

**Autoreferat przedstawiający opis
dorobku i osiągnięć naukowych**

dr Patryk Konieczny

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Instytut Antropologii
Zakład Genomiki Zintegrowanej**

Poznań 2019

1. Imię i nazwisko: Patryk Konieczny

dr Patryk Konieczny
Zakład Genomiki Zintegrowanej
Instytut Antropologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań
Tel. 61 829 5836
e-mail: patryk.konieczny@amu.edu.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

doktor nauk biologicznych (dr.rer.nat.)

30.11.2007; Uniwersytet Wiedeński, Wiedeń, Austria

Tytuł rozprawy doktorskiej:

“The role of plectin isoforms in maintenance and pathology of myofibers”

Promotor: Prof. Dr. Gerhard Wiche (Uniwersytet Wiedeński, Zakład Biochemii i Biologii Komórki, Dr.-Bohr-Gasse 9, 1030 Wiedeń, Austria)

Recenzenci: Prof. Dr. Vic Small (Instytut Biotechnologii Molekularnej, Dr. Bohr-Gasse 3, Wiedeń, Austria) oraz Prof. Dr. Roland Foissner (Uniwersytet Wiedeński, Dr. Bohr-Gasse 9, 1030, Wiedeń, Austria)

magister inżynier biotechnologii

29.05.2002; Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Tytuł pracy magisterskiej:

“Investigation into microsatellites and hereditary retinal dystrophy of the briard dog”

Promotor: Prof. dr hab. Marek Świtoński (Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt)

magister psychologii

06.11.2018; Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Tytuł pracy magisterskiej:

“Korekcyjne doświadczenie emocjonalne jako determinanta zmiany systemu przywiązania”

Promotor: Prof. zw. dr hab. Lidia Cierpiałkowska (Zakład Psychologii Zdrowia i Psychologii Klinicznej)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Adiunkt

październik 2018 – obecnie; Zakład Genomiki Zintegrowanej, Instytut Antropologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Post-doc

listopad 2011 – wrzesień 2018; Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

grudzień 2007 – listopad 2011; Uniwersytet Waszyngtona, Seattle, USA

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

“Patomechanizm i aspekty terapeutyczne zaburzeń nerwowo-mięśniowych”

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

(1) Derbis, M.*, **P. Konieczny***, A. Walczak, M. Sekrecki, and K. Sobczak. 2018. Quantitative evaluation of toxic polyglycine biosynthesis and aggregation in cell models expressing expanded CGG repeats. *Front. Genet.* doi:10.3389/fgene.2018.00216.

(* równy współudział autorów; IF 2017 = 4.2; 9 pkt MNiSW)

(2) **Konieczny, P.**, E. Stepniak-Konieczna, and K. Sobczak. 2018. MBNL expression in autoregulatory feedback loops. *RNA Biol.* doi:10.1080/15476286.2017.1384119.

(ilość cytowań = 2; IF 2017 = 5.2; 35 pkt MNiSW)

(3) **Konieczny, P.**, E. Stepniak-Konieczna, K. Taylor, L.J. Sznajder, and K. Sobczak. 2017. Autoregulation of MBNL1 function by exon 1 exclusion from MBNL1 transcript. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkw1158.

(ilość cytowań = 4; IF 2017 = 11.6; 40 pkt MNiSW)

(4) **Konieczny, P.**, E. Stepniak-Konieczna, and K. Sobczak. 2014. MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gku767.

(ilość cytowań = 47; IF 2014 = 9.1; 40 pkt MNiSW)

(5) Arnett, A.L.*, **P. Konieczny***, J.N. Ramos*, J. Hall, G. Odom, Z. Yablonka-Reuveni, J.R. Chamberlain, and J.S. Chamberlain. 2014. Adeno-associated viral vectors do not efficiently target muscle satellite cells. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* doi:10.1038/mtm.2014.38.

