

STRESZCZENIE

rozprawy doktorskiej zatytułowanej
„Identyfikacja nowych modyfikatorów niekanonicznej biosyntezy toksycznego białka poliglicynowego ze zmutowanego mRNA *FMR1*” autorstwa Katarzyny Tutak

Zespoły łamliwego chromosomu X obejmują choroby genetyczne wywołane mutacją dynamiczną w genie *FMR1* (ang. *Fragile X messenger ribonucleoprotein 1*), który koduje białko FMRP (ang. *Fragile X messenger ribonucleoprotein 1 protein*). U zdrowego człowieka, w sekwencji rejonu 5' niepodlegającemu translacji (5'UTR) genu *FMR1* znajduje się zwykle 25-35 powtórzeń trójki nukleotydowej CGG. Jednakże, długość tej sekwencji jest wysoce polimorficzna, a powtórzenia CGG mają tendencję do wydłużania, często znacznego. Proces ten nazywany jest ekspansją powtórzeń CGG. Gdy długość sekwencji powtórzeń mieści się między 55 a 200, stan ten nazywany jest premutacją genu *FMR1* i dotyczy tzw. stanów chorobowych związanych z premutacją w chromosomie X (ang. *fragile X-premutation-associated conditions*, FXPAC). Te stany obejmują m.in. neurodegeneracyjną chorobę wieku późnego zwaną zespołem drżenia i ataksji związanym z łamliwym chromosomem X (FXTAS) oraz zespół przedwczesnego wygasania funkcji jajników (FXPOI), prowadzący do przedwczesnej menopauzy. Stan, w którym liczba powtórzeń CGG przekracza 200 określa się mianem pełnej mutacji i stanowi on podłoże genetyczne zespołu łamliwego chromosomu X (FXS). FXS jest chorobą neurorozwojową, będąca najczęstszą przyczyną wrodzonego upośledzenia umysłowego, zwłaszcza u chłopców.

Z molekularnego punktu widzenia, w chorobach z grupy FXPAC, dochodzi do prawidłowej ekspresji białka FMRP, pomimo mutacji w genie *FMR1*, podczas gdy w FXS rejon promotorowi, zawierający ekspansję CGG, ulega hipermetylacji, prowadząc do wyciszenia genu i braku ekspresji FMRP. Uważa się, że rozwój chorób z grupy FXPAC jest efektem trzech niezależnych, wzajemnie przenikających się patomechanizmów molekularnych. Pierwszy z nich związany jest z toksycznością RNA zawierającego wydłużony ciąg powtórzeń CGG. Taki toksyczny RNA, w obrębie powtórzeń CGG tworzy strukturę drugorzędową typu spinka do włosów (ang. *hairpin*), na której mogą być sekwestrowane białka, co prowadzi do upośledzenia ich prawidłowych funkcji w komórce. Drugi mechanizm dotyczy kotranskrypcyjnego powstawania hybrydowych struktur typu pętla R (hybryda DNA:RNA), które prowadzą do akumulacji pęknięć w DNA, stwarzając zagrożenie dla utrzymania integralności genomu komórki. Trzecim mechanizmem jest niekanoniczna

biosynteza białka nazwana zależną od powtórzeń translacją niewymagającą kodonu inicjatorowego ATG (ang. *repeat-associated non-ATG translation*; RAN), w skrócie translacją RAN. Proces ten prowadzi do powstawania toksycznych białek zawierających ciągi monoaminokwasowe kodowane przez sekwencję powtórzeń CGG, które mają tendencję do agregacji. Białka te składają się z powtózonego ciągu aminokwasów jednego rodzaju, np. glicyny (kodon GGC), tworząc tzw. białka poliglicynowe (FMRpolyG). Białko FMRpolyG gromadzi się w postaci złogów wewnątrzjądrowych w komórkach pacjentów, stanowiąc istotny element patogenezy FXPAC, poprzez zwiększenie śmiertelności komórek.

