

Streszczenie

Dystrofia miotoniczna (DM) jest najczęstszą postacią dystrofii mięśniowej wśród osób dorosłych. Jest chorobą genetyczną, dziedziczną w sposób autosomalny, dominujący o złożonym, wielonarządowym przebiegu. DM typu 1 (DM1) związana jest z ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych CTG w genie *DMPK*, natomiast DM typu 2 (DM2) z ekspansją powtórzeń czteronukleotydowych CCTG w genie *CNBP*. Transkrybowany z tych genów RNA zawiera sekwencje powtórzeń nukleotydowych w regionach niekodujących białka oraz jest akumulowany w jądrze komórkowym w postaci skupisk. Z dotychczasowych badań wynika, że ten toksyczny RNA zaburza aktywność białek MBNL i CELF w DM1 lub wyłącznie MBNL w DM2. Najlepiej poznany funkcjami MBNL i CELF1 jest regulacja alternatywnego splicingu, dlatego obniżona aktywność czynników z rodziny MBNL wynikająca z ich sekwestracji na toksycznym RNA oraz zwiększona aktywność czynników CELF powodują masowe zmiany we wzorze alternatywnego splicingu setek mRNA u pacjentów DM1. Obecnie jedyną opisaną przyczyną zwiększonej aktywności CELF1 w DM1 jest hiperfosforylacja tego czynnika przez kinazę PKC. Taka potranslacyjna modyfikacja zwiększa okres półtrwania CELF1 oraz zmienia jego lokalizację na wyłącznie jądrową. Zmiana ta jest jednak stwierdzana jedynie dla niektórych pacjentów z DM1, i nie była dotąd opisana w DM2.

Celem niniejszego projektu doktorskiego było ustalenie, czy ekspresja genu *CELF1* może być również regulowana poprzez zmiany metabolizmu jego pre-mRNA oraz czy ten potranskrypcyjny proces może mieć wpływ na kształtowanie patomechanizmu molekularnego DM. W pracy tej zostało wykazane, że w mięśniach szkieletowych DM dochodzi do zaburzenia alternatywnego splicingu eksonów lub fragmentów eksonów tworzących w dojrzałych mRNA *CELF1* 5' i 3' regiony nie podlegające translacji (5'UTR i 3'UTR). Te niekodujące regiony podlegają również znaczącym zmianom w czasie ontogenezy i występują w odmiennych postaciach w różnych typach tkanek. Zmiany splicingowe w regionie 5'UTR w prawidłowych mięśniach szkieletowych powodują wprowadzenie wcześniejszego kodonu start dla biosyntezy białka, co w konsekwencji może prowadzić do powstania formy CELF1 o odmiennej aktywności. Z drugiej strony zasadnicze zmiany alternatywnego splicingu, do jakich dochodzi w regionie 5'UTR oraz alternatywnego splicingu i poliadenylacji 3'UTR, mogą decydować o zdolności translacyjnej, stabilności czy lokalizacji subkomórkowej różniących się izoform mRNA. Zatem w dalszej części pracy zdecydowałem się zbadać te możliwości.

Izoformy 5'UTR *CELF1* różniące się sekwencją i długością mają podobną wydajność translacyjną i lokalizację subkomórkową, ale wpływają w znaczącym stopniu na jakość powstającego białka. Okazało się, że dystrybucja izoform 5'UTR mRNA *CELF1* zależy od czynnika splicingowego MBNL, który przez kontrolowanie splicingu 5'UTR *CELF1* wpływa na poziom izoform białkowych CELF1. Z

mięśniowo-specyficznego eksonu alternatywnego rozpoczyna się biosynteza dłuższego o 27 aminokwasów białka CELF1, które wykazało mniejszą aktywność w regulacji alternatywnego splicingu. Dlatego funkcjonalny niedobór MBNL w obu typach DM może sprzyjać potranskrypcyjnym modyfikacją *CELF1* promującym powstawanie aktywniejszej izoformy białka CELF1. Ponadto wyniki analizy zaburzeń alternatywnego splicingu eksonów zależnych od CELF1 w mięśniach szkieletowych pacjentów z DM1, ale również DM2 sugerują, że podwyższona aktywność CELF1 w DM może być także skutkiem nieprawidłowości w alternatywnym splicingu 5'UTR *CELF1* promującego translację aktywniejszej izoformy CELF1.

Poziom białka CELF1 w różnych warunkach fizjologicznych i patologicznych może też być wydajnie modyfikowany przez różne izoformy 3'UTR *CELF1*. W tej pracy wykazano, że na poziomy izoform 3'UTR *CELF1* wpływają zaburzenia aktywności zarówno białek MBNL jak i CELF, które mogą kontrolować ich alternatywny splicing i/lub alternatywną poliadenylację. W ten sposób czynniki te mogą pośrednio kształtować ekspresję genu *CELF1* poprzez zmiany wrażliwości jego mRNA na specyficzne mikroRNA lub białka wiążące RNA.

Opisana w niniejszej pracy potranskrypcyjna regulacja ekspresji genu *CELF1* uzupełnia, wcześniej poznany, mechanizm potranslacyjnej modyfikacji produktu tego genu, zarówno w prawidłowych procesach różnicowania się poszczególnych tkanek, jak również w patogenezie DM. W chorobie tej oba mechanizmy mogą prowadzić do wzrostu aktywności CELF1, który jest dobrze poznany elementem molekularnego patomechanizmu DM1. Jednak dopiero zmiana poziomów izoform białka CELF1 na skutek potranskrypcyjnych modyfikacji 5'UTR jego mRNA może tłumaczyć wzrost aktywności tego białka w mięśniach szkieletowych pacjentów z DM2. Wiedza o zmienności regionów UTR mRNA *CELF1* może w przyszłości przyczynić się również do opracowania i poszerzenia testowanych już strategii terapeutycznych DM ukierunkowanych na obniżenie poziomu i aktywności CELF1.

Słowa kluczowe: CELF, MBNL, dystrofia miotoniczna, alternatywny splicing, alternatywna poliadenylacja