(* równy współudział autorów; ilość cytowań = 25; IF 2017 = 3.7; brak informacji odnośnie MNiSW)

c) omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Moim głównym osiągnięciem naukowym jest cykl pięciu publikacji, które powstały na przestrzeni ostatnich lat, podczas mojej pracy na stanowisku post-doktoranckim na Uniwersytecie Waszyngtona w Seattle oraz na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Podczas tego okresu, moja praca naukowa dotyczyła przede wszystkim zagadnienia patomechanizmu oraz terapii różnych chorób nerwowo-mięśniowych, między innymi dystrofii mięśniowej Duchenna (DMD; Mendell and Lloyd-Puryear, 2013; Konieczny et al., 2013), dystrofii miotonicznej (DM; Konieczny et al., 2016), oraz zespołu drżenia i ataksji związanego z łamliwym chromosomem X (fragile-X associated tremor/ataxia syndrome, FXTAS; Hagerman and Hagerman, 2016). Choroby te, pomimo różnej etiologii, łączy zaburzenie funkcjonowania układu mięśniowego, które w sposób dewastujący niszczy życie pacjentów. Tak jak w przypadku pozostałych chorób nerwowo-mięśniowych, zaburzenia te powstają na skutek uszkodzenia bądź braku komórek znajdujących się na szlaku mózg – mięśnie, czyli komórek mózgowych, motoneuronów doprowadzających sygnał z mózgu do rdzenia kręgowego i rdzenia kręgowego do mięśni, bądź też bezpośrednio we włóknach mięśniowych. W chorobach DMD oraz DM patomechanizm dotyczy głównie włókienek mięśniowych, choć są to choroby wielosystemowe, w których obserwuje się także dysfunkcję neuronów (Perronnet and Vaillend, 2010; Charizanis et al., 2012), czy komórek macierzystych mięśni, tzw. komórek satelitarnych (Dumont and Rudnicki, 2016). Z kolei, w przypadku FXTAS, głównym czynnikiem zakłócającym funkcjonowanie układu mięśniowego jest degeneracja komórek mózgowych (Adams et al., 2007).

Działania terapeutyczne skierowane na przeciwdziałanie zaburzeniom nerwowo-mięśniowym można podzielić na takie, które mają na celu (1) zmianę informacji genetycznej zapisanej w genomie, (2) korektę lub degradację transkryptów mRNA, oraz (3) modyfikację bądź też usunięcie toksycznych peptydów i białek. W przypadku pierwszego podejścia, można wyróżnić działania naprawcze przy użyciu endonukleaz (np. systemu CRISPR/CAS9) oraz różnego rodzaju wektorów wirusowych, dzięki którym można dostarczyć sekwencję prawidłową, której organizm pacjenta nie posiada (Nelson et al., 2017; Muir and Chamberlain, 2009). Działania na poziomie RNA obejmuje z kolei dostarczanie antysensownych oligonukleotydów czy związków niskocząsteczkowych, które po przyłączeniu do transkryptów, będą mogły bądź indukować wpięcie/wypięcie określonych eksonów, zablokowanie przyłączenia białek wiążących się do danych sekwencji RNA, lub też

indukować degradację mRNA poprzez uruchamianie RNAzy H (Konieczny et al., 2016). Natomiast działania na poziomie białka mogą mieć na celu zmianę konformacyjną i usunięcie toksycznych, zagregowanych peptydów (Ciechanover and Kwon, 2017).

Zarówno DMD, DM oraz FXTAS są chorobami genetycznymi, powstającymi na skutek zmiany informacji genetycznej. Jednakże w przypadku DM cząsteczkami, które powodują toksyczność i na których skupia się większość działań terapeutycznych są mRNA *DMPK* i *CNBP*, zawierające powtórzenia sekwestrując białka splicingowe MBNL. Uwolnienie białek MBNL z toksycznego mRNA jest priorytetem większości działań terapeutycznych w DM (Konieczny et al., 2014). W przypadku FXTAS, czynnikiem toksycznym jest z kolei białko poliglicynowe, które powstaje na bazie mRNA *FMR1* zawierającego powtórzenia CGG (Glineburg et al., 2018). Tutaj działania skierowane są przede wszystkim na usunięciu zagregowanego białka inicjującego degenerację neuronów (Derbis et al., 2018). Natomiast w DMD, to brak białka – dystrofiny, jest czynnikiem patogennym. Główne działania terapeutyczne są skierowane zatem na jego przywrócenie poprzez zmianę zmutowanej lub dostarczenie prawidłowej sekwencji DNA lub ingerencję w składanie i odczytywanie mRNA dystrofiny przez rybosomy, najczęściej w celu przywrócenia prawidłowej ramki odczytu i translacji funkcjonalnego białka (Konieczny et al., 2013). Inne strategie skupione są między innymi na zwiększeniu ekspresji innych białek o efekcie terapeutycznym, na przykład paralogu dystrofiny – utrofiny (Guiraud and Davies, 2017; Kennedy et al., 2018), czy różnego rodzaju działań zmierzających do zmiany transdukcji sygnału we włókienkach mięśniowych lub komórek satelitarnych, w których brak dystrofiny zaburza asymetrię podziału komórkowego i tym samym regenerację mięśniową (Dumont and Rudnicki, 2016).

