRNA kodujące białka, również podlegają post-transkrypcyjnemu przetwarzaniu, modyfikacjom i lokalizują się w przedziałach sub-komórkowych, np. dendrytach, co wpływa na ich aktywność i swoistość.

Niekodujące RNA w komórkach układu nerwowego

Wiedza na temat **niekodujących RNA** (ang. *non-coding RNAs*, **ncRNAs**) rozwija się bardzo dynamicznie w ostatnich 20 latach. W komórkach eukariotycznych, do kanonicznych, niekodujących RNA, takich jak: rybosomalne RNA (rRNA), transferowe RNA (tRNA), małe jądrowe RNA (snRNA), jąderkowe RNA (snoRNA), dołączono nowe klasy małych niekodujących RNA (ang. *small non-coding RNAs*), długich niekodujących RNA, kolistych RNA, enhancerowych RNA (ang. *enhancer-derived RNAs*, eRNA), długą listę antysensowych RNA, Y RNA, i inne. Aktualne szacunki wskazują, że ponad 80% genomu człowieka ulega transkrypcji, co dowodzi, że liczba ncRNA znacznie przewyższa liczbę genów kodujących białka, które pochodzą z mniej niż 5% naszego genomu. **Specyficzne dla mózgu regulacyjne ncRNA dodają kolejny poziom złożoności regulacyjnej i „dostrajają” programy ekspresji genów w komórkach nerwowych.**

MikroRNA (miRNA) to niekodujące RNA o długości 22-23 nukleotydów, które kierują potranskrypcyjną represją docelowych mRNA w różnych liniach eukariotycznych. miRNA są negatywnymi modulatorami ekspresji genów, które są zaangażowane w wiele procesów biologicznych. Odkrycie miRNA w 1993 roku [Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993] i następujący po nich postęp w zrozumieniu biologii małych RNA (ang. *small RNAs*) na nowo zdefiniowały krajobraz biologiczny, znacząco zmieniając utrwalone dogmaty dotyczące regulacji ekspresji genów. Od odkrycia mikroRNA upływa właśnie 30 lat, z czego ostatnie 20 było poświęcone w dużej mierze na zgłębianie ich biogenezy, mechanizmów działania, w tym współdziałających rekrutowanych białek i całych kompleksów białkowych, w których miRNA działają, i wreszcie na próby określenia docelowych „targetowych” mRNA i profilowania regulatorowych miRNA w różnych organizmach i tkankach.

W królestwie zwierząt istnieją dwa główne mechanizmy regulacyjne represji transkryptu docelowego przez miRNA [Bartel, 2018], tj. (1) represja translacyjna i (2) indukcja destabilizacji mRNA przez deadenylację, dekapping i późniejszy rozpad mRNA (Ryc. 1A). Rzadziej miRNA

mediuje przecięcie docelowego transkryptu poprzez hydrolizę endonukleolityczną, która w tym przypadku jest katalizowana przez związane z miRNA białko Argonaute 2, Ago2 (Rys. 1A). **miRNA tworzą złożone sieci interakcji**, w których wiele różnych miRNA może wiązać się z 3'UTR i powodować represję jednego transkryptu (Rys. 1B), a z drugiej strony jedno miRNA może brać udział w regulacji wielu różnych mRNA (Rys. 1C). Wiązanie miRNA z blisko rozmieszczonymi miejscami docelowymi w 3'UTR mRNA może powodować kooperacyjną i silniejszą represję docelowego mRNA [Gebert & MacRae, 2019]. Większość dojrzałych miRNA jest zlokalizowana i działa w cytoplazmie, choć zbadano, że niektóre miRNA bywają zlokalizowane głównie w jądrze. Funkcja (bądź funkcje) jądrowych miRNA jest nadal przedmiotem debaty i w chwili obecnej pozostaje dość niejasna. Niektóre spośród miRNA są wydzielane z komórek do przestrzeni pozakomórkowej np. w egzosomach (Rys. 1A), są to na przykład tzw. krążące miRNA (ang. *circulating RNA*), które znajdują się w osoczu i surowicy. Odkrycie egzosomalnych miRNA doprowadziło do wysunięcia hipotez, że mogą one brać udział w sygnalizacji międzykomórkowej i służyć, jako biomarkery w przypadku niektórych chorób człowieka.

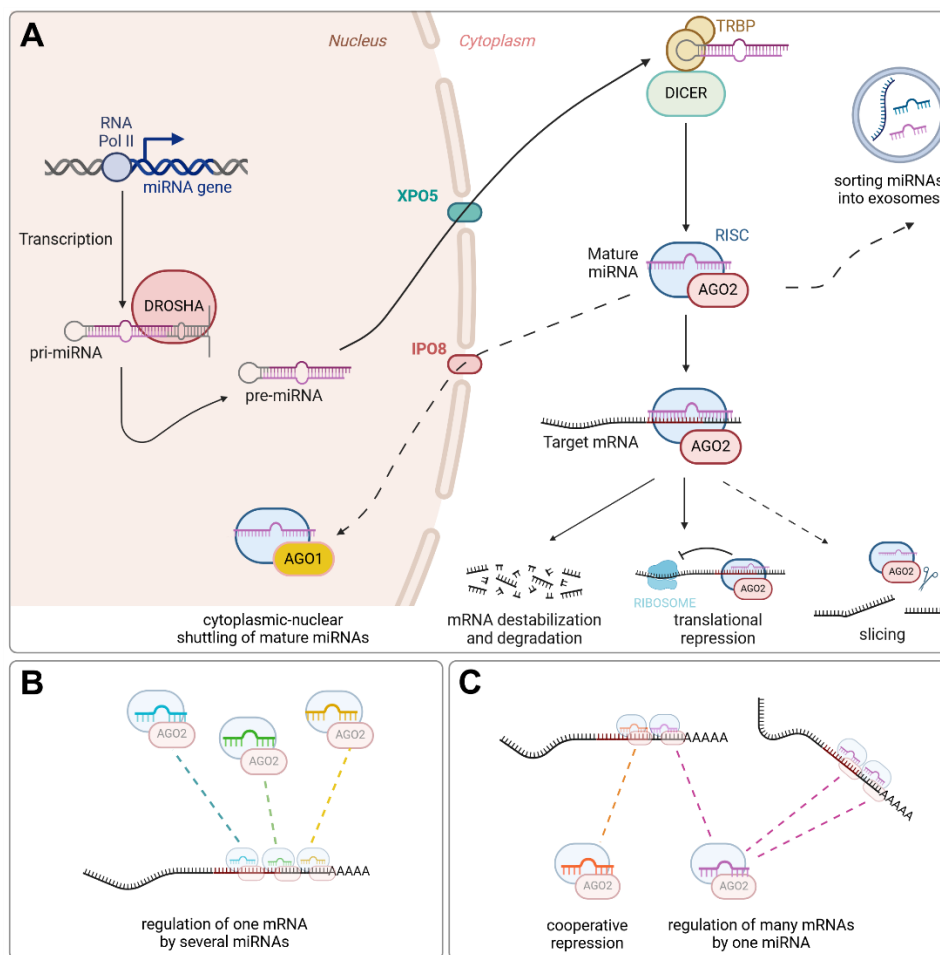
miRNA grupuje się w rodziny na podstawie podobieństwa ich sekwencji *seed*, tj. nukleotydów 2–8 licząc od końca 5' miRNA. To sekwencja *seed* jest przede wszystkim odpowiedzialna za wiązanie miRNA do mRNA. W komórkach zwierzęcych miRNA działają poprzez wiązanie się do regionów 3' UTR w obrębie mRNA, a ta interakcja, wspomagana przez białka Argonaut (AGO) i TNRC6, pośredniczy w rozpadzie mRNA i represji translacji docelowych mRNA. miRNA załadowane do AGO są podstawowymi składnikami kompleksu wyciszającego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). Szlak biogenezy miRNA został dość dobrze zbadany w wielu organizmach modelowych. miRNA są transkrybowane z genów miRNA głównie przez polimerazę RNA II, a jednostki transkrypcyjne, zwane pierwotnymi transkryptami miRNA (pri-miRNA), mogą składać się z pojedynczego miRNA lub klastra często powiązanych (z jednej rodziny), a czasami niespokrewnionych miRNA (tj. miRNA z różnych rodzin). miRNA mogą być również generowane z intronów lub lncRNA [Bartel, 2018].

miRNA cechują się tkankowo-specyficznymi wzorcami ekspresji i coraz częściej dowiadujemy się, że ich ekspresja jest swoista dla typu komórki [Juzenas et al., 2017; Nowakowski et al., 2018; de Rie et al., 2017]. Zaburzenie procesu dojrzewania miRNA lub nawet pojedynczego *locus* miRNA w pojedynczym typie komórek może skutkować poważnymi konsekwencjami fizjologicznymi i defektami rozwojowymi [Bartel, 2018]. Doskonałym przykładem jest **mikroRNA-7 (miR-7)**, który jest najwyżej ekspresjonowanym mikroRNA w przysadce mózgowej ssaków [Zacharjasz et al., 2024]. Genetyczna ablacja jednego z trzech *loci* dla miR-7 u myszy skutkowało silnym fenotypem, tj. niedoczynnością przysadki mózgowej, która skutkowało niedoczynnością gonad i nieplodnością zarówno u samiczek, jak i samców zmutowanych myszy [Ahmed i in.; 2017]. Dalsze analizy zmutowanych myszy z delecją *mir-7a2* (ang. *knockout*, KO) wskazały na absolutnie kluczową rolę miR-7 dla funkcji komórek gonadotropowych i laktotropowych w produkcji hormonów w przysadce mózgowej [Ahmed et al., 2017; LaPierre et al., 2021]. Bardziej ogólnie, badanie utraty funkcji *mir-7a2* jest przykładem obrazującym

ogromną rolę pojedynczego transkryptu miRNA w regulacji funkcji fizjologicznych, w tym przypadku związanych z płodnością.

Oprócz komórek przysadki mózgowej, miR-7 ulega silnej ekspresji w komórkach β trzustki, gdzie jest zaangażowany w regulację mRNA kodujących białka, które są związane z wydzielaniem insuliny [Latreille et al., 2014]. Innym miejscem, gdzie miR-7 występuje na wysokim poziomie jest podwzgórze, szczególnie jądro łukowate (ARC, ang. *arcuate nucleus*) i jądro przykomorowe (PVN, ang. *paraventricular nucleus*), gdzie miR-7 został powiązany z regulacją genów w obwodach melanokortyny [LaPierre et al., 2022]. miR-7 jest również szeroko ekspresjonowany w innych niż podwzgórze obszarach mózgu (choć w mniejszych ilościach). W mózgu myszy miR-7 jest wykrywalny już we wczesnych stadiach rozwojowych, w okolicy 12.5. dnia embrionalnego (E12.5) [Pollock et al., 2014], a jego ekspresja została powiązana, między innymi, z represją mRNA *Pax6* w neuronach dopaminergicznych w przodomózgowiu [de Chevigny et al., 2012]. Wykazano, że biogeneza miR-7a jest różna w zależności od tego, czy zachodzi w neuronach, czy w komórkach nie-neuronalnych [Choudhury et al., 2014]. Dwa białka wiążące RNA, które są zaangażowane w powstanie dojrzałego miR-7 to homolog Musashi 2 (MSI2) i białko HuR [Choudhury et al., 2014]. **W mózgu ssaków dojrzały miR-7 jest ściśle kontrolowany posttranskrypcyjnie, a ta właściwość wydaje się być ważna w prawidłowym funkcjonowaniu neuronów pobudzających**, o czym opowiem w kolejnych etapach niniejszej dysertacji, podczas dyskusji wyników własnych.

Wczesne badania nad ekspresją miRNA w trakcie rozwoju mózgu ssaków sugerowały, że funkcje miRNA mogą być ważne dla specyfikacji komórek nerwowych i rozwoju kolców dendrytycznych [Smirnowa et al., 2005; Schratt et al., 2006]. Ogromne znaczenie miRNA we wczesnym rozwoju mózgu, prawidłowej neurogeniezie, dojrzewaniu i przeżyciu neuronów postnatalnych zostało wykazane w modelach warunkowego usunięcia tzw. mutacji typu warunkowego *knockout*, cKO (ang. *conditional knockout*) genu kodującego *Dicer*, który jest jednym z głównych czynników biogenezy miRNA. Wiele z tych cKO *Dicer* w liniach komórek (ang. *cell lineage*) specyficznych dla mózgu w modelach mysich, np. pod kontrolą promotorów *Wnt1-Cre*, *Nex-Cre* lub *CaMKII- α -Cre*, okazało się śmiertelnych w stadiach embrjonalnych lub wczesnych postnatalnych z głęboko zdeformowanymi mózgami [Radhakrishnan & Alwin Prem Anand, 2016]. Również ablacja genetyczna *loci* kodujących miRNA specyficzne dla mózgu skutkowało poważnymi fenotypami neurologicznymi, którym często towarzyszyła przedwczesna śmierć. Np. zmutowane myszy z delecją *microRNA-9-2* i *microRNA-9-3* wykazywały poważne zahamowanie wzrostu, miały mniejsze półkule mózgowe i opuszki węchowe, zdeformowane komory boczne mózgu i umierały w ciągu tygodnia po urodzeniu [Shibata et al., 2011]. Aktualnie uznaje się, że miR-9 jest niezbędnym, mózgowo-specyficznym miRNA, ważnym dla prawidłowego rozwoju kresomózgowia (łac. *telencephalon*) i zaangażowanym w kontrolowanie proliferacji i różnicowania progenitorów neuronalnych [Radhakrishnan & Alwin Prem Anand, 2016].



Rycina 1.

Przetwarzanie, dojrzewanie i funkcje regulacyjne kanonicznych miRNA w komórkach zwierzęcych (schemat i opis zaczerpnięto z pracy P6).

