

Zuzanna Rogalska

Mail: zuzanna.rogalska@amu.edu.pl

Zakład Ekspresji Genów,
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w
Poznaniu

Określenie wpływu nieprawidłowości splicingu mRNA czynnika transkrypcyjnego NFIX na patomechanizm dystrofii miotonicznej oraz opracowanie narzędzia terapii genowej dla tej choroby

STRESZCZENIE

Dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1) jest dziedziczną, dominującą chorobą genetyczną, spowodowaną ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń CTG w genie *DMPK*. Nadmiernie wydłużone powtórzenia CUG (CUG^{exp}) w zmutowanym mRNA są toksycznym produktem zmutowanego genu. Zmutowany mRNA sekwestruje czynniki splicingowe takie jak MBNL, a następnie w wyniku funkcjonalnego niedoboru tych białek wywołuje globalne zmiany w alternatywnym splicingu w mięśniach szkieletowych, sercu i mózgu, czego efektem są objawy charakterystyczne dla DM1. Nieprawidłowości w alternatywnym splicingu są kluczową molekularną przyczyną rozwoju DM1. Profil alternatywny splicingu wielu genów zaangażowanych w homeostazę mięśni i ich prawidłowe funkcjonowanie jest istotnie zaburzony. Niemniej jednak, molekularne konsekwencje zaburzeń alternatywnego splicingu większości genów są nadal nieznanne.

Jednym z eksonów zależnych od MBNL, którego efektywność włączenia do mRNA w procesie splicingu jest istotnie podwyższona w mięśniach szkieletowych DM, jest ekson 7 *NFIX*, genu kodującego czynnik transkrypcyjny niezbędny do prawidłowego rozwoju mięśni. Pierwszym celem niniejszej pracy było lepsze zrozumienie patomechanizmu DM w kontekście zaburzeń splicingowych *NFIX* poprzez zrozumienie wpływu włączenia eksonu 7 na aktywność

transkrypcyjną NFIX. Aby odpowiedzieć na to pytanie, zastosowano dwa alternatywne podejścia. Pierwszym z nich było stworzenie dwóch stabilnych linii komórkowych z indukowalną nadekspresją izoform NFIX z eksonem 7 i bez eksonu 7 (NFIX+7 lub NFIX-7) w oparciu o komórki HEK z funkcjonalnym nokautem endogennego *NFIX* (*NFIX-KO*). Nieoczekiwane wyniki RNA-seq nie wykazały znaczących różnic w aktywności transkrypcyjnej tych dwóch izoform w stworzonych modelach komórkowych, być może z powodu niewłaściwego dopasowania poziomu ekspresji egzogenów (zbyt wysoki). Drugie podejście opierało się na manipulacji włączania eksonu 7 do endogennie eksprymowanego mRNA *NFIX* przy użyciu antysensownego oligonukleotydu (AON) nakierowanego na połączenie eksonu 7 z intronem 7. W ludzkich komórkach mięśni szkieletowych, w których dominuje izoforma NFIX+7, zastosowany AON indukował efektywne pomijanie eksonu 7 i produkcję głównie izoformy NFIX-7. Takie podejście umożliwiło wygenerowanie modelu komórkowego w kontekście środowiska, w którym NFIX jest naturalnie zaangażowany w proces prawidłowego rozwoju mięśni, ale także w patogenezę DM1. W tych komórkach ekspresja *NFIX* jest stosunkowo wysoka i jest regulowana przez natywny promotor. Wyniki eksperymentów RNA-seq ujawniły setki genów, których ekspresja uległa istotnym zmianom po traktowaniu AON, co sugeruje, że obie izoformy splicingowe - NFIX+7 i NFIX-7 - różnią się znacząco aktywnością transkrypcyjną. Analiza ontologii genów (GO) wykazała znaczne wzbogacenie klas genów, które są wrażliwe na te dwie izoformy NFIX, ale także zaobserwowano istotną zmianę ich ekspresji w mięśniach pacjentów z DM1. Wśród 5641 genów, których ekspresja jest znacząco zmieniona w tkankach DM1 ($P < 0,05$) zidentyfikowano 2070 genów, których ekspresja była znacząco zmieniona w komórkach mięśniowych poddanych działaniu AON zmieniającemu splicing NFIX. Głównymi terminami GO wzbogaconymi w obu porównaniach (w pierwszym – geny wrażliwe na poziom NFIX oraz na obecność jego izoform splicingowych, w drugim – geny wrażliwe na izoformy splicingowe