Zafascynowany możliwościami terapii genowej, po 4,5 roku spędzonych na Uniwersytecie Wiedeńskim i pracy nad aspektem dystrofii mięśniowej asocjującej z pęcherzykowym oddzielaniem się naskórka (epidermolysis bullosa simplex associated with muscular dystrophy, EBS-MD), wyjechałem do Seattle, aby objąć pozycję post-doktorancką na Uniwersytecie Waszyngtona w laboratorium kierowanym przez profesora Jeffreya Chamberlaina. Laboratorium to zasłynęło między innymi z terapeutycznego użycia wektorów opartych o cząsteczki wirusów związanych z adenowirusami o serotypie 6 (recombinant adeno-associated viral vectors serotype 6, rAAV6). rAAV6 cechuje wysoki tropizm w kierunku transdukcji mięśni szkieletowych oraz tkanki sercowej. Co ważne, przy użyciu jednej iniekcji dożylniej można wprowadzić rAAV6 do krwioobiegu myszy i dostarczyć

terapeutyczne białko do włókienek mięśniowych w całym organizmie (Gregorevic et al., 2006, 2004). Wektory te nie ulegają integracji z genomem gospodarza, utrzymują się natomiast w jądrze komórkowym w postaci episomalnej. Ogranicza to do minimum możliwość mutagenezy integracyjnej, mogącej być podłożem nowotworzenia. Aspektem negatywnym wszystkich wektorów rAAV jest jednak dość ograniczona możliwość przyjęcia „obcej sekwencji”. Z tego powodu, DNA dystrofiny jest odpowiednio inżynierowane, aby sekwencje miały informację niezbędną do produkcji niezbędnych domen nadających dystrofynie odpowiedni kształt oraz wchodzących w interakcje z kluczowymi białkami (Chamberlain and Chamberlain, 2017).

Jednym z pytań, na które chciałem wówczas odpowiedzieć dotyczyło tego, w którym stadium regeneracji mięśniowej można dostarczyć wektory rAAV6. Jest to o tyle ważne, że degeneracja włókienek mięśniowych jest procesem, które dotyka wszystkich, także osoby zdrowe. Można przewidzieć zatem, że jakkolwiek efektywne, dostarczenie terapeutycznego białka tylko i wyłącznie do dojrzałych włókienek nie będzie procesem dożywotnym. Pod wpływem degeneracji, komórki satelitarne ulegają aktywacji, dzielą się oraz różnicują do mioblastów oraz miocytów, które następnie ulegają fuzji tworząc włókienka mięśniowe (Le Grand and Rudnicki, 2007). Początkowo, włókienka mięśniowe posiadają centralnie zlokalizowane jądra komórkowe, które z czasem, w trakcie różnicowania, przesuwane są w kierunku błony komórkowej. Aby odpowiedzieć na wyżej wymienione pytanie, rozpocząłem współpracę z profesorem Ziporą Yablonką-Reuveni, dzięki pomocy której rozwinąłem w laboratorium profesora Jeffreya Chamberlaina metodę izolacji włókienek mięśniowych z wyizolowanych mięśni [zobacz także (Keire et al., 2013)]. Metoda ta polega na trawieniu enzymatycznym i mechanicznym rozdzielaniu włókienek mięśniowych, a następnie przenoszeniu ich do odpowiednio przygotowanych dołków wypełnionych medium. Na każdym włókienku znajduje się kilka komórek satelitarnych, które po pewnym czasie migrują, dzielą się oraz różnicują i ulegają fuzji tworząc setki nowych włókienek. Kolejną z metod, którą użyłem aby odpowiedzieć na pytanie dotyczące stadium efektywnej transdukcji wektorem rAAV6 podczas powstawania i dojrzewania włókienek mięśniowych, była metoda degeneracji i regeneracji mięśnia *extensor digitorum longus* (EDL) *in vivo* przy użyciu noteksyny. Noteksyna niszczy włókienka mięśniowe zachowując przy tym funkcjonalność komórek satelitarnych, dzięki czemu dochodzi do synchronicznej regeneracji włókienek mięśniowych (Hardy et al., 2016).