A. Biogeneza i funkcja kanonicznego miRNA. Geny miRNA są transkrybowane do pierwotnych transkryptów miRNA (pri-miRNA) i przechodzą wieloetapową biogenezę. W pierwszej kolejności pri-miRNA jest przetwarzane do prekursorowego miRNA (pre-miRNA) w jądrze komórkowym. Eksportyna 5 (XPO5) rozpoznaje pre-miRNA i transportuje je do cytoplazmy. W cytoplazmie pre-miRNA jest dalej przetwarzane do dojrzałych miRNA i ładowane do kompleksu wyciszającego RISC. Główną funkcją regulacyjną miRNA ładowanego do kompleksu wyciszającego jest wiązanie się z docelowym mRNA, zwykle w obrębie 3'UTR mRNA, i wywoływanie represji tego transkryptu. Najczęstszymi typami represji mRNA w komórkach zwierzęcych, w których pośredniczy miRNA, są rozpad mRNA i represja translacji. Cięcie docelowego transkryptu kierowane przez miRNA (linia przerywana na schemacie) jest rzadkie w komórkach zwierzęcych. Niektóre dojrzałe miRNA są transportowane z powrotem do jądra przez importynę 8 (IPO8), gdzie Ago1 odgrywa dominującą rolę w rekrutacji miRNA. Niektóre miRNA są uwalniane z komórek w mikropęcherzykach i w małych pęcherzykach pozakomórkowych, w tym egzosomach. Proponuje się, że te uwolnione z komórek miRNA mogą stanowić nowy sposób komunikacji międzykomórkowej. **B.** Jedno mRNA może być wiązane i regulowane przez wiele różnych miRNA. **C.** Jedno miRNA może wiązać i regulować wiele różnych mRNA. Wiązanie miRNA z blisko rozmieszczonymi miejscami docelowymi na mRNA przyczynia się do kooperacyjnej i bardziej znaczącej (tj. silniejszej) represji docelowego mRNA.

Innymi małymi ncRNA zidentyfikowanymi w neuronach są **piRNA**, RNA oddziałujące z białkami Piwi (ang. *Piwi-interacting RNA*). Są one nieco dłuższe od miRNA (około 30 nukleotydów) i znajdują się głównie jądrach komórkowych, a ich najlepiej poznana funkcja związana jest z wyciszaniem transpozonów w komórkach germinalnych. Badania funkcjonalne w bezkręgowcach pokazały, że piRNA mogą być zaangażowane w procesy rozwoju neuronów i neuroplastyczności [Rajasethupathy et al., 2012; Kim et al., 2018], natomiast biologiczne znaczenie piRNA w komórkach somatycznych kręgowców, w tym w dojrzałych neuronach, pozostaje kontrowersyjne [Tosar et al., 2018].

Koliste RNA

Koliste RNA (ang. *circular RNA*, **circRNA**) zostały po raz pierwszy zidentyfikowane w połowie lat 70-tych ubiegłego stulecia. Wtedy odkryto, że wiroidy, patogeny roślin, są zakaźnymi kolistymi, jednoniciowymi cząsteczkami RNA [Sanger et al., 1976]. W kolejnych dwudziestu latach od czasu tej obserwacji pojawiały się doniesienia o wykryciu endogennych kolistych RNA w cytoplazmie komórek eukariotycznych, np. w HeLa [Hsu et al., 1979], jednak środowisko naukowe postrzegało je, jako niezrozumiałe kuriozum lub artefakt błędnego splicingu [Cocquerelle et al., 1993]. Dopiero w latach 2012-2013 dzięki zastosowaniu technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA (RNA-seq), w szczególności sekwencjonowania całkowitego RNA (*total RNA sequencing*) z zastosowaniem RNazy R, oraz nowych algorytmów bioinformatycznych dedykowanych do identyfikacji innych niż liniowe transkrypty, stało się jasne, że koliste RNA to fenomen dość powszechny w biologii. Zidentyfikowano tysiące circRNA u eukariontów, w tym u grzybów, protistów, roślin, bezkręgowców, ryb i ssaków. Dodatkowo, analizy RNA-seq pokazały, że profile ekspresji circRNA są komórkowo-, tkankowo-specyficzne i specyficzne dla stadium rozwojowego [Memczak et al., 2013; Salzman 2012]. Stało się też jasne, że circRNA są dużo bardziej stabilne niż klasyczne liniowe RNA [Jeck et al., 2013; Enuka et al., 2016].

Większość circRNA, podobnie jak mRNA, ulega transkrypcji z genów kodujących białka. Większość circRNA zawiera jeden lub kilka kowalencyjnie zamkniętych eksonów i powstaje w procesie już wspomnianego *backsplicingu* (splicingu wstecznego). Tak oto, z jednego genu kodującego białko – obok jednej dominującej lub kilku izoform mRNA, generowane są koliste RNA, również w jednej dominującej lub kilku różnych izoformach. Koliste RNA nie mają końców, nie posiadają czapeczki, ani ogona poli(A), jednak mimo to większość z nich jest eksportowana do cytoplazmy. Wewnętrzna retencja intronów może prowadzić do produkcji circRNA, które zawierają sekwencje pochodzące zarówno z eksonów, jak i intronów, są to tzw. circRNA ekson-intron [Li et al., 2015]. Znane są również koliste RNA pochodzące wyłącznie z intronów, powstające z lariatów (struktur lassa), które nie ulegają całkowitej degradacji, a jedynie są pozbawiane końca 3', są to tzw. koliste intronowe RNA (ang. *circular intronic RNA*, **ciRNA**) [Zhang et al., 2013]. CircRNA ekson-intron i ciRNA są zazwyczaj akumulowane w jądrze komórkowym, podczas gdy zdecydowana większość **eksonowych circRNA** lokalizuje do cytoplazmy. Proces eksportu circRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy jest tylko częściowo poznany.

Na początku 2015 roku opublikowano dwie przełomowe prace na temat **circRNA w układzie nerwowym** [Rybak-Wolf i in., 2015; You i in., 2015]. Obie pozycje były inspirujące i stanowiły bardzo dobry punkt odniesienia, który pomógł rozwinąć moje pomysły i hipotezy w badaniach nad circRNA (jak opisano poniżej w sekcji „OMÓWIENIE WYNIKÓW”). Te dwa niezależne studia wykazały, że circRNA są ekspresjonowane znacznie wyżej w mózgu niż w innych narządach i tkankach u ludzi i gryzoni. Wyjątkowo duża liczba różnych cząsteczek circRNA w mózgu została potwierdzona przez inne badania i sekwencjonowania circRNA przeprowadzone w tych samych gatunkach lub z prób pobranych od innych ssaków i w porównaniu do wielu różnych tkanek, np. u makaka [Ji i in., 2019]. Ponadto wykazano, że profile circRNA są zróżnicowane w zależności od obszaru mózgu. Wykazano, że circRNA ulegają dynamicznej ekspresji w ośrodkowym układzie nerwowym, często niezależnie od dynamiki transkryptu liniowego, tj. wykazują wzorce wzrostu lub spadku ekspresji podczas różnych stadiów dojrzewania mózgu oraz podczas różnicowania neuronów *in vitro*, a także dojrzewania pierwotnych kultur neuronalnych. Rybak-Wolf i wsp. odkryli setki circRNA, które są ekspresjonowane kilkakrotnie silniej niż ich liniowa izoforma i odkryli, że stosunek ekspresji circRNA do liniowego transkryptu jest najwyższy w mózdzku. Autorzy tej pracy spekulowali, że obserwowane wzbogacenie ekspresji circRNA w mózdzku może być związane z wysoką ekspresją circRNA w neuronach, ponieważ mózdzek ma większą gęstość komórek nerwowych w porównaniu z innymi obszarami mózgu. Te i późniejsze badania [np. Gokool et al., 2020] wykazały również, że circRNA są głównymi izoformami transkryptów pochodzących z wielu genów neuronalnych w ludzkim mózgu. Co ciekawe, zauważono, że wśród *loci*, które są transkrybowane do circRNA w mózgu jest wzbogacenie genów kodujących białka związane z synapsami, a najwyższy szczyt globalnego wzrostu ekspresji circRNA w mózgu myszy przypada w okolicy 10-tego dnia po urodzeniu, tj. wtedy kiedy intensyfikuje się synaptogeneza [You et al., 2015]. Ponadto wyryto, że istnieje grupa kilkuset transkryptów circRNA, które są wysoce skoncentrowane w synaptosomach, a niektóre spośród circRNA zmieniają lokalizację subkomórkową pod wpływem depolaryzacji neuronów [Rybak-Wolf et al., 2015; You et al., 2015]. Wszystkie powyższe fakty wskazują na to, że circRNA mogą odgrywać istotne funkcje w neuronach, jednak ta funkcja lub te funkcje przez wiele lat pozostawały nieuchwytnie. Dzieje się tak częściowo dlatego, że badania nad circRNA są wciąż dość młodą dziedziną. Innym ważnym zastrzeżeniem jest to, że badania nad circRNA są skomplikowane, głównie ze względu na fakt, że większość eksonowych circRNA w dużej mierze pokrywa się sekwencją z mRNA. Jedynym unikalnym fragmentem sekwencyjnym, który może jednoznacznie posłużyć do identyfikacji circRNA i do jego odróżnienia od eksonów w mRNA, jest tzw. połączenie ekson-ekson typu *backsplice* (ang. *backsplice junction*; również: połączenie głowa-ogon, ang. *head-to-tail junction*). Z związku z powyższym, badania nad circRNA często wymagają adaptacji dobrze znanych protokołów w biologii molekularnej w sposób „skrojony” specjalnie do wykrywania, identyfikacji i analiz circRNA. Te nowe podejścia metodologiczne pojawiają się dopiero w ostatnich latach i nadal są optymalizowane.

Należy zauważyć, że istnieje niewiele badań nad circRNA w komórkach glejowych. W ostatnim czasie circRNA zidentyfikowano, jako komórkowo-specyficzne w odniesieniu do populacji

astrocytów, mikrogleju i oligodendrocytów pochodzących z ludzkiego mózgu, a konkretnie z kory płata skroniowego pobranej od pacjentów cierpiących na padaczkę [Curry-Hyde i in., 2020].

W dalszym ciągu nasza wiedza na temat małych i długich ncRNA, w tym circRNA, w komórkach nerwowych i glejowych jest bardzo niekompletna i oczekuje na bardziej szczegółową charakterystykę mechanistyczną i funkcjonalną.

B. CELE BADAŃ

Głównym celem moich badań było i jest **zrozumienie, jak funkcjonują niekodujące RNA, jakie pełnią role molekularne i jak wpływają na procesy regulacji ekspresji genów w komórkach ośrodkowego układu nerwowego w zdrowiu i w chorobie.**

Wśród **celów szczegółowych** przedstawionego osiągnięcia naukowego wyróżniam:

- (1) Identyfikację miRNA deregulowanych w glejokach złośliwych, najbardziej wyniszczających nowotworach mózgu człowieka,
- (2) Określenie związku obniżonego poziomu miR-218 w glejokach złośliwych z procesem nowotworzenia,
- (3) Zrozumienie funkcji molekularnych kolistych RNA (circRNA) w mózgu ssaków, na przykładzie wzbogaconego w układzie nerwowym, wysoko ekspymowanego transkryptu circRNA *Cdr1as* i zastosowaniem modelu mysiego,
- (4) Określenie znaczenia oddziaływania miRNA miR-7 z niekodującym transkrypcem circRNA *Cdr1as* dla funkcjonowania mózgu,
- (5) Zrozumienie heterogenności transkryptomów w pojedynczych komórkach w układzie nerwowym w kontekście zdrowia i choroby ośrodkowego układu nerwowego (OUN) człowieka i w modelowych organizmach ssaczy.

U źródła wyżej wymienionych celów badawczych były hipotezy badawcze wysunięte na podstawie wcześniejszych badań własnych oraz analiz literaturowych. Główne hipotezy badawcze zostaną przedstawione w kolejnej części autoreferatu, jako wstęp do omawianych wyników.

Realizacja celów głównego i szczegółowych odbywała się poprzez badania niekodujących RNA, zarówno na poziomie całego transkryptomu, jak i bardziej szczegółowych analiz pojedynczych, wybranych cząsteczek RNA w liniach komórkowych (pierwotnych i standardowych, unieśmiertelnionych), tkankach od pacjentów oraz w modelu mysim. W swojej pracy stosowałam szeroki zakres metod i technik biologii molekularnej, biologii komórki oraz biologii systemowej, by jak najpełniej odkryć nieodkryte.

C. OMÓWIENIE WYNIKÓW

mikroRNA w nowotworach glejowych – od profilowania ekspresji miRNA do identyfikacji i walidacji potencjalnych celów terapeutycznych

Wraz z rozwojem metod wysokoprzepustowego profilowania miRNA, kolejno - mikromacierzy miRNA i głębokiego sekwencjonowania małych RNA (ang. *small RNA sequencing*), narastała liczba prac o katalogach miRNA w różnych typach tkanek zdrowych i stanach patologicznych, w różnych organizmach i w różnych stadiach rozwojowych. Unikalne sygnatury miRNA w chorobach dziedzicznych, metabolicznych, zakaźnych i nowotworowych przydały nowego wymiaru badaniom nad ich patogenezą i wskazały na potencjał miRNA, jako biomarkerów stanów chorobowych oraz potencjalnie – celów molekularnych w terapiach. W odniesieniu do badań nad nowotworami człowieka zauważono, że pewna grupa miRNA ulega wysokiej, anormalnej ekspresji w biopsjach i wycinkach wielu raków, i że wzrost ekspresji tych miRNA wpływa na promowanie odporności komórek nowotworowych na apoptozę oraz wzmacnia ich proliferację i zwiększa inwazyjność poprzez represję genów supresorowych. Takie mikroRNA, zaczęto określać, jako „onkogenne miRNA” lub „oncomiR-y”. Termin „oncomiR” został wymyślony i po raz pierwszy użyty przez laboratorium Scotta M. Hammonda w pracy, w której opisali oni nadekspresję i silny efekt onkogenny klastra *miR-17~92*, który ulega amplifikacji w chłoniakach z limfocytów B [He i in., 2005]. Ta pionierska praca pokazała, że miRNA mogą modulować powstawanie guzów i działać jako onkogeny, implikując przy tym klaster *miR-17-92*, jako potencjalny ludzki oncomiR. Z drugiej strony, w wielu nowotworach zaobserwowano obniżone poziomy lub zahamowanie ekspresji pewnych miRNA, które w homeostatycznych warunkach uczestniczą w represji mRNA kodujących onkogeny. Tą podgrupę miRNA nazwano „supresorowymi miRNA”.

Wraz z postępowaniem badań nad miRNA, te krótkie regulatorowe RNA zaczęły jawić się jako interesujące cele terapeutyczne w nowotworach. Zakładano, że zahamowanie jednego onkogennej miRNA lub ograniczenie jego transkrypcji może doprowadzić do represji i ograniczenia translacji wielu (kilkudziesięciu lub nawet kilkuset) „niepożądanych” mRNA tj. targetów miRNA, które przyczyniają się do wzrostu i inwazji komórek nowotworowych. Pierwszą pracą, w której badano rolę miRNA w **glejaku wielopostaciowym** (łac. *glioblastoma multiforme*, **GBM**), najbardziej agresywnym spośród nowotworów mózgu człowieka, była publikacja z laboratorium Kenneth’a S. Kosik’a na temat miR-21 w komórkach glioblastomy [Chen et al., 2005]. Praca ta pokazywała wyraźnie podwyższone poziomy **miR-21** w tkankach glejaka wielopostaciowego, w hodowlach komórkowych GBM wyprowadzonych od pacjentów oraz w sześciu komercyjnie dostępnych liniach komórkowych glejaka w porównaniu z nienowotworowymi tkankami mózgu płodu i osoby dorosłej oraz w porównaniu z hodowlami komórek glejowych. W roku 2005 została również opublikowana pierwsza praca, w której raportowano wyniki profilowania wysokoprzepustowego miRNA (mikromacierze) w grupie dziewięciu pierwotnych GBM [Ciafrè et al., 2005]. Praca ta pokazywała, że oprócz miR-21, inne miRNA ulegają podwyższonej ekspresji w glejakach złośliwych, w tym najsilniej miR-10b i miR-

130a, a wśród superesorowych miRNA odnotowano obniżenie poziomów m.in. miR-128a oraz swoistych dla mózgu miRNA z rodziny miR-181 (miR-181a, miR-181b, miR-181c).

