

Summary

Alternative splicing (AS) is a co-transcriptional process providing a substantial increase of proteome diversity by binding of certain RNA-binding proteins (RBPs) to primary transcripts (pre-mRNAs) which leads to conditional inclusion/exclusion of particular exons. That in turn, gives rise to formation of mRNAs differing in sequence from one pre-mRNA variant and, consequently, production of proteins of different amino-acid composition and distinct activity. *Muscleblind*-like (MBNL) protein family gathering three paralogs (MBNL1, 2 and 3) is a group of alternative splicing regulators essential during the development of particular tissues, primarily, skeletal muscles and neuronal cells. MBNLs are also involved in the pathomechanism of myotonic dystrophy (DM), genetic, multi-systemic disorder in which occurs the sequestration of MBNLs on the mRNA of a mutated gene leading to massive misregulation of alternative splicing in patients' cells. Attempts to understand the role of MBNLs and DM pathomechanism have resulted in a number of scientific projects applying whole-transcriptomic analyses, e.g. in order to define novel binding sites recognized by MBNLs. Obtained results provided a substantial amount of data which is required to be experimentally validated. Moreover, these results may shed more light on the mechanism of alternative splicing regulated by MBNL proteins which was the main purpose of my PhD project.

I aimed to give a deeper insight into the role of MBNLs, e.g. by development of reliable protocol based on antisense strategy for verification of new potential MBNL-binding sites. For this purpose, I applied antisense oligonucleotides (AONs), short, chemically modified nucleic acids derivatives able to hybridize specifically to pre-mRNA which may lead to inhibition of RBPs binding and affect their properties including AS regulation.

In three original articles encompassed in my dissertation I presented combination of AONs and hybrid-type minigenes as an efficient method for validation of potential MBNL-binding sites extracted from high-throughput RNA sequencing experiments. Using this approach I also confirmed the hypothesis that all MBNL paralogs recognize the same sequence in RNAs which may lead to inclusion or skipping of alternative exon depending on the binding site localization. Hybrid minigene-based constructs were also used in research on MBNL-binding sites spatial arrangement as well as in the development of assay for searching or validation of potential MBNL sequestration inhibitors in DM. Furthermore, I participated in experiments revealing antagonistic role of MBNL1 and SRSF1 proteins in alternative splicing regulation of exons *via*, either, structural rearrangements or competition for binding sites in RNA. In another project I analyzed the distribution of three alternative exons in the transcripts of *MBNL* genes which revealed differential inclusion among particular human tissues at different developmental stage and in DM patients' samples. In the project which focused on the impact of binding sites organization on MBNLs' activity I provided results quantifying expression level of particular MBNL protein isoforms.

Streszczenie

Splicing alternatywny (ang. alternative splicing, AS) jest kotranskrypcyjnym procesem, w wyniku którego istotnie wzrasta różnorodność proteomu. Wzrost ten jest efektem wiązania się białek wiążących RNA (ang. RNA-binding protein, RBP) do pierwotnych transkryptów (pre-mRNA), które prowadzi do warunkowego włączania lub wyłączenia alternatywnych eksonów. Efektem tego zjawiska jest synteza z jednego pre-mRNA wielu białek różniących się składem aminokwasowym i aktywnością. Rodzinę białek *Muscleblind-like* (MBNL) tworzą trzy paralogi (MBNL1, 2 i 3) będące regulatorami alternatywnego splicingu kluczowymi podczas rozwoju wielu tkanek, głównie mięśni i komórek nerwowych. Białka MBNL mają również związek z patomechanizmem dystrofii miotonicznej (DM), choroby degeneracyjnej mięśni, w której dochodzi do sekwestracji białek MBNL na mRNA zmutowanego genu, co prowadzi do masowej deregulacji alternatywnego splicingu w komórkach pacjentów. W celu zgłębienia roli białek MBNL oraz etiologii DM przeprowadzono wiele projektów naukowych polegających m. in. na zastosowaniu analiz cało-transkryptomowych w celu określenia naturalnych miejsc oddziaływania białek MBNL ze specyficznymi regionami w cząsteczkach RNA. Badania te dostarczyły dużej ilości danych wskazujących potencjalne miejsca w RNA wiążących MBNL. Wyniki te wymagają jednak dalszej eksperymentalnej weryfikacji oraz mogą być wykorzystane do zrozumienia mechanizmu regulacji alternatywnego splicingu przez białka MBNL.

To właśnie stanowiło główny cel niniejszej rozprawy. Starłem się poszerzyć wiedzę na temat roli, jaką pełnią białka MBNL m. in. poprzez opracowanie efektywnego protokołu do weryfikacji potencjalnych miejsc ich oddziaływania z RNA z zastosowaniem strategii antysens. W tym celu wykorzystałem oligonukleotydy antysensowe (ang. antisense oligonucleotides, AON), będące krótkimi, modyfikowanymi chemicznie analogami kwasów nukleinowych, które poprzez specyficzną hybrydyzację do pre-mRNA mogą blokować wiązanie się białek RBP i wpływać w ten sposób na ich funkcje, w tym na proces alternatywnego splicingu.

W trzech publikacjach składających się na moją rozprawę doktorską przedstawiłem połączenie strategii AON i minigenów hybrydowych, jako wydajnej metody do weryfikacji potencjalnych miejsc wiązania dla MBNL wyłonionych na drodze eksperymentów z wykorzystaniem głębokiego sekwencjonowania RNA. Zastosowanie wspomnianego podejścia pozwoliło mi również na pozytywne zweryfikowanie hipotezy o rozpoznawaniu tych samych fragmentów RNA przez wszystkie paralogi MBNL, co ze względu na rozmieszczenie miejsca wiązania względem alternatywnego eksonu może prowadzić do promocji włączania lub wyłączenia tego eksonu z mRNA. Konstrukty bazujące na przygotowanym przeze mnie minigenie hybrydowym zostały także wykorzystane w badaniach nad aranżacją strukturalną RNA miejsc wiązania dla białek MBNL jak i opracowaniu testu dla poszukiwania lub walidowania potencjalnych inhibitorów sekwestracji MBNL w DM. Ponadto, zaangażowany byłem w prace, które wykazały antagonistyczną rolę białek MBNL1 i SRSF1 w regulacji alternatywnego splicingu wielu eksonów poprzez wiązanie się do tych samych miejsc w RNA lub rearanżacje strukturalne miejsc wiązania dla obu białek. Przeprowadzona przeze mnie w innym projekcie analiza dystrybucji trzech alternatywnych eksonów w transkryptach genów *MBNL* wykazała ich zróżnicowane włączanie do mRNA w poszczególnych tkankach na różnych etapach rozwoju oraz zaburzenie tego procesu w mięśniach pacjentów z DM. Z kolei w projekcie wykazującym wpływ organizacji miejsc wiązania w RNA na aktywność regulatorową MBNL dostarczyłem danych o poziomie ekspresji poszczególnych badanych paralogów i izoform białek MBNL.