W początkowych eksperymentach, do mięśni myszy dostarczona została noteksyna, a następnie w różnych punktach czasowych (2, 3, 4, oraz 5 dni po dostarczeniu noteksyny)

wektor rAAV6 zawierający sekwencję białka reporterowego - fosfatazy alkalicznej (Arnett et al., 2014). Po dwóch tygodniach mięśnie EDL zostały pobrane i wybarwione w celu ujawnienia efektywności transdukcji wektorem w różnych punktach czasowych regeneracji mięśniowej. Dodatkowo, został przeprowadzony RT-qPCR ze starterami specyficznymi dla sekwencji rAAV6. Badania te wykazały, że późniejsze dostarczenie wektora po inicjacji regeneracji powoduje lepszą transdukcję mięśni, co sugerowało, że komórki satelitarne i mioblasty nie podlegają efektywnej transdukcji wektorem, bądź też, że mogą one ulec transdukcji, ale w trakcie podziałów komórkowych episomalny, nieintegrujący genom rAAV6 ulega utracie. W dalszych eksperymentach, użyłem myszy, w której białko GFP ulega ekspresji z promotora nestyny, aktywnego w mięśniach tylko w komórkach satelitarnych. Pozwoliło to na specyficzne wyróżnienie tej grupy komórek po izolacji włókienek mięśniowych po domięśniowym dostarczeniu rAAV6 zawierającym sekwencję kodującą białko fluorescencyjne mCherry. Badanie wykazało, że z wyizolowanych włókienek mięśniowych wybarwionych na czerwono, czyli ekspresujących mCherry, migrowały komórki wybarwione jedynie na zielono. Dodatkowo, analiza RT-qPCR wykazała znikomą ilość genomów wirusowych w komórkach satelitarnych w porównaniu do całych mięśni po iniekcji domięśniowej cząsteczek rAAV. Sugerowało to, że w przeciwieństwie do włókienek mięśniowych, komórki satelitarne nie przyjmują efektywnie wektora wirusowego o serotypie 6.

Podsumowując, w pracy Arnett et al. (2014) **wykazaliśmy po raz pierwszy, że komórki satelitarne oraz mioblastyczne nie przyjmują wydajnie wektorów wirusowych rAAV6, w kontraście do dobrze transdukowalnych dojrzałych włókienek mięśniowych.** Stanowi to dość istotne ograniczenie wartości tej metody terapeutycznej w przypadku dystrofii mięśniowych, między innymi DMD. Warte jest jednak podkreślenie, że wektory te (1) bardzo efektywnie transdukują włókienka mięśniowe oraz kardiomiocyty, a także, że (2) są one relatywnie bezpieczne w porównaniu do innych wektorów wirusowych, z uwagi na stosunkowo rzadką integrację z genomem gospodarza i utrzymywanie się w jądrze komórkowym w postaci episomów. Ogranicza to do minimum prawdopodobieństwo insercyjnej mutagenazy. Warto przy tym także wspomnieć, że po pojedynczej iniekcji wektora rAAV, sygnał we włókienkach mięśniowych obserwuje się przez co najmniej 7 lat u ludzi (Colella et al., 2018).

W kolejnej odsłonie swojej kariery naukowej, zainteresowałem się terapią chorób nerwowo-mięśniowych na poziomie RNA. Pod wpływem inspirującego wykładu profesora

Charlesa Thorntona na konferencji w Neapolu, zdecydowałem się skierować w kierunku dystrofii miotonicznej oraz dołączyć do ówczesznie nowozakładanej grupy prof. dr hab. Krzysztofa Sobczaka na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, skupionej między innymi na wykorzystaniu metody sekwencjonowania wysokoprzepustowego do poznania targetów mRNA, których składanie jest zaburzone poprzez sekwestracje białka MBNL na mRNA *DMPK* i *CNBP*, jak również na terapii eksperymentalnej z wykorzystaniem oligonukleotydów antysensownych, blokujących przyłączanie się białek MBNL do sekwencji powtórzonych.