Bazując na powyższej wiedzy, w mojej pracy badawczej wysunęłam **hipotezę, że deregulowane miRNA w glejakach mogą stanowić cele molekularne, które mogą być zastosowane do projektowania przyszłych terapii antynowotworowych w leczeniu glejaków złośliwych.**

Podejście badawcze dążące do weryfikacji w/w hipotezy zostało wdrożone w odniesieniu do glejaków złośliwych w ramach projektu „*Anty-miRNA jako potencjalne terapeutyki w leczeniu guzów mózgu u ludzi*” (PR5, projekt realizowany w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2009-2014), którego byłam współautorką i współwykonawcą. Dwie główne składowe części projektu obejmowały: (1) **wyłonienie kandydatów miRNA deregulowanych w glejakach złośliwych, jako potencjalne cele molekularne do projektowania terapii ukierunkowanych na leczenie guzów glejowych**, (2) opracowanie rybozymów, jako narzędzi terapeutycznych do ograniczenia poziomu onkogennych miRNA w komórkach nowotworowych glejaków.

Realizacja celu # (1) w pierwszym rzędzie opierała się na podsumowaniu dostępnych, przeszłych i nowopowstających, list deregulowanych miRNA w glejakach. Jednocześnie, we współpracy z klinicystami z Katedry i Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii w Poznaniu, postanowiliśmy zidentyfikować profile miRNA w złośliwych glejakach mózgu w oparciu o własne badania i pomiary z tkanek pobranych w populacji pacjentów z Polski. Uzasadnieniem dla podjętych badań jest fakt, że jedną z głównych cech charakterystycznych GBM jest heterogenność tych guzów, tzn. istnieje bardzo duża różnorodność molekularna i genetyczna, w tym w profilach ekspresji genów, pomiędzy różnymi pacjentami, co leży u podstaw tzw. heterogeniczności międzyguzowej (ang. *intertumor heterogeneity*). Ponadto, guzy glejowe są również zróżnicowane pod względem składu komórkowego wewnątrz pojedynczych nowotworów, a cechą tą określa się, jako heterogeniczność wewnątrzguzową (ang. *intratumor heterogeneity*). Heterogenność glejaków złośliwych jest jedną z dominujących cech tych nowotworów utrudniających ich leczenie, które od wielu lat pozostaje nieskuteczne.

Wyniki prac profilowania miRNA w złośliwych nowotworach glejowych III i IV stopnia od pacjentów z populacji polskiej (kolejno: w gwiaździaku anaplastycznym oraz glejaku wielopostaciowym) zostały opublikowane w 2015 roku w *Molecular Oncology* (FEBS Press) w pracy pt. „*Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues*” (P1). W manuskrypcie P1, na podstawie **pomiarów miRNA przy pomocy mikromacierzy miRNA oraz głębokiego sekwencjonowania małych RNA** technologią SOLiD, przedstawiliśmy listy deregulowanych miRNA w w/w typach złośliwych nowotworów glejowych w porównaniu do prób izolowanych ze zdrowych mózgów (RNA izolowane pośmiertnie). Ponadto, wykonaliśmy pomiary miRNA w tkankach z obrzeży guzów. Łącznie przeanalizowaliśmy 16 glejaków, 4 obrzeża i porównaliśmy je do 4 zestawów danych ze zdrowych kontroli (analiza różnicowej ekspresji miRNA). Ponadto, przeprowadziliśmy **metaanalizę** wyników profilowania miRNA w tkankach GBM dostępnych w literaturze (stan na rok 2105: 17 opublikowanych prac i zestawów

danych w tym temacie) w połączeniu i dyskusją z wynikami własnymi. Otrzymane wyniki pozwoliły nam wyselekcjonować zestaw miRNA, które były najczęściej deregulowane w glejakach, zaproponować listę **trzydziestu pięciu najbardziej interesujących potencjalnych celów terapeutycznych wśród miRNA** (Tabela 4 w pracy **P1**) oraz 30 nowych biomarkerów miRNA w glejaku wielopostaciowym. Ponadto, zidentyfikowaliśmy **miRNA związane z progresją glejaka** od III stopnia do najbardziej złośliwego IV stopnia złośliwości (GBM). Wśród nich było 14 miRNA o zwiększonym poziomie ekspresji w GBM w porównaniu do gwiazdziaków III stopnia złośliwości oraz 11 miRNA o obniżonym poziomie ekspresji wraz ze wzrostem złośliwości (Tabela 2 w pracy **P1**), przy czym wszystkie 25 deregulowanych miRNA spełniały rygorystyczne kryteria statystyczne i miały wysoki punkt odcięcia (p -value <0.05 , $FC > 3$; FC – ang. *fold change*). Atlas deregulowanych miRNA przedstawiony w publikacji **P1** jest kompleksowym zestawem danych o miRNA w glejakach złośliwych III i IV stopnia złośliwości, wspartym metaanalizą. Publikacja ta jest przydatnym źródłem wiedzy i punktem odniesienia dla innych badaczy zajmujących się miRNA w glejakach. Liczba cytowań tej pracy wg bazy WoS to 78 (stan na 13/08/2024). Co ważne, praca **P1** stała się inspiracją do kolejnych badań i prac dotyczących projektowania narzędzi molekularnych do wyciszenia ekspresji prekursorów i dojrzałych miRNA w komórkach GBM (publikacja **P13**), prac związanych z analizą sekwencji struktury ludzkich miRNA (publikacje **P14** i **P16**) oraz mechanistycznych studiów funkcjonalnych nad wybranymi kandydatami miRNA (publikacja **P4** opisana poniżej).

Publikacja **P4** jest konceptualną kontynuacją pracy **P1**, a jej geneza wiąże się z analizą profili miRNA w glejakach oraz z wcześniejszymi badaniami prowadzonymi w laboratorium pod kierunkiem prof. Jana Barciszewskiego z moim współudziałem nad białkiem **tenascyna C** w GBM (publikacje **P18** i **P20**). Tenascyna C (TNC), kodowana przez gen *TNC*, to glikozylowane białko macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM), które jest ważnym czynnikiem w rozwoju, w tym również w rozwoju układu nerwowego, m.in. zaangażowanym w regulację proliferacji prekursorów oligodendrocytów i astrocytów. TNC jest również czynnikiem wysoce nadekspresywowanym w niektórych typach nowotworów i związanym z inwazyjnością komórek glejaków złośliwych [Hirata et al., 2009; Midwood & Orend, 2009; publikacje własne: **P17**, **P18** i **P20**].

Analizując grupy miRNA, które ulegają obniżonej ekspresji w glejakach IV stopnia złośliwości oraz ich docelowe mRNA (targety), zauważyłam, że niektóre z tych interakcji mogą być zaburzone w komórkach glejaków. Wysunęłam **hipotezę**, że zaburzone miRNA mogą mieć wpływ na wzrost ekspresji genów kodujących białka ECM, w tym TNC oraz białka transbłonowe zaangażowane w procesy adhezji, np. syndekany. Ta hipoteza powstała na bazie przewidywań bioinformatycznych, wyników własnych oraz danych literaturowych dot. poziomów ekspresji wybranych genów, miRNA i białek w glejakach. Przy użyciu takich narzędzi, jak PicTar, TargetScan oraz miRanda wyselekcjonowałam miR-218 oraz miR-495, jako miRNA, które potencjalnie mogą mieć udział w regulacji kilku genów kodujących białka ECM, w tym tenascyny C. W toku badań pilotażowych przetestowałam wpływ „suplementacji” miR-218 na komórki glejaka i poziom TNC poprzez transfekcję tzw. mimika miR-218 (modyfikowane krótkie RNA odpowiadające sekwencji miR-

218). W szczególności, badałam wpływ suplementacji supresorowego miR-218 na hodowlę linii komórek glejaka (test inwazyjności w systemie *xCELLigence Real-Time Cell Analysis*, test migracji, test proliferacji) oraz produkcję białek ECM, w tym tenascyny C (Western blot). Jako, że produkcja białek ECM w kulturach monowarstwowych, adherentnych unieśmiertelniczonych linii komórkowych GBM jest znikoma, do moich badań wprowadziłam kultury 3D linii glejakowych, tzw. kultury w wiszącej kropli, w których niektóre linie komórkowe (np. U118) organizują się w mini-guzy. W pracy nad optymalizacją warunków transfekcji oraz wyprowadzeniem kultur 3D z linii glejaka uczestniczyła również moja magistrantka, Alicja Rabiasz. Analizami poziomu białek ECM po transfekcji miR-218 zajęła się magistrantka Małgorzata Grabowska. Po moim wyjeździe na staż podoktorski w 2015 roku, obie studentki kontynuowały pracę nad udziałem miR-218 w kontroli poziomu białek ECM w glejaku pod kierunkiem dr Katarzyny Rolle. Wyniki pracy zostały opisane w manuskrypcie opublikowanym w 2021 r. w *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (**P4**).

W publikacji **P4** wykazaliśmy, że nadekspresja miR-218 wpływa na zmniejszenie poziomów mRNA i białka TNC oraz syndekanu 2 (SDC-2), co znalazło przełożenie na zmianę **właściwości biomechanicznych** komórek GBM. W szczególności, nadekspresja miR-218 powodowała zmniejszenie potencjału migracyjnego komórek glejaka, wzmacniała ich właściwości adhezyjne oraz powodowała zwiększone usztywnienie komórek. Stosując test podwójnej lucyferazy wykazaliśmy, że mRNA *TNC* i mRNA *SDC2* są bezpośrednimi celami miR-218. Jedną z zaawansowanych obserwacji w tym badaniu jest wpływ miR-218 na właściwości mechaniczne komórek, tj. bezpośrednie zmiany sztywności komórek mierzone technologią mikroskopii sił atomowych (AFM). Podsumowując, doszliśmy do wniosku, że deregulacja miR-218 w pierwotnych i wtórnych GBM wiąże się ze zwiększoną ekspresją jego docelowych mRNA, w tym TNC i SDC-2, co z kolei ma wpływ na przebudowę ECM i zwiększony potencjał migracji komórek glejaka. Opublikowane wyniki dają wgląd do **mechanobiologii GBM**, szczególnie w odniesieniu do **ncRNA, które biorą udział w regulacji czynników bezpośrednio modulujących właściwości mechanobiologiczne komórek glejaka**. Po drugie, potwierdziliśmy, że miR-218 jest silnym supresorowym miRNA w glejaku, który ma duży wpływ na ECM. miR-218 jest potencjalnie dobrym kandydatem do projektowania nowych terapii ukierunkowanych na modulację właściwości mechanobiologicznych mikrośrodowiska guzów mózgu. Wysoka sztywność tkanki guza nie ogranicza się tylko do glejaków złośliwych, a miR-218 został rozpoznany jako miRNA o obniżonym poziomie ekspresji również w innych typach nowotworów (jak omówiono w naszym artykule, **P4**). Gęsta, nieprawidłowa macierz ECM i podwyższona sztywność guza to cechy, które ograniczają skuteczność terapeutyczną nanocząstek i mogą wpływać na zmniejszoną skuteczność leczenia raka metodami tradycyjnymi [Zhang et al., 2024]. Strategie modulacji mikrośrodowiska mechanicznego nowotworów, w tym ingerencja w powstawanie określonych białek ECM, mogą mieć korzystny wpływ na pacjentów onkologicznych i mają implikacje kliniczne dla przyszłych terapii [Lampi i Reinhart-King, 2018].

circRNA Cdr1as – badania utraty funkcji w myszy i określenie specyficzności komórkowej transkryptu w ośrodkowym układzie nerwowym

Moją inspiracją do badań kolistych RNA (cyrkularnych, ang. *circular RNA*, circRNA) była seria publikacji, która ukazała się w 2013 roku [Memczak et al., 2013; Hansesn et al., 2013; Jeck et al., 2013; Salzman et al., 2013]. Wtedy to odkryto, że genomy wielu organizmów, od nicieni po człowieka, w procesie transkrypcji generują cząsteczki RNA o kolistej strukturze. circRNA nie miały jednak rozpoznanej funkcji biologicznej. Potencjalne funkcje były wówczas obiektem spekulacji.

