

## Streszczenie

Białka MBNL (Muscleblind-like) należą do czynników regulatorowych wiążących się z RNA oraz zaangażowanych w posttranskrypcyjną regulację ekspresji setek genów. Rodzinę białek MBNL stanowią trzy paralogi, których poziom ekspresji różni się znacząco na etapach embrionalnego i postnatalnego rozwoju organizmu. MBNL1 ulega głównie ekspresji w dojrzałych komórkach mięśniowych, MBNL2 w mózgu oraz może kompensować niedobór MBNL1 w innych tkankach, natomiast MBNL3 jest ważnym czynnikiem regulatorowym na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego oraz podczas regeneracji mięśni. Białka te są zaangażowane w wiele procesów związanych z metabolizmem RNA, w tym regulację alternatywnego splicingu i alternatywnej poliadenylacji prekursorowych mRNA. Profil splicingowy transkryptów zależnych od MBNL jest ściśle związany z miejscem ich wiązania się w pre-mRNA.

Każdy z paralogów MBNL reprezentowany jest przez kilka izoform splicingowych. Różnią się one sekwencjami kodowanymi przez eksony alternatywne decydujące m.in. o lokalizacji komórkowej, aktywności splicingowej, czy też zdolności do dimeryzacji. Białka MBNL posiadają domenę wiążącą RNA, składającą się z czterech palców cynkowych ułożonych w dwa podobne do siebie tandemy połączone ze sobą elastyczną sekwencją linkerową. Minimalnym motywem w sekwencji RNA rozpoznawanym przez MBNL jest 5'-YGCY-3' (gdzie Y oznacza U lub C). Wiązanie MBNL1 do RNA jest również uwarunkowane strukturą II-rzędową RNA, w którą zaangażowany jest rozpoznawany przez białko motyw sekwencyjny, z preferencją do regionów charakteryzujących się nieznaczną stabilnością termodynamiczną. Determinanty leżące u podstaw różnic między paralogami w np. powinowactwie do RNA, aktywności splicingowej, funkcji komórkowej czy też specyficzności względem docelowych cząsteczek RNA są obecnie przedmiotem badań wielu grup badawczych.

Białka MBNL zasługują na szczególną uwagę, gdyż ich funkcjonalny niedobór w komórce skutkuje ekspresją płodowych izoform białkowych, wynikającą z zaburzeń alternatywnego splicingu. Takie nieprawidłowości stwierdzone są u pacjentów cierpiących na dystrofię miotoniczną (DM), będącą genetyczną chorobą manifestującą się wielonarządowymi dysfunkcjami np. osłabieniem i zanikiem mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego czy też występowaniem zaćmy. W patomechanizmie DM typu 1 (DM1) dochodzi do sekwestracji białek MBNL przez nadmiernie wydłużone trójnukleotydowe powtórzenia CUG ((CUG)<sup>exp</sup>, ang. *expanded*) zlokalizowane w regionie 3' niepodlegającym translacji (3'UTR) w mRNA genu kinazy białkowej - *DMPK* (ang. *Dystrophia Myotonica Protein Kinase*). W DM typu 2 (DM2)

dochodzi do ekspansji powtórzeń CCUG zlokalizowanych w intronie 1 w mRNA genu białka komórkowego wiążącego kwasy nukleinowe - *CNBP* (ang. *Cellular Nucleic acids-Binding Protein*). Region patogenicznie wydłużonych powtórzeń CUG tworzy stabilną strukturę typu spinki do włosów i po związaniu licznych białek, w tym MBNL, tworzy jądrowe skupiska zwane inkluzjami. Wśród testowanych eksperymentalnych strategii terapeutycznych w DM wyróżnić można między innymi: degradację zmutowanej cząsteczki, neutralizację jej patologicznego działania w komórce lub uzupełnianie niedoboru funkcjonalnego MBNL.

**Celem badań opisanych w rozprawie doktorskiej było zarówno określenie strukturalnych podstaw oddziaływania białek MBNL z docelowymi fragmentami RNA jak i poszukiwanie inhibitorów tworzenia patogenicznych kompleksów MBNL/(CUG)<sup>exp</sup> oraz zbadanie funkcjonalnych następstw ich działania w modelowych komórkach DM1.**

Aby osiągnąć pierwszy cel pracy dotyczący strukturalnych podstaw oddziaływania MBNL z docelowymi transkryptami, w swoich badaniach zastosowałam szereg testów biochemicznych. Stosując antysensowne oligonukleotydy blokujące regiony RNA zawierające konsensusowe motywy sekwencyjne rozpoznawane przez MBNL, zidentyfikowałam nowe, funkcjonalne oddziaływania MBNL z docelowymi fragmentami pre-mRNA, w tym z własnym transkryptem genu *Mbnl1*. Wykazałam również, że dla efektywnego wiązania MBNL wymagane jest występowanie w RNA wielu motywów YGCY zlokalizowanych w regionie struktury typu spinki do włosów o nieznacznej stabilności termodynamicznej. Moje badania pokazały również że wszystkie paralogi MBNL wiążą się do tych samych fragmentów transkryptów i na kilku przykładach udowodniłam, że oddziałują z tymi samymi motywami sekwencyjnymi. Spośród trzech paralogów MBNL3 wykazuje najniższe powinowactwo do analizowanych RNA. Ponadto, udowodniłam, że MBNL1, MBNL2 i MBNL3 wykazują zbliżone powinowactwo do struktur RNA utworzonych przez powtórzenia CUG oraz CCUG związanych z rozwojem DM.

W celu odpowiedzenia na drugie pytanie dotyczące inhibicji toksycznych kompleksów MBNL/(CUG)<sup>exp</sup> tworzących jądrowe inkluzje u pacjentów z DM1, przetestowałam dwa typy związków chemicznych: oligonukleotydy antysensowne oraz niskocząsteczkowe związki stosowane powszechnie w innych podejściach terapeutycznych.

Moje badania wykazały, że erytromycyna (EM) - antybiotyk z grupy makrolidów właściwych, bezpośrednio wiąże się do powtórzeń CUG i efektywnie inhibuje tworzenie kompleksów MBNL1/(CUG)<sup>exp</sup>. Stosując model komórkowy DM1 pokazałam, że EM wpływa na zmniejszenie się ilości oraz wielkości jądrowych inkluzji zawierających kompleksy MBNL1/(CUG)<sup>exp</sup> oraz korektę alternatywnego splicingu eksonów regulowanych przez MBNL.

Badania te wykazały terapeutyczny efekt EM oraz przybliżyły mechanizm aktywności tego związku w modelach DM1.

Z kolei inne moje badania ukazały wpływ długości antysensownych oligonukleotydów o sekwencji komplementarnej do powtórzeń CUG oraz typu zastosowanej modyfikacji chemicznej na ich wiązanie się do RNA -  $(CUG)^{exp}$ . Testowane oligonukleotydy okazały się skutecznym inhibitorem sekwestracji białek MBNL, co sugeruje możliwość ich wykorzystania jako potencjalnego narzędzia terapeutycznego w DM.