W początkowych badaniach wykazałem, że MBNL1 jest dominującym białkiem z rodziny białek MBNL w mięśniach szkieletowych, i że jego ilość mRNA znacząco rośnie podczas różnicowania, co ma znaczący wpływ na zmianę regulacji splicingu alternatywnych eksonów (Konieczny et al., 2014). U pacjentów DM, patomechanizm wynika po części z tego, że pomimo dojrzewania organizmu, targety splicingowe MBNL pozostają „zamrożone” na stadium rozwoju płodowego i powstałe białka nie są dostosowane do pełnienia swoich funkcji w dorosłym organizmie. Dzieje się to w wyniku sekwestracji białek MBNL na mRNA *DMPK* i *CNBP* zawierających odpowiednio patologicznie zwiększoną ilość powtórzeń CUG i CCUG. Dodatkowo, na podstawie badań literaturowych wykazałem, że białka MBNL łączą się do targetów mRNA na bazie motywu YGCY i że efekt jaki wywierają na alternatywne eksony jest zależny od pozycji wiązania się względem regulowanego eksonu [zobacz także (Wang et al., 2012)].

Kolejna publikacja dotyczyła autoregulacji białka MBNL1. Głębokie sekwencjonowanie cząsteczek RNA usieciowanych z immunoprecypitowanymi cząstkami białka (cross-linked immunoprecipitation and sequencing, CLIP-seq) ujawniło, że MBNL1 wiąże się z eksonem 1 *MBNL1* kodującym zarówno część 5'UTR, jak i region końca aminowego białka MBNL1 (Konieczny et al., 2017). Sugerowało to autoregulację funkcji bądź też poziomu białka MBNL1 na bazie negatywnego sprzężenia zwrotnego opartego o wykluczanie eksonu 1 z dojrzałego mRNA. Istotnie, uzyskane dane z tkanek pacjentów, modelu mysiego DM oraz linii komórkowych nadeksprymowanych białkami MBNL, siRNA skierowanymi na *MBNL* oraz minigenem zawierającym sekwencje eksonu 1 wykazały, że wiązanie się MBNL indukuje blokowanie włączania eksonu 1 do dojrzałego mRNA *MBNL1*. Warto tutaj nadmienić, że wykorzystanie sztucznego systemu minigenowego pozwoliło na wykazanie, że obserwowany efekt jest determinowany przez przyłączanie się MBNL do eksonu 1, a nie innych sekwencji wiążących białko MBNL w transkrypcie. W dalszej części sprawdziłem efekt wyłączenia eksonu 1 transkryptu *MBNL1* na proces translacji oraz

funkcjonalność białka. Przygotowane przeze mnie konstrukty oraz eksperymenty lucyferazowe wykazały obniżoną efektywność translacyjną mRNA pozbawionego eksonu 1, co jest prawdopodobnie wynikiem koncentracji zubożonego o ekson 1 transkryptu we frakcji cytozolowej pozbawionej polisomów. Dalej wykazałem, że brak eksonu 1 zaburza stabilność białka, drastycznie zmniejszając jego ilość. Z kolei, gdy białko jest stabilizowane za pomocą EGFP, forma ta jest znacząco bardziej mniej funkcjonalna, co pokazuję w porównaniu do pełnej długości białka, na przykładzie kilku alternatywnych eksonów regulowanych przez MBNL. Niższa aktywność białka pozbawionego sekwencji kodującej ekson 1 jest przypuszczalnie wynikiem utraty pierwszych dwóch palcy cynkowych, które są istotne w rozpoznawaniu motywu YGCY w targetach RNA (Konieczny et al., 2014; Teplova and Patel, 2008).