Wspomniane prace zawierały: (1) pierwszą w skali świata obszerną charakterystykę circRNA, jako klasy transkryptów, (2) w sposób bardziej szczegółowy opisywały jeden z nich, koliste RNA **CDR1as** (ang. *cerebellar degeneration-related protein 1 antisense RNA*). Krótkie podsumowanie moich wniosków z tych pionierskich badań: koliste RNA ulegają ekspresji w sposób tkankowo-specyficzny i zależny od stadium rozwojowego. circRNA *Cdr1as* (i jego ludzki odpowiednik CDR1as, zwany także ciRS-7) jest wzbogacony w tkankach nerwowych [Hansen et al., 2011] i jest jednym spośród najwyższej ekspresjowanych niekodujących transkryptów w mózgu. Posiada on również bardzo unikalną cechę – w swojej sekwencji posiada zwielokrotnione i zakonserwowane ewolucyjnie powtórzenia, które odpowiadają miejscu wiązania miR-7 w obrębie jego sekwencji *seed* (nukleotydy w pozycjach 2-7 na końcu 5' miRNA, które są odpowiedzialne za wiązanie docelowego RNA). Ponadto, w sekwencji ludzkiego CDR1as występuje pojedyncze miejsce wiązania dla miR-671-5p. Miejsce wiązania miR-671 w obrębie CDR1as posiada odmienną charakterystykę w porównaniu do miR-7, tzn. przewidywane miejsce wiązania jest prawie w pełni komplementarne do sekwencji miR-671 i wykracza poza sekwencję *seed*. Zespół Jorgena Kjems z Uniwersytetu w Aarhus (Dania) wykazał w 2011 roku, że taka specyfika wiązania miR-671 do CDR1as powoduje przecięcie kolistego transkryptu do wersji liniowej poprzez ukierunkowane wiązanie Ago2 i aktywację jego aktywności katalitycznej tzw. *slicingowej* (tj. inicjującej hydrolizę/przecięcie RNA). Zarówno miR-671, jak i miR-7 ulegają ekspresji w mózgu. Ponadto, były opublikowane raporty na temat miR-7 w rozwoju mózgu. W tym, była wiedza w kwestii docelowych mRNA regulowanych przez miR-7 w mózgu w trakcie rozwoju kory mózgowej w fazie płodowej oraz w neuronach dopaminergicznych (badania z myszy, Pollock et al., 2014; de Chevigny et al., 2012). Taka charakterystyka zmotywowała mnie do postawienia **głównej hipotezy badawczej: Cdr1as może pełnić funkcje regulatorowe dla miR-7 i tym samym dla mRNA regulowanych przez miR-7, co wpłynie na regulację ekspresji genów i będzie miało przełożenie na fizjologię komórek w mózgu ssaków.**

W celu walidacji wyżej wymienionej hipotezy badawczej zaplanowałam oraz podjęłam szereg prac, które można zgrupować w trzy główne wątki badawcze: (1) analiza wiązania miR-7 do *Cdr1as in vivo* w mózgu, (2) charakterystyka ekspresji *Cdr1as* w różnych tkankach, różnych rejonach oraz typach komórek w mózgu, (3) analiza utraty funkcji *Cdr1as* (ang. *loss-of-function*). Modelem badawczym były myszy oraz komórki pierwotne (neurony korowe) wyprowadzone z myszy. Wyniki te są opisane w publikacji **P2**. Ponadto, jako wynik tych badań, opublikowaliśmy

protokół wykrywania pojedynczych cząsteczek i ilościowego oznaczania circRNA *Cdr1as* w komórkach poprzez zastosowanie hybrydyzacji fluorescencyjnej pojedynczych cząsteczek RNA *in situ* (smRNA FISH, ang. *single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization*) i mikroskopii fluorescencyjnej (publikacja **P3**). Każdy z tych trzech wątków badań omówię osobno, podając swoją motywację i/lub hipotezę cząstkową oraz przesłanki prowadzące do tych hipotez.

(1) Analiza wiązania miR-7 i miR-671 do *Cdr1as in vivo* w mózgu – **pierwsza hipoteza cząstkowa**: wiązanie miR-7 i miR-671 do *Cdr1as* RNA *in vivo* determinuje funkcje regulatorowe tego długiego, kolistego i niekodującego transkryptu.

Przesłanka: ludzki *CDR1as* zawiera ponad 70 zakonserwowanych ewolucyjnie, potencjalnych miejsc wiązania dla sekwencji *seed* miR-7 oraz jedno silnie komplementarne potencjalne miejsce wiązania dla miR-671; oba mikroRNA oraz circRNA ulegają ekspresji w tkance mózgowej. Parowanie miR-671 do *Cdr1as* zostało potwierdzone w eksperymentach *in vitro* [Hansen et al., 2011]. Przeprowadzone przeze mnie badania podjęte w celu sprawdzenia tej hipotezy obejmowały wykorzystanie już istniejących danych wysokoprzepustowych uzyskanych metodą HITS-CLIP, tj. wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA wyizolowanego metodą immunoprecypitacji po uprzednim sieciowaniu oddziaływań RNA-białko (ang. *high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation*). W szczególności, korzystając z surowych (i świeżo opublikowanych) wyników HITS-CLIP białka Ago2 w mózgu myszy [Moore et al., 2105] oraz podobnego zestawu danych uzyskanych z mózgu człowieka [Boudreau et al., 2014] wraz z doktorem Andrei Filipchik (wówczas doktorantem) przeprowadziliśmy detekcję oraz analizę tzw. odczytów chimericznych. Andrei Filipchik, bioinformatyk, był jednym z pionierów analiz danych AGO CLIP w *C. elegans* pod kątem opracowywania nowych rozwiązań do identyfikacji tego typu odczytów chimericznych, które umożliwiają jednoznaczne wykrycie konkretnych miejsc wiązania miRNA do docelowych transkryptów i jednocześnie identyfikację poszczególnych miRNA związanych do poszczególnych transkryptów [Grosswendt, Filipchik et al., 2014]. Wyniki uzyskane z mózgow człowieka i myszy, jednoznacznie poparły hipotezę, że *Cdr1as* wiąże zarówno miR-7, jak i miR-671 *in vivo* w mózgu ssaków. Pokazaliśmy, że spośród wszystkich docelowych transkryptów wiążących miR-7 wykrytych w danych Ago2 HITS-CLIP z mózgu myszy, kolisty RNA *Cdr1as* jest na czele listy rankingowej, tzn. wiąże największą ilość miR-7 w różnych miejscach parujących do regionu *seed* miR-7 w obrębie transkryptu. Łączna liczba odczytów chimer *Cdr1as*-miR-7 wyniosła 127 i potwierdziła oddziaływanie z miR-7 w kilkudziesięciu różnych pozycjach w obrębie *Cdr1as* (szczegółowe dane przedstawiono w Fig. 1A oraz w tabeli uzupełniającej S1 do publikacji **P2**). Znaleźliśmy również jedno dominujące miejsce wiązania miR-671 zajmowane przez miR-671, jak wskazywały na to liczne (>50) odczyty chimeryczne z danych Ago2 HITS-CLIP (>50).

(2) Charakterystyka ekspresji *Cdr1as* w różnych tkankach, różnych rejonach oraz typach komórek w mózgu.

Aby przybliżyć funkcje molekularne *Cdr1as*, kluczowym było dla mnie zrozumienie przestrzennego profilu ekspresji i swoistości komórkowej tego niekodującego transkryptu w mózgu. W tym celu wykonałam serie eksperymentów qRT-PCR i pomiary ekspresji circRNA

Cdr1as w różnych tkankach pobranych z myszy oraz bardziej szczegółowo w mózgu. Następnie, wykonane zostały szeroko zakrojone analizy detekcji *Cdr1as* w skrawkach mózgu myszy szczepu dzikiego przy pomocy *in situ* RNA hybrydyzacji z jednoczesnym barwieniem markerów białkowych różnych typów i podtypów komórek nerwowych i glejowych.

Locus Cdr1as znajduje się na chromosomie X. We wstępnych etapach pracy ustaliłam, że nie ma różnic w poziomie ekspresji *Cdr1as* pomiędzy osobnikami męskimi i żeńskimi w mózgu myszy (myszy szczepu dzikiego, C57BL/6N), ani w całym mózgu, ani w poszczególnych rejonach, takich jak przodomózgowie (bez opuszki węchowej), opuszka węchowa, mózdzek, pień mózgu (*Supplementary Figure 7* w publikacji **P2**). Było to o tyle ważne, o ile w dalszych etapach pracy mogłam skupić się na analizach jednej płci (w moje pracy – osobnikach męskich), bez duplikowania wszystkich wyników dla obu płci. Sprawdziłam również inne organy układu nerwowego (rdzeń kręgowy), neuroendokrynnego (przysadka mózgowa) oraz inne organy pobrane z myszy szczepu dzikiego (płuco, mięsień szkieletowy, mięsień sercowy, śledziona) pod kątem ekspresji *Cdr1as*. Podobne badania wykonałam w celu oceny poziomów dojrzałego miR-7a-5p, jego prekursora (pre-miR-7a-1) oraz dojrzałego miR-671-5p. Łącznie wyniki te wykazały, że wszystkie badane RNA były obecne we wszystkich tkankach nerwowych, przy czym *Cdr1as* miało ogromne wzbogacenie w mózgu bez wykrywalnej ekspresji lub ekspresji zbliżonej do tła w innych tkankach/narządach. W mózgu *Cdr1as* ma najwyższy poziom w mózdzku (przewyższając poziom ekspresji niektórych genów typu *housekeeping*, np. mRNA *Gapdh*), około 4x wyższy w mózdzku w porównaniu z korą mózgową, hipokampem i opuszką węchową (*Supplementary Fig. 7* w publikacji **P2**).

Eksperymenty *in situ* RNA hybrydyzacji przy użyciu sondy specyficznej dla *Cdr1as*, a konkretnie, zaprojektowanej do jego sekwencji *backsplicingowej*, potwierdziły obserwacje poczynione wcześniej przy pomocy pomiarów qRT-PCR. Ponadto, poprzez nałożenie sygnałów circRNA *Cdr1as* z markerami białkowymi neuronów i komórek glejowych, byliśmy w stanie stwierdzić, że *Cdr1as* występuje głównie w neuronach pobudzających, w mniejszym stopniu w neuronach hamujących i jest nieobecny w oligodendrocytach i astrocytach. Barwienia pojedynczych cząsteczek *Cdr1as* z zastosowaniem smRNA FISH (ang. *single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization*) w pierwotnych neuronach korowych pokazały, że *Cdr1as* lokalizuje się w dużych ilościach w perykarionach neuronów pobudzających oraz jest obecny w neurytach i aksonach. Było to dla nas cenną informacją, wskazującą na możliwą rolę *Cdr1as* w różnych lokalizacjach subkomórkowych.

Eksperymenty z wizualizacją circRNA *Cdr1as* z rozdzielczością pojedynczej cząsteczki były prowadzone z użyciem sond *Stellaris* (smRNA FISH). Zainspirowały nas one opublikowania protokołu, który zoptymalizowaliśmy, którego używaliśmy, i o który byliśmy wielokrotnie pytani i proszeni o pomoc w jego wdrożeniu (publikacja **P3**, opublikowana jako Rozdział 7 w *Methods in Molecular Biology*, Springer). W tym artykule przedstawiliśmy wyzwania techniczne związane z obrazowaniem RNA przy rozdzielczości pojedynczej cząsteczki, rozwiązania umożliwiające ich pokonanie i przedstawiliśmy procedurę krok po kroku, począwszy od projektowania sond, a

skończywszy na zaliczeniach punktowego sygnału RNA. W pracy przedstawiliśmy również szczegółowy opis sposobu hodowli komórek i ich utrwalania przed smRNA FISH. Przedstawiliśmy liczne wskazówki techniczne (17 notatek technicznych) i polecaliśmy oprogramowania, które były dla nas bardzo przydatne, np. do zliczania punktowych sygnałów RNA. Protokół jest poparty naszymi danymi i obrazami uzyskanymi z wizualizacji i kwantyfikacji RNA w komórkach HEK 293, HeLa i neuronach różnicowanych z komórek P19.

Warto wspomnieć, że w publikacji autorstwa Cledi Cerda-Jara et al. (publikacja P7) zastosowaliśmy ten protokół do wykrywania i kwantyfikacji *Cdr1as* i lncRNA *Cyrano* w większej partii pierwotnych neuronów korowych. Zliczenia te pokazały, że *Cdr1as* jest wykrywany średnio w liczbie ok. 300 kopii/komórkę, choć zakres był bardzo szeroki, od kilkudziesięciu do 800 kopii cząsteczek na komórkę tj. jeden neuron pobudzający. Około 53% tych cząsteczek można znaleźć w perykarionie komórek nerwowych, podczas gdy pozostałe cząsteczki (ok. 47%) znajdują się w neurytach i aksonach. Ponadto, wykonaliśmy ko-lokalizację sygnału circRNA *Cdr1as* z markerami białek pre- i postsynaptycznych oraz pomiary odległości pomiędzy punktowymi sygnałami białek, a punktowymi sygnałami z RNA.

Inną częścią charakterystyki *locus Cdr1as* było badanie domniemanej transkrypcji ***Cdr1* mRNA**, które jest adnotowane na nici sensownego DNA i częściowo nakłada się na *Cdr1as*. Wykorzystaliśmy wiele technik eksperymentalnych, a także przeszukaliśmy zestawy danych sekwencjonowania RNA specyficzne dla nici i zestawy danych proteomicznych, ale nie wykryliśmy żadnych dowodów na transkrypcję *Cdr1* mRNA w mózгах myszy, określonych obszarach mózgu myszy lub jakiegokolwiek innej analizowanej tkance myszy lub człowieka.

(3) Analiza utraty funkcji *Cdr1as* (ang. *loss-of-function*).

Równolegle do eksperymentów i analiz przedstawionych powyżej w punktach 1-2, starałam się zaprojektować i przeprowadzić eksperyment CRISPR-Cas9 w mysiej linii komórkowej P19, aby zbadać, czy mogę użyć ten systemu do ukierunkowanej delecji całego *locus Cdr1as* z genomu myszy. Moje założenie było takie, że jeśli będę mogła wydajnie otrzymać linie komórkowe typu *Cdr1as knockout*, to będę mogła zastosować te same konstrukty do wygenerowania genetycznie zmodyfikowanych myszy z delecją *locus Cdr1as* i **badać utratę funkcji *Cdr1as* na poziomie organizmu.**

Dzięki eksperymentom CRISPR-Cas9 w komórkach P19 i użyciu dwóch różnych *guide* RNA zaprojektowanych do kierowania Cas9 blisko sekwencji PAM w miejscach splicingu *Cdr1as*, dowiedziałam się, że mój projekt eksperymentu *knockout* był udany. Oprócz wielu linii klonalnych P19 z mniejszymi lub większymi mutacjami typu *indel* w miejscach splicingu *Cdr1as*, uzyskałam klony z całkowitą delecją eksonu *Cdr1as*. Warto nadmienić, że moja praca z liniami P19 i protokołami różnicowania tych komórek do neuronów stanowiła podstawę do wdrożenia protokołu smFISH do wykrywania i kwantyfikacji cząsteczek *Cdr1as* w neuronach (publikacja P3).

Myszy z delecją *Cdr1as* uzyskaliśmy poprzez mikroiniekcję dojądrową mRNA Cas9 i tych samych dwóch *guide* RNA specyficznych dla *Cdr1as*, które były przetestowane wcześniej w liniach P19

do zygot i zapłodnienie *in vitro* stymulowanych hormonalnie samic myszy C7BL6/N. W rezultacie uzyskałam 5 zwierząt (tzw. founderów, „założycieli”) z mutacjami w obrębie lub w pobliżu miejsc splicingu *Cdr1as*, a jedno z nich miało delecję całego eksonu *Cdr1as* (założyciel M2). Zaprojektowałam metodologię testowania mutacji i genotypowania myszy (opublikowaną w **P2**), z której korzystam do tej pory. Korzystają z niej również inni badacze, z którymi dzieliłem linię myszy z delecją *Cdr1as* na przestrzeni ostatnich lat. Rozszerzyłam kolonię zmutowanych myszy (nazywanych dalej ***Cdr1as* KO**, ang. *Cdr1as knockout*) poprzez skrzyżowanie założyciela M2 (wygenerowanego na czystym tle genetycznym C57BL6/N) z samicami typu dzikiego na tym samym tle genetycznym, co jednocześnie dało mi możliwość zbadania heterozygotycznych samic *Cdr1as* +/- (samce są hemizygotami, *Cdr1as* -/Y). Zarówno heterozygoty, jak i myszy *Cdr1as* KO wykazywały normalny rozwój i wyglądały na zdrowe, bez żadnych poważnych różnic w anatomii mózgu w porównaniu do miotów myszy typu dzikiego. Poziom ekspresji *Cdr1as* w heterozygotach (*Cdr1as* +/-) był zredukowany ok. 50% w porównaniu do poziomu *Cdr1as* w mózgu myszy WT.