NFIX oraz zmienione w tkankach pacjentów DM1) były geny składników strukturalnych macierzy zewnątrzkomórkowej i geny białek wiążących się z kolagenami. Są to geny niezmiernie istotne dla prawidłowej budowy i aktywności mięśni szkieletowych, a zatem zaburzenie splicingu *NFIX* może stanowić istotny element patogenezy DM1. Podsumowując tę część pracy można stwierdzić, że nieprawidłowa dystrybucja eksonu 7 *NFIX* spowodowana sekwestracją białek MBNL na RNA ze zmutowanym CUG^{exp} wywołuje liczne zmiany ekspresji genów zachodzących w mięśniach szkieletowych, które to mogą być odpowiedzialne za kształtowanie fenotypu chorobowego obserwowanego u pacjentów z DM1.

DM jest chorobą nieuleczalną. Kiedy liczba powtórzeń osiąga wysoki poziom (od setek do tysięcy), występujące objawy kliniczne są cięższe oraz wzrasta wydajność sekwestracji zależnej od długości powtórzeń. Proponowane wcześniej strategie terapeutyczne prowadzące do podwyższenia poziomu MBNL1 za pomocą narzędzi terapii genowej wiążą się z występowaniem wielu niepożądanych konsekwencji. Długotrwała, niekontrolowana nadekspresja MBNL1 u myszy prowadzi bowiem do zmniejszenia masy ciała, zwiększonej śmiertelności i uszkodzenia mięśni, w tym mięśnia sercowego. Terapia genowa prowadząca do podwyższenia poziomu MBNL1 u pacjentów z DM1 wiąże się również z wieloma innymi ograniczeniami. Jednym z nich jest niejednorodność sekwestracji MBNL spowodowana mozaicyzmem somatycznym długości powtórzeń CTG w komórkach tego samego pacjenta oraz pomiędzy różnymi osobami ze zdiagnozowanym DM1. Aby sprostać tym ograniczeniom, zaprojektowałam i wygenerowałam autoregulowany konstrukt do nadekspresji *MBNL1*, który umożliwia produkcję białka MBNL1 dostosowaną do poziomu aktywnej puli endogennych białek MBNL w komórce. Ta strategia terapeutyczna daje więc możliwość przezwyciężenia ograniczeń wynikających z niejednorodności ekspansji powtórzeń CTG i w konsekwencji różnego stopnia niedoboru MBNL w różnych komórkach czy włóknach mięśniowych. Konstrukt ten zawiera sekwencję kodującą MBNL1 przedzieloną fragmentem pre-mRNA

ATP2A1 z alternatywnym eksonem wrażliwym na poziom MBNL, który zawiera kodon stop w ramce odczytu dla MBNL1. Włączenie tego eksonu prowadzi więc do tworzenia nieaktywnej, skróconej formy białka, natomiast jego wyłączenie, następujące przy niedoborze MBNL, powoduje wzrost produkcji w pełni aktywnej formy MBNL1. Takie podejście umożliwia ograniczoną i ściśle kontrolowaną nadekspresję *MBNL1*, w zależności od stopnia niedoboru białka, a zarazem może odpowiadać na niejednorodność długości powtórzeń CUG. Podsumowując tę część pracy można powiedzieć, że przeprowadzone badania wykazały, że nadekspresja MBNL1 ze stworzonego konstruktów genetycznych podlega autoregulacji i ma potencjał terapeutyczny prowadzący do korygowania nieprawidłowości alternatywnego splicingu, co wykazano dla komórek pochodzących od pacjentów z DM1.