Jednym z najbardziej zaskakujących wyników przytoczonej pracy było to, że wykluczenie eksonu 1 ujemnie korelowało z malejącą odległością miejsca rozpoczęcia transkrypcji *MBNL1*. Z trzech odkrytych miejsc (T1, T2, T3), autoregulacyjna kontrola wyłączania eksonu 1 zachodziła tylko ze środkowego regionu (T2), który jest najczęściej używanym miejscem startu transkrypcji w większości tkanek. Przede wszystkim jednak miejsce to jest wyraźnie dominującym regionem startu transkrypcji w mięśniach szkieletowych. W przypadku powstałych cząsteczek mRNA *MBNL1* z T1 i T3, ekson 1 był odpowiednio zawsze wycinany i zawsze włączany do dojrzałego transkryptu, niezależnie od poziomu MBNL. Wyniki te wpisują się zatem w inne badania pokazujące, że długość intronów flankujących jest kluczowym czynnikiem mającym wpływ na alternatywny splicing eksonów [zobacz także (Fox-Walsh et al., 2005; Roy et al., 2008)].

W kolejnej publikacji skupiłem się na autoregulacyjnych pętlach białek MBNL i ich wykorzystaniu w kompensacyjnych działaniach komórki, jak i przyszłych działaniach terapeutycznych (Konieczny et al., 2018). Pętla oparta o włączanie i wyłączanie eksonu 1 w *MBNL1* jest uruchamiana przez wszystkie białka z rodziny MBNL. W przypadku dużego stężenia MBNL, komórka broni się przed jego dużą ilością i tym samym prawdopodobnie toksycznością wyłączając ekson 1 w transkryptach i prowadząc do zmniejszenia jego ilości. Dla przykładu, w mięśniu sercowym i szkieletowym osób dorosłych, charakteryzujących się wysoką zawartością mRNA *MBNL1* (Konieczny et al., 2014), zaobserwowałem podwyższone ilości mRNA *MBNL1* bez eksonu 1. W DM, przy braku funkcjonalnego białka, następuje proces odwrotny - ekson 1 jest włączany, co prowadzi do produkcji dużej ilości w pełni funkcjonalnego białka. Stanowi to kompensacyjną próbę komórki zapobiegania rozwijającemu się procesowi patologicznemu. Co ważne, wiedza dotycząca fluktuacji

poziomu ekspresji MBNL1 w zależności od początku inicjacji transkrypcji może zaoferować strategię terapeutyczną przeciwko DM. Autoregulacyjna nadekspresja MBNL1 z T2 umożliwia bowiem samoregulację poziomu komórkowego MBNL i tym samym przeciwdziałanie toksyczności wywołanej nadmiernemu stężeniu i nieprawidłowej regulacji targetów mRNA.

W pracy tej, pętlę opartą o regulację eksonu 1, zestawiam również z wynikami, które uzyskałem dla pozostałych autoregulowanych eksonów MBNL. W szczególności, równie ważną dla funkcji MBNL wydaje się być pętla oparta o wycinanie eksonu 5 w *MBNL1* i *MBNL2*. Pod wpływem dużego stężenia MBNL, ekson 5, odpowiadający za lokalizację jądrową, jest negatywnie regulowany w obu paralogach. W DM, podobnie jak w przypadku eksonu 1, ekson 5 jest preferencyjnie wstawiany do transkryptów MBNL. Ma to na celu zwiększenie poziomu MBNL w jądrze komórkowym, w którym zachodzi splicing eksonów alternatywnych zależnych od MBNL. Dodatkowo, w artykule tym dowodzę, że pętłe kompensacyjne obejmują także wzajemną regulację ilości MBNL1 i MBNL2, a także że białka MBNL wraz z innymi białkami regulującymi splicing tworzą skomplikowaną, powiązaną sieć czynników regulujących formowanie się i funkcję transkryptomu, w odpowiedzi na warunki komórkowe i stadium rozwoju organizmu (Wang et al., 2015; Bondy-Chorney et al., 2016; Klinck et al., 2014).