W pierwszym rzędzie przeprowadziłam **molekularną analizę fenotypową** (jak ją nazywam), która obejmowała analizę ekstraktów RNA z mózgow myszy *Cdr1as* KO z zastosowaniem sekwencjonowania całkowitego RNA pozbawionego rRNA, sekwencjonowania bibliotek cDNA opartych na selekcji poliadenylowanych transkryptów oraz sekwencjonowanie małych RNA, które przyniosły ciekawe i niespodziewane wyniki. Porównując poziomy ekspresji miRNA z naszych danych sekwencjonowania u zwierząt WT i *Cdr1as* KO, miR-7 był wyraźnie zmniejszony (Fig. 2 i statystyki w Tabeli S2, publikacja **P2**) we wszystkich analizowanych rejonach mózgu (hipokamp, mózdzek, kora mózgowa, opuszka węchowa). Dokładniej, zarówno miR-7a-5p, jak i miR-7b-5p, które mają takie same sekwencje *seed*, ale nieznacznie różnice w sekwencji dojrzałego miRNA (pozycja 10), były obniżone. Wyniki sekwencjonowania zostały potwierdzone przy pomocy innych metod analitycznych (Northern blot, TaqMan assay, qRT-PCR, Nanostring), które również dodatkowo pozwoliły nam stwierdzić, **że obniżenie ilości dojrzałego miR-7 w mózgu myszy *Cdr1as* KO nie wynika z zmniejszonej transkrypcji tych miRNA, lecz odbywa się post-transkrypcyjnie** na poziomie dojrzałych cząsteczek miRNA. W przeciwieństwie do obniżonej ekspresji miR-7, **ekspresja miR-671-5p u zwierząt *Cdr1as* KO była zwiększona** w mózdzku, korze mózgowej i opuszce węchowej. Kilkaset innych miRNA zidentyfikowanych w mózgu myszy nie ulegało zmianom, z wyjątkiem jednego obszaru mózgu (kora mózgowa), gdzie odnotowaliśmy obniżenie poziomu ekspresji kilku miRNA pochodzących z dwóch rodzin i trzech klastrów miRNA, *miR-200c/141*, *miR-200a/200b/429* i *miR-182/183/96*.

RNA-seq pokazał, że w ślad za obniżonym poziomem miR-7 w mózgu myszy *Cdr1as* KO, idzie zwiększony poziom cząsteczek mRNA będących celami regulowanymi przez miR-7. Dodatkowo, ustaliliśmy, że w badanych obszarach mózgu myszy *Cdr1as* KO, oprócz zmian miR-7 i miR-671, dochodzi do deregulacji transkryptów kodowanych przez grupę **genów odpowiedzi natychmiastowej (IEG, ang. immediate early genes)** i co ciekawe, były to różne IEG w różnych strukturach mózgu. Te wyniki zostały potwierdzone innymi metodami analitycznymi, nie tylko na poziomie mRNA genów IEG, lecz również na poziomie produktów białkowych tych genów (np.

dla cFOS i EGR1). Przy okazji, niektóre z tych genów, w tym wymienione *Fos* i *Egr1*, są również targetami miR-7.

Wiedząc, że poziomi miR-7 efektywnie spada w nieobecności *Cdr1as*, doszliśmy do wniosku, że *Cdr1as* może pełnić funkcję stabilizującą miR-7 poprzez jego bezpośrednie wiązanie. Podejrzewaliśmy również, że w nieobecności *Cdr1as* poziom dojrzałego miR-7 spada, ponieważ jest on destabilizowany przez lncRNA *Cyrano*. *Cyrano* jest drugim po *Cdr1as* najsilniej wiązany RNA w mózgu, jak wykazały nasze wcześniejsze pomiary odczytów chimer z danych Ago2 HITS CLIP. *Cyrano* lncRNA ma wysoce komplementarne miejsce wiązania dla miR-7 i to oddziaływanie, jak spekulowaliśmy, może inicjować rozpad dojrzałego miR-7 poprzez jego wydłużanie (ang. *tailing*) i przycinanie (ang. *trimming*) [Ulitsky et al., 2013; Ameres et al., 2010]. Niedługo po opublikowaniu przez nas wyników opisanych powyżej (P2), powyższe spekulacje na temat *Cyrano* zostały potwierdzone przez zespół Davida Bartela. W publikacji poświęconej analizie funkcji lncRNA *Cyrano* pokazali oni, że *Cyrano* jest zaangażowany w destabilizowanie miR-7 w procesie zwanym degradacją mikroRNA za pośrednictwem mRNA (ang. *target-mediated microRNA degradation*), TDMD [Kleaveland i in., 2018].

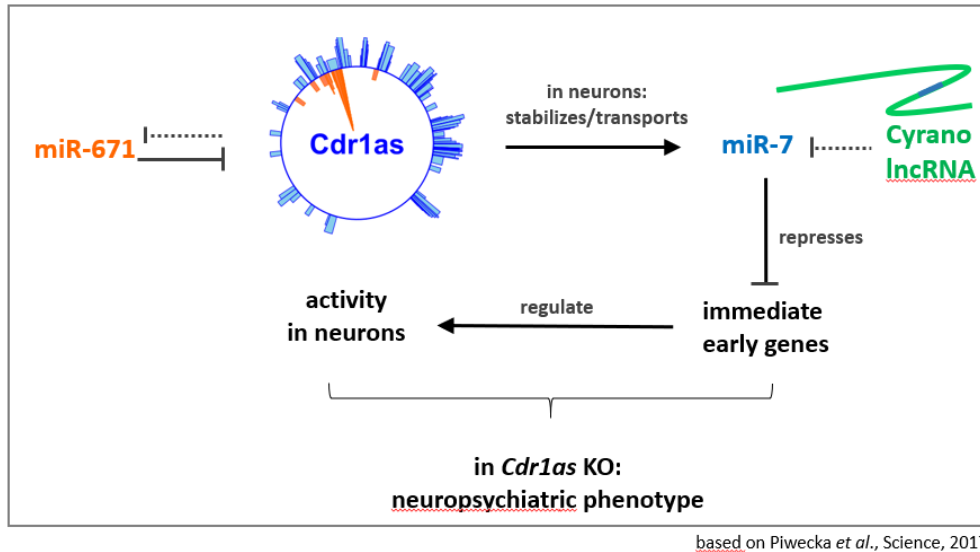
Znaczenie oddziaływania mikroRNA miR-7 z niekodującym transkryptem Cdr1as w mózgu ssaków

W moich badaniach nad oddziaływaniami *Cdr1as*-miR-7 w mózgu, byłam zainteresowana odkryciem, czy te zaburzenia molekularne, które zaobserwowaliśmy w mózgu, ale nie w żadnej innej tkance zmutowanej myszy *Cdr1as* KO, są w jakiś sposób odzwierciedlone w ogólnej fizjologii i czy wpływają na zachowanie tych mutantów. W tym celu zaprojektowałam serię eksperymentów, aby sprawdzić, czy brak *Cdr1as* i wynikające z niego zaburzenia w profilu transkryptomów są ważne dla zdrowia i ogólnego dobrostanu osobników. Po pierwsze, we współpracy z doskonałymi ekspertami w dziedzinie elektrofizjologii (laboratorium Christiana Rosenmunda, Charite) przygotowaliśmy tak zwane autaptyczne kultury neuronalne z hipokampa, które były preparowane z mózgów zmutowanych myszy *Cdr1as* KO i odpowiadających im kontroli z tych samych mitów oraz wykonaliśmy pomiary określające podstawowe właściwości elektrofizjologiczne tych komórek. Spośród wielu zmierzonych parametrów, zauważyliśmy, że jeden z nich jest wyjątkowo silnie zaburzony. Ponad dwukrotny wzrost częstotliwości mEPSC (miniaturowych pobudzających prądów postsynaptycznych) sugerował, że spontaniczne uwalnianie pęcherzyków synaptycznych jest silnie zwiększone w neuronach KO. Amplituda mEPSC pozostała niezmienną. Ta obserwacja jednoznacznie **potwierdziła naszą hipotezę, że *Cdr1as* jest funkcjonalnym regulacyjnym RNA, który poprzez złożoną sieć interakcji z miRNA i pośrednio ich celami mRNA pełni mierzalne funkcje w neuronach.**

Po drugie, pod okiem doświadczonej behawiorystki, Dr Susanne Wolf, wykonana została bateria testów behawioralnych. Wykonaliśmy m.in. test socjalności, test rozpoznawania nowego obiektu, test otwartego pola, test podniesionego labiryntu krzyżowego, labirynt wodny Morrisa, test preferencji cukru, test mierzący hamowanie przedsygnalowe, itp., mierząc wiele parametrów związanych z pamięcią, motywacją, anhedonią, poziomem lęku, czy zachowaniem społecznym.

Wiele z tych parametrów nie odbiegało od normy, lub było delikatnie zaburzone, z wyjątkiem hamowania przedsygnalowego (ang. *pre-pulse inhibition*, PPI). Zarówno samce, jak i samice z mutacją *Cdr1as* KO, miały znacznie (i statystycznie istotnie) wzmocnione reakcje w teście PPI. Efekt dysinhibicji w teście PPI jest często określany, jako **deficyt PPI**. Doprowadziło nas to kolejnej, ważnej konkluzji, że zwierzęta z mutacją *Cdr1as* KO wykazują fenotyp behawioralny związany z zaburzeniami psychicznymi. PPI jest miarą tzw. bramkowania sensomotorycznego (ang. *sensorimotor gating*). Jest to właściwość mózgu pozwalająca na odfiltrowywanie niepotrzebnych informacji z mózgu, tak by organizm nie reagował nadmiernie na wszystkie bodźce. Funkcja ta jest zaburzona np. w mózgach osób chorujących na schizofrenię. Jest również zaburzona w mózgu myszy pozbawionej *Cdr1as*.

Podsumowując moją pracę nad *Cdr1as* w ramach przedstawionych po oceny publikacji: wykonane przez mnie i współautorów eksperymenty i otrzymane wyniki przyniosły wiele nowych, interesujących i przełomowych odkryć na temat *Cdr1as*. Jest to pierwsza funkcjonalnie opisana cząsteczka kolistego RNA. Funkcja ta okazuje się istotna dla neuronów pobudzających na poziomie molekularnym i fizjologicznym, oraz w konsekwencji jest ważna dla prawidłowego funkcjonowania mózgu, jak wykazały badania behawioralne. ***Cdr1as-miR7- miR-671* i lncRNA *Cyrano*** stanowią unikalną **sieć regulatorowych niekodujących RNA**, która wpływa na życie molekularne neuronów. Co ważne, mimo, że praca P2 jest bardzo obszerna (pięć rycin głównych, 18 rycin w suplemencie, 7 tabel), nie wyjaśniła ona w pełni kompleksowych oddziaływań pomiędzy wyżej wspomnianymi regulatorowymi RNA. W szczególności, powiązania pomiędzy bezpośrednim wpływem tych cząsteczek na fizjologię neuronów i powiązania z fenotypem behawioralnym na pewno są dużo bardziej złożone i pozostają ciągle obiektem badań. Zdobyty przez mnie i współautorów prac **P2** i **P3** wgląd w te procesy można posumować zaproponowanym modelem (Ryc. 2). Model ten ciągle ewoluuje wraz z napływem nowej wiedzy. Ostatnia wersja modelu znajduje się w publikacji **P7**. Inną niewidomą jest, czy sieć współzależnych w neuronach pobudzających RNA (*Cdr1as-miR7- miR-671* i lncRNA *Cyrano*) funkcjonuje w tożsamy sposób w innych typach komórek, w których są obecne, np. komórkach przysadki mózgowej.



Rycina 2.

Model oddziaływań *Cdr1as* z miR-7 i miR-671 oraz lncRNA *Cyrano* oraz ich wpływ na aktywność neuronów, jak dyskutowano w pracy P2.

Jak profilowanie RNA w pojedynczych komórkach poszerza naszą wiedzę na temat mózgu i chorób neurologicznych?

Od kilku lat żyjemy w erze biologii systemów i szeroko zakrojonych badań *-omicznych*. Oprócz transkryptomiki, genomiki i proteomiki rozszerzają się one m.in. o wysokoprzepustowe badania dostępności chromatyiny w całym genomie, znaczników epigenetycznych (epigenomika) oraz endogennych metabolitów (matbolomika). Wszystkie te podejścia analityczne są obecnie stosowane do (1) kompleksowej i systematycznej identyfikacji oraz analizy profilów genetycznych lub innych profilów molekularnych w organizmie człowieka i innych organizmach żywych oraz do (2) zgłębienia procesów patologicznych leżących u podstaw nieuleczalnych chorób człowieka. Nowe technologie transkryptomiczne, takie jak **transkryptomika pojedynczych komórek** i **transkryptomika przestrzenna** (ang. *spatial transcriptomics*, **ST**), dają kompleksowy wgląd w programy ekspresji genów i różnorodność biologiczną RNA pomiędzy różnymi populacjami komórek, a czasem nawet wewnątrz pojedynczych populacji komórek w zależności od ich umiejscowienia i komunikacji z innymi komórkami.

Moja fascynacja heterogennością transkryptomiczną komórek mózgu sięga 2015-2016 roku, kiedy to opublikowane zostały pierwsze prace dotyczące **sekwencjonowania RNA z pojedynczych komórek** (ang. *single-cell RNA sequencing*, **scRNA-seq**) z kory czuciowej i hipokampa [Zeisel et al., 2015] oraz z kory wzrokowej mózgu myszy [Tasic et al., 2016]. Od tamtej pory nieustannie śledziłam postęp w tego typu badaniach oraz rozwoju technologii sekwencjonowania transkryptomów pojedynczych komórek, również w odniesieniu do wyników własnych. Moją wiedzę i przemyślenia nad nowoczesnymi technikami transkryptomicznymi w odniesieniu do

postępów w zrozumieniu chorób neurologicznych i projektowaniu nowych terapii zawarłam w pracy przeglądowej **P5**, pt. „*Single-cell and spatial transcriptomics: deciphering brain complexity in health and disease*” opublikowanej w 2023 w *Nature Reviews Neurology*.

