

Rola elementów regulatorowych *cis* w zmutowanym mRNA *FMRI* zawierającym ekspansję powtórzeń CGG w tworzeniu struktur typu R-loop i regulacji niekanonicznej translacji patogennego białka.

Daria Brygida Niewiadomska

STRESZCZENIE

Ekspansja krótkich powtórzeń tandemowych zlokalizowanych w części kodującej lub niekodującej genu leży u podstaw patogenezy wielu chorób neurologicznych występujących u ludzi. Ekspansja niestabilnych powtórzeń CGG w regionie 5' niepodlegającym translacji (5'UTR) genu *FMRI* w zależności od wielkości ekspansji została powiązana z patogenezą wielu chorób związanych z łamliwym chromosomem X.

Zespół drżenia i ataksji związany z łamliwym chromosomem X (FXTAS) jest chorobą neurodegeneracyjną wieku późnego spowodowaną przez ograniczoną ekspansję (55-200) powtórzeń CGG, zwaną premutacją. Do głównych objawów FXTAS należą drżenie zamiarowe, ataksja chodu i demencja. Na poziomie molekularnym choroba jest spowodowana występowaniem toksycznej cząsteczki mRNA *FMRI*, która tworzy termodynamicznie stabilną strukturę drugorzędową w regionie nadmiernie wydłużonych powtórzeń CGG (rCGGexp). Zmutowana cząsteczka rCGGexp uczestniczy w trzech patogennych procesach. Po pierwsze cząsteczka ta sekwestruje wiele białek wiążących się z RNA, co prowadzi do tworzenia patogennych inkluzji zawierających zmutowane RNA, w wyniku czego metabolizm setek innych cząsteczek RNA jest istotnie zakłócony. Po drugie toksyczna cząsteczka rCGGexp stanowi matrycę dla translacji inicjowanej z niekanonicznego kodonu start, która skutkuje syntezą toksycznego białka zawierającego trakt poliglicynowy (FMRpolyG) z tej samej cząsteczki mRNA, z której jest syntetyzowany naturalny produkt genu *FMRI* – białko FMRP. Ze względu na silne właściwości agregujące, powstające białko tworzy wewnątrzjądrowe agregaty, które prowadzą do zaburzeń funkcji neuronów i ich obumierania. Po trzecie podczas transkrypcji *FMRI*, w obrębie nadmiernie wydłużonych powtórzeń CGG, tworzone są hybrydy RNA:DNA nazywane strukturami typu R-loop. Tworzenie tych struktur prowadzi do zaburzeń transkrypcji i indukuje uszkodzenia DNA wywołujące stan stresu komórkowego.

W przeciwieństwie do FXTAS, klasyczny zespół łamliwego chromosomu X (FXS) jest związany z ekspansją powyżej 200 powtórzeń CGG, zwaną pełną mutacją, i jest chorobą neurorozwojową stanowiącą najbardziej powszechną formę wrodzonej niepełnosprawności intelektualnej. Pełna mutacja prowadzi przeważnie do epigenetycznego wyciszenia genu *FMRI*

i w konsekwencji do braku syntezy białka FMRP w komórkach pacjentów z FXS. Pomimo że wyciszenie *FMRI* jest procesem złożonym wykazano, że przynajmniej częściowo proces ten zależy od tworzenia struktur typu R-loop w obrębie nadmiernie wydłużonych powtórzeń CGG.

Celem pierwszej części projektu było ustalenie roli struktur typu R-loop w procesie patogenezy obu chorób – FXTAS i FXS. Po potwierdzeniu tworzenia struktur typu R-loop w regionie 5'UTR genu *FMRI* z premutacją powtórzeń CGG wykazano wpływ tych struktur na efektywność transkrypcji *FMRI* zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in cellula*. Następnie zbadano wpływ krótkich, chemicznie modyfikowanych antysensowych oligonukleotydów wiążących się bezpośrednio z nadmiernie wydłużonymi powtórzeniami CGG (ASO-CCG) na stabilność tworzonych struktur typu R-loop i w konsekwencji na efektywność transkrypcji *FMRI*. Jako że pełna mutacja genu *FMRI* prowadzi do wyciszenia jego transkrypcji, zostało przeprowadzone długotrwałe traktowanie komórek wyprowadzonych od pacjentów z FXS cząsteczkami ASO-CCG w celu zbadania, czy jest możliwa reaktywacja transkrypcji *FMRI*, w wyniku której będzie syntetyzowane białko FMRP. Wyniki uzyskane w tej części pracy potwierdziły, że struktury R-loop tworzone w obrębie regionu 5'UTR genu *FMRI* w warunkach FXTAS mają negatywny wpływ na transkrypcję *FMRI*, co może być częściowo osłabione poprzez zastosowanie ASO-CCG. Jednakże w odniesieniu do warunków FXS, zastosowanie ASO-CCG nie prowadziło do reaktywacji transkrypcji *FMRI* w komórkach wyprowadzonych od pacjenta FXS, które charakteryzowały się całkowitym wyciszeniem *FMRI*. Natomiast traktowanie cząsteczkami ASO-CCG komórek pacjenta z FXS, które posiadały częściowo aktywne locus *FMRI*, prowadziło do wzmożenia transkrypcji *FMRI* oraz zwiększenia puli mRNA *FMRI* w cytoplazmie, co jednak nie spowodowało zwiększenia poziomu białka FMRP w tych komórkach.

Druga część projektu dotyczyła roli elementów regulatorowych *cis* zlokalizowanych w regionie 5'UTR *FMRI* w regulacji translacji toksycznego białka FMRpolyG inicjowanej z kodonów ACG lub GUG. Zbadano między innymi wpływ kontekstu sekwencji nukleotydowej w pobliżu jednego z kodonów start na translację białka FMRpolyG. Dodatkowo określono wpływ stabilnej struktury drugorzędowej RNA tworzonej przez sekwencje zlokalizowane poniżej kodonu start ACG oraz różnej długości powtórzeń CGG na efektywność translacji FMRpolyG. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno kontekst sekwencyjny, jak i stabilna struktura drugorzędowa tworzona w obrębie mRNA *FMRI* mają ogromny wpływ na inicjację translacji białka FMRpolyG, co sugeruje, że proces ten może być również regulowany przez wiele czynników *trans* wiążących się z regionami *cis* w obrębie sekwencji mRNA *FMRI*.