Ponieważ dokładny mechanizm translacji RAN nie jest jeszcze w pełni zrozumiały, celem niniejszej pracy doktorskiej było poszukiwanie nowych modyfikatorów tego procesu. W ramach projektu zastosowano system znakowania cząsteczek RNA zawierających 99 powtórzeń CGG w 5'UTR *FMR1*, oraz identyfikację białek, które związały się z badanym transkryptem w komórkach, za pomocą spektrometrii mas. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano ponad 60 białek, które w warunkach natywnych wiążą się do rejonu 5'UTR RNA *FMR1* zawierającego powtórzenia CGG. Analiza ontologii genów wykazała, że większość zidentyfikowanych białek należy do klasy białek wiążących RNA oraz tych, które uczestniczą w procesach związanych z biogenezą rybosomu, translacją oraz procesowaniem cząsteczki mRNA. Niektóre z zidentyfikowanych białek znajdują potwierdzenie w literaturze na temat interaktomu RNA *FMR1*, a zastosowane w tej pracy technologie pozwoliło na identyfikację szeregu nowych białek podlegających interakcji z badanym RNA.

Spośród zidentyfikowanych białek wybrano dziesięciu kandydatów i przetestowano ich zdolność do regulacji procesu translacji RAN, wykorzystując technikę wyciszania genów z zastosowaniem krótkich interferujących RNA. Wyciszenie kilku z tych białek obniżyło poziom toksycznego białka FMRpolyG. Na przykład, wyciszenie białka rybosomalnego eS26 małej podjednostki 40S rybosomu (ang. *small ribosomal subunit protein eS26*; RPS26), które ze względu na lokalizację w pobliżu kanału mRNA kontaktuje się podczas translacji lub skaningu z tymi RNA, spowodowało zmniejszenie ilości białka poliglicynowego w kilku niezależnych modelach komórkowych. Dodatkowo, niedobór dwóch helikaz RNA, DHX15 (ang. *ATP-dependent RNA helicase DHX15*) oraz DDX21 (ang. *Nucleolar RNA helicase 2*), a także czynnika transportującego ALYREF (ang. *THO complex subunit 4*) negatywnie wpłynęły na biosyntezę białka FMRpolyG. Co istotne, wyciszenie tych białek nie miało wpływu

na poziom białka FMRP, wskazując zdolności do specyficznej regulacji otwartej ramki odczytu białka FMRpolyG. Ponadto, wyciszenie RPS26 doprowadziło do ograniczenia tworzenia się złogów białkowych, powodując częściowe zniesienie toksyczności białek poliglicynowych w modelu komórkowym. Dodatkowo, ilościowa analiza proteomu komórek linii HEK293 po wyciszeniu RPS26 ujawniła, że tylko niewielka liczba białek jest wrażliwa na niedobór RPS26. Analiza transkryptów kodujących te białka wykazała wzbogacenie nukleotydów guaninowych i cytozynowych w rejonie 5' UTR, co sugeruje podobieństwo biochemiczne tych transkryptów do mRNA *FMR1*.

W celu lepszego zrozumienia mechanizmu translacji RAN, zweryfikowano także funkcję czynnika TSR2 – białka opiekuńczego RPS26 (ang. *Pre-rRNA-processing protein TSR2 homolog*). Wykazano, że TSR2 pozytywnie wpływa na proces biosyntezy FMRpolyG. Ponadto, wykazano, że inne białko małej podjednostki rybosomu, RPS25 (ang. *Small ribosomal subunit protein eS25*) również reguluje proces translacji RAN białka FMRpolyG.

Podsumowując, przeprowadzone badanie przesiewowe w oparciu o analizę proteomiczną, pozwoliło zidentyfikować pulę białek oddziałujących ze zmutowanym *FMR1* zawierającym ciąg powtórzeń CGG, co stanowi cenne źródło wiedzy na temat biologii tej cząsteczki RNA. Głównym osiągnięciem pracy doktorskiej jest identyfikacja pięciu nowych modulatorów translacji RAN oraz propozycja koncepcji, zgodnie z którą skład małej podjednostki rybosomu odgrywa istotną rolę w regulacji niekanonicznej syntezy białka poliglicynowego – czynnika patogenetycznego w zespołach chorobowych związanych z premutacją genu *FMR1*.