W pracy **P5** omówiliśmy, w jaki sposób transkryptomika pojedynczych komórek i ST ewoluowały od swoich początków (ok 2009-2010 roku) do roku 2023. W szczególności, próbowaliśmy podsumować wpływ tych badań na współczesne zrozumienie procesów molekularnych zachodzących w komórkach mózgu i patomechanizmów leżących u podstaw zaburzeń neurologicznych. Trzon pracy przeglądowej stanowi omówienie ważnych „kamieni milowych”, czyli pionierskich publikacji, których autorzy bazując na wynikach z scRNA-seq i/lub ST do badania mysich lub ludzkich mózgow oraz dedykowanych metod obliczeniowych, próbowali i bardzo często dostarczali nowych danych na temat procesów molekularnych w różnych typach i podtypach komórek nerwowych i/lub glejowych. Skupiliśmy się na trzech obszarach, w których naszym zdaniem te nowe technologie dostarczyły szczególnie przydatnych spostrzeżeń: (1) selektywnej podatności neuronów na dysfunkcje związane z procesami chorobotwórczymi, (2) dysfunkcji neuroimmunologicznej i (3) badaniach skupiających się na poznaniu mechanizmów odpowiedzi na leczenie w sposób swoisty dla typu komórki. W odniesieniu do tematyki selektywnej podatności neuronów na procesy patologiczne, technologie scRNAseq i snRNAs (sekwencjonowanie pojedynczych jader komórkowych) dają pełne optymizmu nadzieje na zrozumienie tego, które komórki nerwowe są bardziej podatne na procesy chorobotwórcze i dlaczego. Dotyczy to zarówno chorób neurodegeneracyjnych (np. choroba Alzheimera, choroba Parkinsona), ale również chorób psychicznych (schizofrenia, choroba dwubiegunowa), czy zaburzeń neurorozwojowych (np. spektrum autyzmu). W części odnoszącej się do dysfunkcji neuroimmunologicznej, skupiliśmy się na nowych doniesieniach o udziale komórek glejowych, zwłaszcza mikrogleju i astrocytów w chorobach neurodegeneracyjnych (np. w stwardnieniu rozsianym, chorobie Alzheimera, stwardnieniu zanikowym bocznym), w guzach mózgu oraz z powstawaniem symptomów neurologicznych przy zakażeniu wirusem SARS-Cov2 (tzw. neuro-COVID). W sekcji zatytułowanej „Typy komórek wrażliwe na leki” (ang. *Drug-sensitive cell types*) skupiliśmy się na badaniach dążących do optymalizacji protokołów monitorowania reakcji na leki i metod leczenia w oparciu o nowe technologie sekwencjonowania RNA w pojedynczych komórkach. Takie podejścia przesiewowe testujące wrażliwość na leki swoiście dla typu komórek, których celem jest opracowanie spersonalizowanych terapii są testowane np. w glejaku. Po szczegóły odsyłam do publikacji **P5**.

W publikacji **P5** dokonaliśmy przeglądu >200 oryginalnych prac badawczych, w których analizowano w/w tematy lub inne, związane *stricto* z metodyką i analizą bioinformatyczną danych uzyskiwanych dzięki tym nowoczesnym technologiom sekwencjonowania. Ewolucja tych metod, zarówno pod względem eksperymentalnym, jak i obliczeniowym, odbywała się bowiem w niesamowitym tempie na przestrzeni kilku ostatnich lat. Spowodowało to, że technologie te są coraz bardziej dostępne, coraz częściej wykorzystywane, coraz doskonalsze, oraz dające wgląd w coraz bardziej kompleksowy sposób w procesy molekularne w pojedynczych komórkach lub pojedynczych jadrach komórkowych. Aby ułatwić rozpoznanie tematu potencjalnie nowym

użytkownikom tych technologii, zamieściliśmy w pracy spis najczęściej używanych narzędzi obliczeniowych do analizy sekwencjonowania pojedynczych komórek, tabelę z porównaniem różnych metod sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek oraz (w suplemencie) skrótowy opis uzyskania żywych komórek z mózgu, tak by były one dobrej jakości do badań RNA. Ponadto, w obszernej części pracy **P5** omówiliśmy aktualne ograniczenia tych metod i wskazaliśmy przyszłe kierunki technologii sekwencjonowania RNA w pojedynczych komórkach i w przestrzeni w odniesieniu do OUN i chorób neurologicznych.

D. NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA POZNAWCZE ZAPREZENTOWANYCH BADAŃ

1. Zsekwencjonowanie miRNA z różnych stadiów złośliwości (III i IV) glejaków złośliwych.
2. Zestawienie wiedzy na temat de-regulowanych miRNA w GBM wyłonionych z badań własnych oraz innych studiów (meta-analiza).
3. Określenie grupy miRNA de-regulowanej w procesie progresji glejaka od stadium III do stadium IV złośliwości.
4. Określenie roli miR-218 w modulacji ekspresji genów kodujących białka ECM w glejaku.
5. Określenie roli miR-218 i jego docelowych mRNA (i ich produktów białkowych) w regulacji właściwości mechanobiologicznych komórek glejaka.
6. Opisanie swoistości komórkowej circRNA *Cdr1as* w mózgu myszy.
7. Identyfikacja wiązania miR-7 do *Cdr1as in vivo* w mózgu myszy i człowieka.
8. Opracowanie strategii delecji *locus Cdr1as* z genomu myszy i otrzymanie modelu zmutowanej myszy pozbawionej *locus Cdr1as*.
9. Określenie zmian molekularnych w różnych tkankach myszy pozbawionej *locus Cdr1as*, w tym szczególnie w mózgu myszy i jego poszczególnych rejonach.
10. Określenie znaczenia utraty funkcji *Cdr1as* w odniesieniu do fizjologii neuronów i zachowania zwierząt.
11. Opisanie unikalnej sieci niekodujących RNA funkcjonujących w neuronach pobudzających mózgu ssaków: circRNA *Cdr1as* – miR-7 – miR-671 – lncRNA *Cyrano*.
12. Opracowanie i walidacja protokołu dokładnej identyfikacji i kwantyfikacji circRNA *Cdr1as* z rozdzielczością pojedynczej cząsteczki w komórkach przy użyciu smRNA FISH i mikroskopii.
13. Podsumowanie i omówienie technologii sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek i transkryptomiki przestrzennej oraz ich wkładu w pionierskich latach rozwoju tych technologii do rozwoju neurobiologii i badań nad chorobami neurologicznymi.

E. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Ludzki mózg jest najbardziej złożonym systemem w przyrodzie, zawierającym miliardy komórek, które tworzą sieci kontrolujące funkcje fizyczne i poznawcze w naszych organizmach. Neurony należą do najbardziej skompartmentalizowanych i interaktywnych spośród wszystkich typów komórek. Od kilku lat neurobiolodzy coraz intensywniej zwracają uwagę, że komórki glejowe odgrywają istotną rolę w homeostazie ośrodkowego układu nerwowego oraz patologiach neurologicznych, czego upatruje się zwłaszcza w ich zdolności do nabywania szerokiego zakresu stanów aktywacji. Na poziomie molekularnym, zarówno neurony, jak i komórki glejowe, charakteryzują się **wielopoziomową regulacją programów ekspresji genów**. Takie wielopoziomowe procesy regulacyjne zapewniają wyspecjalizowane funkcje tym komórkom, np. poprzez utrzymywanie i modyfikowanie proteomu w aksonach i obszarach synaptycznych dendrytów możliwe jest lokalne przetwarzanie informacji w odległych od jądra komórkowego obszarach komórkowych i szybkie reagowanie na bodźce. Znaczenie i wpływ **regulatorowych niekodujących RNA** na programy ekspresji genów w komórkach nerwowych i gleju to nowy obszar badawczy, który niezwykle intensywnie rozwija się w ostatnich latach. Prawie co tydzień nowe odkrycia ujawniają regulacyjną rolę, jaką ncRNA odgrywają w wielu procesach biologicznych. Uogólniając, badania te coraz wyraźniej pokazują, że zarówno w organizmach modelowych, jak i u ludzi, złożoność nie jest funkcją liczby genów kodujących białka, ale wynika z możliwości wykorzystania kombinacji programów genetycznych i kontrolowania ich regulacji przestrzennej i czasowej podczas rozwoju, starzenia się i w chorobie przez regulatorowe RNA.

W swojej biografii pionier neuronauki, *Santiago Ramón y Cajal*, napisał: "*Powszechnym faktem jest, że odkrycia naukowe są funkcją stosowanych metod*". W mojej pracy badawczej staram się nieustannie rozszerzać zakres swoich technik badawczych, śledzić najnowsze doniesienia naukowe i projektować swoje eksperymenty tak, by móc efektywnie uczestniczyć w tworzeniu współczesnej biologii molekularnej, w szczególności w odniesieniu do **biologii RNA i biologii komórek nerwowych oraz glejowych**.

Moje **osiągnięcie naukowe** przedstawione w niniejszej rozprawie jest cyklem 5 publikacji naukowych. Jest to dorobek, który pozwolił mi na stworzenie interdyscyplinarnego warsztatu badawczego obejmującego metodykę z zakresu biologii molekularnej, biologii komórki oraz biologii systemów, w tym zaawansowanych technologii transkryptomicznych, które są przede mną i mój zespół wykorzystywane do zgłębiania tajników komórek nerwowych i glejowych. Ponadto, prace z cyklu przedstawionego do oceny zyskały duże uznanie w środowisku naukowym, o czym świadczy liczba cytowań tych publikacji (sumarycznie >1000). Bez wątpienia, wyróżniającym się osiągnięciem jest pierwszo-autorska publikacja w prestiżowym czasopiśmie naukowym *Science*. Oprócz kilkuset dotychczasowych cytowań, była ona również szeroko komentowana w światowych mediach naukowych i pozanaukowych, w tym w serwisach informacyjnych np. w periodyku *The Scientist* (<https://www.the-scientist.com/first-in-vivo-function-found-for-animal-circular-rna-31102>), *GEN: Genetic Engineering and Biotechnology News* (<https://www.genengnews.com/news/loss-of-circular-rna-throws-brain-for-a-loop-2/>), w

portalu *Phys.org* (<https://phys.org/news/2017-08-circular-rna-linked-brain-function.html>), serwisie Technology Networks (<https://www.technologynetworks.com/tn/news/circular-rna-linked-to-brain-function-291126>), itp. Niektórzy zmienni naukowcy uważają tę pracę za przełomową w badaniach nad regulacyjnymi RNA w neuronach i stanowiącą znaczący postęp w dziedzinie – źródło - wypowiedzi prof. Julii Salzman (Stanford University) oraz prof. Sebastiana Kedenera (Brandeis University) umieszczone w komentarzu do publikacji w periodyku *The Scientist*. Komentarz do publikacji **P2** z *Science* ukazał się również w sekcji *Reserach Highlights* w czasopiśmie *Nature Reviews Neuroscience* [Yates, 2017].

Przedstawione do oceny cykl prac i ich wyniki mają też wpływ na obecną i przyszłą pracę naukową własną oraz innych zespołów badawczych. W Zakładzie Niekodujących RNA w ICHB PAN pod moim kierownictwem wykonywane są projekty badawcze zmierzające do rozpoznania funkcji wybranych kolistych RNA, które lokalizują do obszarów synaptycznych w neuronach. Badamy również oddziaływania circRNA-białko oraz tworzymy nowe protokoły do badania wybranych właściwości circRNA, tak by skutecznie odróżnić te cząsteczki od liniowych mRNA powstających z tych samych genów. Ponadto, jesteśmy żywo zainteresowani odkrywaniem **swoistości komórkowej circRNA oraz miRNA**, szczególnie w różnych typach i podtypach komórek występujących w mózgu, jego różnych obszarach i przysadce mózgowej. W naszym laboratorium prowadzimy również zaawansowane badania nad rolą *Cdr1as* i miR-7 w komórkach wydzielniczych przysadki mózgowej.

Praca nad miRNA w odniesieniu do guzów mózgu człowieka (zawarta w manuskryptach **P1, P4**), jest kontynuowana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej ICHB PAN pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Rolle, z którą pozostaję w kontakcie. W moim Zakładzie zapoczątkowaliśmy projekt (faza pilotażowa) zmierzający do poznania swoistości komórkowej wybranych miRNA i circRNA w glejaku wielopostaciowym (wstępne wyniki projektu zostały zawarte w pracy licencjackiej studentki Marii Gwit wykonanej pod moim kierownictwem).

Prace nad rolą oddziaływań *Cdr1as*-miR-7 w neuronach były kontynuowane przez dwa zespoły badawcze: jeden z MDC w Berlinie, drugi z University of Eastern Finland w Kuopio (Finlandia). Oba projekty prowadzone były we współpracy ze mną i do obu projektów wykorzystano myszy z mutacją *locus Cdr1as*. Prace podsumowujące wyniki tych projektów opublikowane zostały w bieżącym roku w prestiżowych czasopismach naukowych (publikacje **P7 i P8**) i były postawą do uzyskania tytułu doktora (PhD) przez pierwsze autorki tych badań. Oba projekty powadzone były niezależnie i skupiały się na różnych aspektach i celach. Niemniej jednak, w wersji końcowej wiele spośród uzyskanych wyników w obu projektach było komplementarnych, składając się na rozszerzenie naszego zrozumienia, jak funkcjonuje sieć niekodujących RNA z circRNA *Cdr1as* w centrum, **podczas aktywacji neuronów** oraz **podczas udaru niedokrwiennego mózgu**. Inni naukowcy zainspirowani lukami w pełnym zrozumieniu oddziaływań *Cdr1as*-miR-7 w różnych typach neuronów podejmują starania owocujące ciekawymi odkryciami. Dotyczą one np. lokalizacji *Cdr1as* w obszarach synaptycznych neuronów z obszaru środkowej kory przedczołowej i znaczeniu *Cdr1as* w procesie wygaszenia pamięci strachu (ang. *fear extinction memory*)

[Zajaczkowski et al., 2023]. Warto dodać, że *Cdr1as* jest również aktywnie eksplorowany w odniesieniu do nowotworów. Badania te sugerują, że rola *Cdr1as* w komórkach nowotworowych **czerniaka** może być niezwiązana z regulacją miR-7 i jego docelowych transkryptów, lecz z regulowaniem dostępności białka IGF2BP3 [Hanniford et al., 2020]. Zbadano również, że *Cdr1as* nie jest ekspresjonowany przez wiele typów nowotworów człowieka, lecz znajduje się w komórkach stromy (ang. *stromal cells*) w tkance okalającej nowotwór [Kirsiansen et al., 2020]. Obecnie myszy z mutacją *locus Cdr1as* są przedmiotem badań w moim laboratorium oraz w kilku innych laboratoriach na świecie (w Finlandii, Danii, Holandii, USA). Mam nadzieję, że badania z zastosowaniem tego modelu zaowocują jeszcze wieloma odkryciami, które przybliżą nam bardziej szczegółowo rolę regulacyjnych sieci niekodujących RNA w mózgu, nowotworach i ich obrzeżach.

F. REFERENCES

- Agarwal V, Lopez-Darwin S, Kelley DR, Shendure J. The landscape of alternative polyadenylation in single cells of the developing mouse embryo. *Nat Comm.* 2021; 12: 5101.
- Ahmed K, LaPierre MP, Gasser E, Denzler R, Yang Y, Rüllicke T, Kero J, Latreille M, Stoffel M. Loss of microRNA-7a2 induces hypogonadotropic hypogonadism and infertility. *J. Clin. Invest.* 2017; 127(3):1061-1074.
- Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, Zamore PD. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science.* 2010; 328(5985):1534-9.
- Barbosa-Morais NL, Irimia M, Pan Q, Xiong HY, Gueroussov S, Lee LJ, Slobodeniuc V, Kutter C, Watt S, Çolak R, et al. The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science.* 2012; 338: 1587-1593.
- Bartel, D.P. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018, 173, 20–51.
- Cajigas IJ, Tushev G, Will TJ, tom Dieck S, Fuerst N, Schuman EM. The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron.* 2012; 74(3):453-66.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65(14):6029-33.
- Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334(4):1351-8.
- Cocquerelle C, Mascrez B, Héтуin D, Bailleul B. Mis-splicing yields circular RNA molecules. *FASEB J.* 1993; 7(1):155-60.
- Cuddleston WH, Li J, Fan X, Kozenkov A, Lalli M, Khalique S, Dracheva S, Mukamel EA, Breen MS. Cellular and genetic drivers of RNA editing variation in the human brain. *Nat Commun.* 2022; 13(1):2997.
- Curry-Hyde A, Gray LG, Chen BJ, Ueberham U, Arendt T, Janitz M. Cell type-specific circular RNA expression in human glial cells. *Genomics.* 2020 Nov; 112(6):5265-5274.
- de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol.* 2017; 35(9):872-878.
- Enuka Y, Lauriola M, Feldman ME, Sas-Chen A, Ulitsky I, Yarden Y. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(3):1370-83.

- Geibert LFR & MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20, 21–37.
- Gokool A, Anwar F, Voineagu I. The Landscape of Circular RNA Expression in the Human Brain. *Biol Psychiatry.* 2020; 87(3):294-304.
- Grosswendt S, Filipchuk A, Manzano M, Klironomos F, Schilling M, Herzog M, Gottwein E, Rajewsky N. Unambiguous identification of miRNA:target site interactions by different types of ligation reactions. *Mol Cell.* 2014; 54(6):1042-1054.
- Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, Kjems J. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J.* 2011; 30(21):4414-22.
- Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature.* 2013; 495(7441):384-8.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005; 435:828–833.
- Hirata E, Arakawa Y, Shirahata M, Yamaguchi M, Kishi Y, Okada T, Takahashi JA, Matsuda M, Hashimoto N. Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci.* 2009; 100(8):1451-9.
- Holt CE, Martin KC, Schuman EM. Local translation in neurons: visualization and function. *Nat Struct Mol Biol.* 2019; 26(7):557-566.
- Hsu MT, Coca-Prados M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature.* 1979; 280(5720):339-40.
- Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA.* 2013; 19(2):141-57.
- Ji P, Wu W, Chen S, Zheng Y, Zhou L, Zhang J, Cheng H, Yan J, Zhang S, Yang P, Zhao F. Expanded Expression Landscape and Prioritization of Circular RNAs in Mammals. *Cell Rep.* 2019; 26(12):3444-3460.e5
- Juzenas S, Venkatesh G, Hübenthal M, Hoepfner MP, Du ZG, Paulsen M, Rosenstiel P, Senger P, Hofmann-Apitius M, Keller A, Kupcinskas L, Franke A, Hemmrich-Stanisak G. A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(16):9290-9301.
- Kim KW, Tang NH, Andrusiak MG, Wu Z, Chisholm AD, Jin Y. A Neuronal piRNA Pathway Inhibits Axon Regeneration in *C. elegans*. *Neuron.* 2018; 97(3):511-519.e6.
- Kleaveland B, Shi CY, Stefano J, Bartel DP. A Network of Noncoding Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain. *Cell.* 2018; 174(2):350-362.e17.
- Lampi MC, Reinhart-King CA. Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials. *Sci Transl Med.* 2018; 10(422):eaao0475.
- LaPierre MP, Godbersen S, Torres Esteban M, Schad AN, Treier M, Ghoshdastider U, Stoffel M. MicroRNA-7a2 Regulates Prolactin in Developing Lactotrophs and Prolactinoma Cells. *Endocrinology.* 2021; 162(2):bqaa220.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75:843–854.
- Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu H, Shan G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol.* 2015; 22(3):256-64.
- Licatalosi DD & Darnell RB. Splicing regulation in neurologic disease. *Neuron.* 2006; 52(1):93-101.

- Mathoux J, Henshall DC, Brennan GP. Regulatory Mechanisms of the RNA Modification m(6)A and Significance in Brain Function in Health and Disease. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15:671932.
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, Le Noble F, Rajewsky N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature.* 2013; 495(7441):333-8.
- Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal.* 2009; 3(3-4):287-310.
- Miura P, Shenker S, Andreu-Agullo C, Westholm JO, Lai EC. Widespread and extensive lengthening of 3' UTRs in the mammalian brain. *Genome Res.* 2013; 23:812–825.
- Nik S & Bowman TV. Splicing and neurodegeneration: Insights and mechanisms. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2019; 10(4):e1532.
- Nowakowski TJ, Rani N, Golkaram M, Zhou HR, Alvarado B, Huch K, West JA, Leyrat A, Pollen AA, Kriegstein AR, Petzold LR, Kosik KS. Regulation of cell-type-specific transcriptomes by microRNA networks during human brain development. *Nat Neurosci.* 2018; 21(12):1784-1792.
- Nussbacher JK, Tabet R, Yeo GW, Lagier-Tourenne C. Disruption of RNA Metabolism in Neurological Diseases and Emerging Therapeutic Interventions. *Neuron.* 2019; 102(2):294-320.
- Radhakrishnan B, Alwin Prem Anand A. Role of miRNA-9 in Brain Development. *J Exp Neurosci.* 2016; 10:101-120.
- Raj B & Blencowe BJ. Alternative Splicing in the Mammalian Nervous System: Recent Insights into Mechanisms and Functional Roles. *Neuron.* 2015; 87(1):14-27.
- Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T, Kandel ER. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell.* 2012; 149(3):693-707.
- Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, Jens M, Pino N, Giusti S, Hanan M, Behm M, Bartok O, Ashwal-Fluss R, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Mol Cell.* 2015; 58: 870–885.
- Salzman J, Chen RE, Olsen MN, Wang PL, Brown PO. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet.* 2013; 9(9):e1003777.
- Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73(11):3852-6.
- Sapkota D, Lake AM, Yang W, Yang C, Wesseling H, Guise A, Uncu C, Dalal JS, Kraft AW, Lee JM, Sands MS, Steen JA, Dougherty JD. Cell-Type-Specific Profiling of Alternative Translation Identifies Regulated Protein Isoform Variation in the Mouse Brain. *Cell Rep.* 2019; 26(3):594-607.e7.
- Shibata M, Nakao H, Kiyonari H, Abe T, Aizawa S. MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *J Neurosci.* 2011; 31(9):3407-22.
- Schratt GM, Tübing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature.* 2006; 439(7074):283-9.
- Smibert P, Miura P, Westholm JO, Shenker S, May G, Duff MO, Zhang D, Eads B, Carlson J, Brown JB, et al. Global patterns of tissue-specific alternative polyadenylation in *Drosophila*. *Cell Rep.* 2012; 1: 277–289.
- Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci.* 2005; 21(6):1469-77.

- Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, Bertagnolli D, Goldy J, Shapovalova N, Parry S, Lee C, Smith K, Bernard A, Madisen L, Sunkin SM, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci.* 2016; 19(2):335-46.
- Tosar JP, Rovira C, Cayota A. Non-coding RNA fragments account for the majority of annotated piRNAs expressed in somatic non-gonadal tissues. *Commun Biol.* 2018; 1:2.
- Tushev G, Glock C, Heumuller M, Biever A, Jovanovic M, Schuman EM. Alternative 3' UTRs modify the localization, regulatory potential, stability, and plasticity of mRNAs in neuronal compartments. *Neuron.* 2018; 98: 495–511.e6.
- Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell.* 2011; 147(7):1537-50.
- Vasek MJ, Mueller SM, Fass SB, Deajon-Jackson JD, Liu Y, Crosby HW, Koester SK, Yi J, Li Q, Dougherty JD. Local translation in microglial processes is required for efficient phagocytosis. *Nat Neurosci.* 2023; 26(7):1185-1195.
- Vuong CK, Black DL, Zheng S. The neurogenetics of alternative splicing. *Nat Rev Neurosci.* 2016; 17(5):265-81.
- Westholm JO, Miura P, Olson S, Shenker S, Joseph B, Sanfilippo P, Celniker SE, Graveley BR, Lai EC. Genome-wide analysis of *Drosophila* circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation. *Cell Rep.* 2014; 9:1966–1980.
- Weyn-Vanhentenryck SM, Feng H, Ustianenko D, Duffie R, Yan Q, Jacko M, Martinez JC, Goodwin M, Zhang X, Hengst U, et al. Precise temporal regulation of alternative splicing during neural development. *Nat Commun* 2018; 9:2189.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993; 75:855–862.
- Yates D. Non-coding RNA: Regulatory circles. *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18(10):570-571.
- Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol.* 2004; 5(10):R74.
- Yoon YJ, Wu B, Buxbaum AR, Das S, Tsai A, English BP, Grimm JB, Lavis LD, Singer RH. Glutamate-induced RNA localization and translation in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113(44):E6877-E6886.
- You X, Vlatkovic I, Babic A, Will T, Epstein I, Tushev G, Akbalik G, Wang M, Glock C, Quedenau C, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat Neurosci.* 2015; 18: 603–610.
- Zajaczkowski EL, Zhao Q, Liau WS, Gong H, Madugalle SU, Periyakarupiah A, Leighton LJ, Musgrove M, Ren H, Davies J, Marshall PR, Bredy TW. Localised *Cdr1as* activity is required for fear extinction memory. *Neurobiol Learn Mem.*; 203:107777.
- Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Juréus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C, Rolny C, Castelo-Branco G, Hjerling-Leffler J, Linnarsson S. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science.* 2015; 347(6226):1138-42.
- Zeng H. What is a cell type and how to define it? *Cell.* 2022; 185(15):2739-2755.
- Zhang X, Zhang X, Yong T, Gan L, Yang X. Boosting antitumor efficacy of nanoparticles by modulating tumor mechanical microenvironment. *EBioMedicine.* 2024; 105:105200.
- Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, Zhu S, Yang L, Chen LL. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell.* 2013; 51(6):792-806.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

(informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej)

Dorobek naukowy, jaki posiadam wiąże się z moją pracą w dwóch jednostkach badawczych:

- Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, gdzie w ramach studium doktoranckiego ukończyłam studia doktoranckie, uzyskałam tytuł doktora w 2012 roku, a następnie kontynuowałam pracę, jako asystent naukowy do stycznia 2015. Podczas studium doktoranckiego przyznano mi grant promotorski, otrzymałam prestiżowe stypendium Prezesa PAN oraz zostałam uhonorowana stypendium przez Wojewódzki Urząd Pracy w ramach „Wsparcia stypendialnego dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”. Obecnie, od listopada 2019, kieruję zakładem Niekodujących RNA w ICHB PAN.
- Berlin Institute for Medical Systems Biology (BIMSB), Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin, Niemcy, gdzie w latach 2015-2019 odbyłam staż podoktorski.

5.1. LISTA PUBLIKACJI NIEWCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

P6

Micromanaging the neuroendocrine system - a review on miR-7 and the other physiologically relevant miRNAs in the hypothalamic-pituitary axis.

Zacharjasz J*, Sztachera M*, Smuszkiewicz M, **Piwecka M**[#]. *FEBS Letters* 2024 Jul; 598(13):1557-1575. doi: 10.1002/1873-3468.14948.

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14948>

IF 2022 = 3.5; MNiSW 2023 = 140; MNiSW 2024 = 100; Cyt=0

P7

miR-7 controls glutamatergic transmission and neuronal connectivity in a Cdrlas-dependent manner

Cerda-Jara CA, Kim S, Thomas G, Farsi Z, Zolotarov G, Georgii E, Woehler A, **Piwecka M**, Rajewsky N[#]. *EMBO Reports* 2024; 2024 Jun 3. doi: 10.1038/s44319-024-00168-9. Online ahead of print. <https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/s44319-024-00168-9>

IF 2021 = 9.071; MNiSW 2023 = 140; MNiSW 2024 = 140; Cyt=0

P8

ciRS-7 and miR-7 regulate ischemia-induced neuronal death via glutamatergic signaling.

Scoyni F[#], Sitnikova V, Giudice L, Korhonen P, Trevisan DM, Hernandez de Sande A, Gomez-Budia M, Giniatullina R, Ugidos IF, Dhungana H, Pistono C, Korvenlaita N, Välimäki NN, Kangas SM, Hiltunen AE, Gribchenko E, Kaikkonen-Määttä MU, Koistinaho J, Ylä-Herttuala S, Hinttala R, Venø MT, Su J, Stoffel M, Schaefer A, Rajewsky N, Kjems J, LaPierre MP, **Piwecka M**, Jolkkonen J, Giniatullin R, Hansen TB, Malm T[#]. *Cell Reports* 2024; 43(3):113862. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113862>

IF 2023 = 8.8; MNiSW 2023 = 200; MNiSW 2024 = 200; Cyt=1

P9

Editorial: RNA at a breaking point? Cytoplasmic cleavage and other post-transcriptional RNA processing in neurodevelopment and disease.

Piwecka M[#], Luisier R, Andreassi C. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2023; 16:1214853. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2023.1214853/full>, eCollection 2023.

IF 2022 = 5.639; MNiSW 2021 = 140; MNiSW 2024 = 140; Cyt=0

P10

RNA regulation in brain function and disease 2022 (NeuroRNA): A conference report.

Piwecka M[#], Fiszer A, Rolle K, Olejniczak M. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2023, 16:1133209. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2023.1133209/full>

IF 2022 = 5.639; MNiSW 2021 = 140; MNiSW 2024 = 140; Cyt=0

P11

Analyses of circRNA Expression throughout the Light-Dark Cycle Reveal a Strong Regulation of Cdr1as, Associated with Light Entrainment in the SCN.

Ivanov A[#], Mattei D, Radscheit K, Compagnion AC, Pett JP, Herzel H, Paolicelli RC, **Piwecka M**, Meyer U, Beule D. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23(20):12347. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/20/12347>

IF 2021 =5.6; MNiSW 2021 = 140; MNiSW 2024 = 140; Cyt=4

P12

RNA-protein interactomes as invaluable resources to study RNA viruses: Insights from SARS CoV-2 studies.

Koliński M, Kałużna E, **Piwecka M[#]**. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2022, 13(6):e1727. <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wrna.1727>

IF 2021 = 9.349; MNiSW 2021 = 140; MNiSW 2024 = 140; Cyt=3

P13

Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids.

Belter A*, Rolle K*, **Piwecka M***, Fedoruk-Wyszomirska A, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J[#]. *Scientific Reports* 2016, 6:24516. <https://www.nature.com/articles/srep24516>

IF 2015 = 5.228; MNiSW 2015 = 40; MNiSW 2024 = 140; Cyt=26

P14

The Sequence and Structure Determine the Function of Mature Human miRNAs.

Rolle K*, **Piwecka M***, Belter A*, Wawrzyniak D, Jeleniewicz J, Barciszewska MZ, Barciszewski J[#]. *PLoS One* 2016; 11(3):e0151246.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0151246>

IF 2015 = 3.234; MNiSW 2015 = 40; MNiSW 2024 = 100; Cyt=36

P15

Hyperosmia, ectrodactyly, mild intellectual disability, and other defects in a male patient with an X-linked partial microduplication and overexpression of the KAL1 gene.

Sowińska-Seidler A, **Piwecka M**, Olech E, Socha M, Latos-Bieleńska A, Jamsheer A[#]. *Journal of Applied Genetics* 2015; 56(2):177-84. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13353-014-0252-7>

IF 2014 = 1.67; MNiSW 2014 = 20; MNiSW 2024 = 140; Cyt=9

P16

Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC.

Belter A, Gudanis D, Rolle K, **Piwecka M**, Gdaniec Z, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J[#]. *PLoS One* 2014; 9(11):e113848.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113848>

IF 2013 = 3.534; MNiSW 2013 = 40; MNiSW 2024 = 100; Cyt = 37

P17

Nucleic acid-based technologies in therapy of malignant gliomas.

Piwecka M, Rolle K, Wyszko E, Żukiel R, Nowak S, Barciszewska MZ, Barciszewski J[#]. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2011; 12(11):1805-22. <http://www.eurekaselect.com/75835/article>

IF 2010 = 3.455; MNiSW 2010 = 20; MNiSW 2024 = 100; Cyt=12

P18

Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi).

Rolle K, Nowak S, Wyszko E, **Nowak M**, Zukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J[#]. *Cancer Biology & Therapy* 2010; 9(5):396-406.

<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cbt.9.5.10958>

IF 2009 = 2.305; MNiSW 2009 = 27; MNiSW 2024 = 100; Cyt=45

P19

A new and efficient method for inhibition of RNA viruses by DNA interference.

Nowak M, Wyszko E, Fedoruk-Wyszomirska A, Pospieszny H, Barciszewska MZ, Barciszewski J. *FEBS Journal* 2009; 276(16):4372-80.

<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-4658.2009.07145.x>

IF 2008 = 3.321; MNiSW 2008 = 20; MNiSW 2024 = 100; Cyt=6

P20

A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA.

Wyszko E, Rolle K, Nowak S, Zukiel R, **Nowak M**, Piestrzeniewicz R, Gawrońska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2008; 65(6):677-84.
http://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2008/6/677.pdf

IF 2007 = 0.234; MNiSW 2007 = 4; MNiSW 2024 = 100; Cyt=27

P21

Leadzyme formed in vivo interferes with tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum*.

Wyszko E, **Nowak M**, Pospieszny H, Szymanski M, Pas J, Barciszewska MZ, Barciszewski J. *FEBS Journal* 2006; 273(22):5022-31.
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1742-4658.2006.05497.x>

IF 2005 = 3.304; MNiSW 2005 = 24; MNiSW 2024 = 100; Cyt=3

Nazwisko habilitantki jest wytłuszczone;

#autor korespondencyjny;

*autorzy, którzy w równym stopniu przyczynili się do powstania pracy.

Dane naukometryczne dotyczące osiągnięcia habilitacyjnego podano wg. bazy *Web of Science Core Collection*, z dnia 16/08/2024.

Sumaryczny *Impact Factor* (z roku poprzedzającego ukazanie się publikacji) = **73.883**

Łączna liczba punktów MNiSW z roku poprzedzającego ukazanie się publikacji = **1275**

Łączna liczba punktów MNiSW zgodnie z najnowszą listą opublikowaną 05.01.2024 = **1980**

Łączna liczba cytowań = **209**

Dodatkowe informacje o **publikacjach habilitantki w czasopismach innych, niż znajdujące się w bazie JCR**, można znaleźć w załączniku nr 4 (*Wykaz osiągnięć naukowych*, str.6).

5.2. LISTA PATENTÓW

Jestem współautorem dwóch patentów międzynarodowych:

- o European Patent, Patent No. EP2978847 B1; Date of publication: 15.02.2017.

HAMMERHEAD RIBOZYMES TARGETING MIR-21

Inventors: NASKRET-BARCISZEWSKA, Mirosława (PL); BELTER, Agnieszka (PL); ROLLE, Katarzyna (PL); PIWECKA, Monika (PL); SOSINSKA, Patrycja (PL); FEDORUK-WYSZOMIRSKA, Agnieszka (PL).

- United States Patent, Patent No.: US 8,404,660 B2; Date of Patent: Mar. 26, 2013.

METHOD OF OBTAINING OF 4-N-FURFURYLCYTOSINE AND/OR ITS DERIVATIVES, AN ANTI-AGING COMPOSITION AND USE OF 4-N-FURFURYLCYTOSINE AND/OR ITS DERIVATIVES IN THE MANUFACTURE OF ANTI-AGING COMPOSITION

Inventors: Jan Barciszewski, Poznan (PL); Wojciech T. Markiewicz, Poznan (PL); Eliza Wyszko, Poznan (PL); Maria Markiewicz, Poznan (PL); Monika Nowak, Kostrzyn (PL); Katarzyna Rolle, Kamionki (PL); Ewelina Adamska, Kamien Pomorski (PL); Marcin K. Chmielewski, Poznan (PL).

5.3. LISTA WSPÓŁPRAC NAUKOWYCH

Poniżej przedstawiam listę przeszłych i aktualnych współprac z naukowcami i/lub z grupami badawczymi z kraju i świata.

PRZESZŁE:

Prof. Henryk Pospieszny - Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, Poznań.

Prof. Wojciech T. Markiewicz – ICHB PAN w Poznaniu.

Dr Anna Maria Barciszewska, Dr Rafał Piestrzeniewicz, Prof. Ryszard Żukiel, Prof. Stanisław Nowak – Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Dr Thorsten Trimbuch, Dr Pascal Fenske, Prof. Christian Rosenmund - Department of Neurophysiology, NeuroCure Cluster of Excellence, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Niemcy.

Dr Ralf Kühn - Transgenic Core Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Niemcy.

Dr Luis R. Hernandez-Miranda, Prof. Carmen Birchmeier - Laboratory for Developmental Biology and Signal Transduction, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Niemcy.

Dr Flavia Syconi, Prof. Tarja Malm - Neuroinflammation Research Group, University of Eastern Finland (UEF), Kuopio, Finlandia.

OBECNE:

Dr Michał Szcześniak – Instytut Biologii i Ewolucji Człowieka, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Dr Agnieszka Rybak-Wolf – Organoid Core Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Niemcy.

Dr Remigiusz Serwa - Międzynarodowy Instytut Mechanizmów i Maszyn Molekularnych PAN, Warszawa, Polska.

Dr Luiza Stanaszek - Zakład Neurobiologii Naprawczej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa, Polska.

Dr Andranik Ivanov, Prof. Dieter Beule - The Core Unit Bioinformatics (CUBI), Berlin Institute of Health (BIH), Charité–Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Niemcy.

Dr Anne-Claire Compagnon, Prof. Rosa Chiara Paolicelli - Department of Biomedical Sciences, University of Lausanne, Lozanna, Szwajcaria.

Dr Fanny Langlet - Department of Biomedical Sciences, University of Lausanne, Lozanna, Szwajcaria.

Dr Cledi A. Cerda Jara, Prof. Nikolaus Rajewsky - MDC, Berlin, Niemcy.

Dr med. Norbert Wąsik, Prof. Włodzimierz Liebert - Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, Polska.

Dr Krzysztof Brzeziński, Prof. ICHB PAN z Poznania.

Dr Katarzyna Rolle, Prof. ICHB PAN z Poznania.

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ

6.1. OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE

- W latach 2022-2024 – członek komisji do przeprowadzenia ewaluacji śródkresowych studentów doktorantów z Poznańskiej Szkoły Doktorskiej Instytutów Polskiej Akademii Nauk (PSD IPAN).
- Wykłady i seminaria dla doktorantów w ramach PSD IPAN:
 - 04-05.2021 – przygotowanie i poprowadzenie dwóch wykładów dla studentów doktorantów z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu z przedmiotu „Epigenetyka”. Tytuły wykładów: „*Circular RNAs (circRNAs) – functional significance and methodologies for their identification*”, “*PIWI-interacting RNAs (piRNAs) - functions in genome stability and transmission of epigenetic information*”, Poznań, Polska.
 - 01.2024 - przygotowanie i poprowadzenie wykładu dla studentów doktorantów z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu z przedmiotu „*Genetics of Human Development*”, tytuł wykładu: „*microRNAs in development*”, Poznań, Polska.

- 03-04.2024 – przygotowanie i poprowadzenie dwóch seminariów dla studentów doktorantów z PSD PAN z tematyki przestrzennego sekwencjonowania RNA, tytuł: „(A few words about) Spatial Transcriptomics”, Poznań, Polska.
- Szczegółową informację na temat **opieki naukowej pełnionej przez habilitantkę podczas wykonywania prac doktorskich (n=3), magisterskich (n=2), licencjackich (n=2)** oraz odbywania staży i praktyk studenckich (n=15) można znaleźć w **Załączniku nr 4 (Wykaz osiągnięć naukowych, str. 17-18)**.

6.2. OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE ORAZ POPULARYZUJĄCE NAUKĘ

- Zajęcia warsztatowe dla młodzieży z liceum z klasy o profilu biologiczno-chemicznym z Zespołu Szkół Społecznych STO w Szczecinku, 31.03.2023, Poznań, Polska, **organizator**.
- Redakcja naukowa polskiego wydania książki pt. „*Autobiografia Transplciowego Naukowca*” autorstwa Bena Baessa, 2021-2022; Wydawnictwo: Ośrodek Wydawnictw Naukowych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, ISBN 978-83-7712-029-3, **redaktor naukowy**.
- Wykład podczas wydarzenia otwartego „Tydzień mózgu w Poznaniu 2022” w ramach Światowego Tygodnia Mózgu, tytuł: "Heterogenność komórek mózgu", 14.02.2022, Poznań, **prezenter**.
- Udział w przygotowaniu broszury informacyjnej dla obcokrajowców podejmujących lub planujących podjąć pracę naukową w Poznaniu – projekt w ramach programu NAWA „*Welcome to Poland*”, 2021, **współorganizator i współwykonawca**.
- Forum Inteligentnego Rozwoju, Scena otwarta: Naukowcy przyszłości - preludium innowacji, Life Science, prezentacja „*Diabeł tkwi w szczegółach - co robią koliste RNA w mózgu?*”, 27.09.2021, Toruń, Polska, **uczestnik forum i prezenter**.
- Wykład na zaproszenie Poznańskiego Porozumienia Doktorantów i Rady Samorządu Doktorantów Instytutów PAS w Poznaniu dla poznańskiego środowiska doktorantów z cyklu "Nauka po poznańsku", tytuł: „*Choose your postdoc wisely and have fun doing science! A brief story of my research path and some tips.*”, 27.05.2021, online, **prowadzący spotkanie i wykładowca**.
- Długa Noc Nauki w Berlinie, 3-krotny udział w latach 2017, 2018, 2019, **organizator i wykonawca**.
- V edycja Wykładów Otwartych z cyklu Spotkania Młodych z Nauką w Poznaniu, 12.04.2014, Poznań, organizator: Studenckie Koło Naukowe Biosfera; funkcja: **członek Komisji Konkursowej**.

- Wsparcie naukowe oraz przygotowanie instalacji artystycznej pt. „*Kosmiczny Ogród*” autorstwa Zbigniewa Oksiuty w ramach drugiej edycji *Mediations Biennale*, Muzeum Narodowe w Poznaniu, 11.09.-30.10.2010; **przygotowanie instalacji.**
- Zajęcia warsztatowe dla uczniów gimnazjum w ramach projektu edukacyjnego „**e-Szkola-Moja Wielkopolska**”, 2012; **prowadzenie warsztatów.**
- Poznańska Noc Naukowców prezentacja „*Zobacz, jak wyglądają geny*” oraz organizacja warsztatów z zakresu izolacji DNA, Poznańska Noc Naukowców, prezentacja; 25.09.2009, **organizator, wykonawca.**

6.3. INNE ZNACZĄCE OSIĄGNIĘCIA ORGANIZACYJNE

- Od listopada 2019 roku jestem Kierownikiem Zakładu Niekodujących RNA w ICHB PAN w Poznaniu;
- Byłam współorganizatorem międzynarodowej konferencji NeuroRNA Conference “*RNA regulation in Brain Function and Disease*” (28-30 wrzesień 2022) oraz dwóch konferencji w Polsce o zasięgu lokalnym. Szczegółowa informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych i międzynarodowych znajduje się Załączniku nr 4 (*Wykaz osiągnięć naukowych*, str. 12);
- Jestem współorganizatorem serii wykładów *RNA Salon Poznan* w ramach *RNA Society*, 2020- do chwili obecnej.

7. INNE INFORMACJE DOT. KARIERY ZAWODOWEJ

Szczegółowe informacje związane z prowadzoną przez mnie aktywnością naukową znajdują się w Załączniku nr 4 (*Wykaz osiągnięć naukowych*), w tym:

- pełen wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych,
- lista publikacji pokonferencyjnych,
- lista wykładów i doniesień konferencyjnych (jako autor prezentujący i jako współautor);
- informacja o udziale w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych,
- informacje o kierowaniu i udziale w projektach badawczych;
- informacja o członkostwie w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych;
- wykaz odbytych szkoleń i warsztatów w kraju i za granicą;
- informacje o recenzowanych pracach naukowych;

- informacje o uczestnictwie w programach europejskich;
- informacja o członkostwie w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism;
- informacja o uczestnictwie w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań;
- nagrody i wyróżnienia.