Podsumowując, **w badaniach dotyczących autoregulacji białek MBNL wykazałem, że białka MBNL regulują poziom MBNL1 poprzez interakcję z eksonem 1.** Mechanizm ten stanowi część sieci regulacyjnej różnych czynników splicingowych i ich targetów stanowiącym o ostatecznej informacji determinującej powstawanie białek. **Wysoka zawartość komórkowa MBNL indukuje powstawanie mRNA *MBNL1* pozbawionego e1, który ulega translacji z niższą wydajnością, a ponadto wygenerowane białko jest niestabilne i dysfunkcyjne. Proces odwrotny ma miejsce, gdy poziom funkcjonalnych MBNL jest niski, jak w DM (Wang et al., 2012; Terenzi and Ladd, 2010), gdzie generowany jest wysoce funkcjonalny MBNL1 o pełnej długości. Wykazałem również, że MBNL1 może być transkrybowany z trzech różnych promotorów/miejsc startu transkrypcji i że miejsce inicjacji transkrypcji określa sposób regulacji eksonu 1. Wyniki te otwierają nowe możliwości terapii przeciwko DM, polegającej na manipulowaniu miejscem inicjacji transkrypcji i autoregulacji komórkowego poziomu MBNL1 przez włączanie i wyłączanie eksonu 1.** Jak dotąd niewiele wiadomo o czynnikach transkrypcyjnych, które kierują ekspresją MBNL, chociaż MEF2 został wskazany jako

potencjalny czynnik mogący wpływać na regulację transkrypcji *MBNL1* (Bargiela et al., 2014).

Natępnie, w mojej pracy badawczej skupiłem się na patomechanizmie oraz aspektach terapeutycznych FXTAS, choroby rozwijającej się pod wpływem ekspansji trinukleotydów CGG w genie *FMR1* kodującym FMRP. Pacjenci z liczbą powtórzeń w przedziale od 55 do 200, charakteryzują się specyficzną manifestacją objawów klinicznych obejmujących drżenie, ataksję, deficyty poznawcze i zanik mózgu (Hagerman and Hagerman, 2016). Akumulacja toksycznej poliglicyny (FMRpolyG), produktu ubocznego translacji z regionu zawierającego powtórzenia CGG, jest uważane za jeden z głównych czynników wyzwalających procesy neurodegeneracyjne u pacjentów z FXTAS (Glineburg et al., 2018). Zakłócenie biosyntezy, stabilności lub zdolności do agregacji toksycznego FMRpolyG można uznać za potencjalne targety strategii terapeutycznych skierowanych przeciwko FXTAS. W pracy Derbis et al. (2018) przetestowaliśmy różne metody do ilościowego pomiaru FMRpolyG oraz białek reporterowych ulegających translacji z ramki odczytu FMRP w oparciu o ekspresję z konstruktów zawierających toksyczne powtórzenia CGG w kontekście fragmentu 5'UTR genu *FMR1*. Sekwencja kodująca FMRpolyG została połączona z genem GFP, mCherry lub lucyferazy Firefly, co umożliwiło łatwą wizualizację FMRpolyG za pomocą technik mikroskopowych oraz metody lucyferazowej. Podobnie, poziom FMRP został oszacowany poprzez umieszczenie genów reporterowych w ramce odczytu natywnego FMRP. Pomiar FMRP jest o tyle ważny, że ubytek tego białka w chorobie łamliwego chromosomu X (fragile X syndrome, FXS) powoduje wczesnorozwojowe zaburzenia u chłopców charakteryzujące się między innymi chorobą autystyczną i upośledzeniem umysłowym (Lozano et al., 2016).

Moje badania wykazały, że poziom i agregację białka fuzyjnego FMRpolyG z EGFP i lucyferazą Firefly oraz lucyferazę w ramce odczytu FMRP można skutecznie oszacować za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i testu lucyferazowego w trakcie kilkudniowego eksperymentu w komórkach COS7 po uprzedniej transfekcji odpowiednimi konstruktami. Wykorzystałem również siRNA targetujący mRNA lucyferazy firefly, ujawniając profil ubytku białka reporterowego w czasie po podaniu siRNA w różnych punktach czasowych po dostarczeniu plazmidów. Co ciekawe, badania te wykazały, że w zależności od przyłączonego znacznika, FMRpolyG ma inny potencjał do tworzenia agregatów. Wyniki te zainspirowały nas do stworzenia konstruktów kodujących niefuzyjne białko FMRpolyG i porównanie jego agregacji do białek znakowanych przy udziale przeciwciał.

Podsumowując, opublikowane protokoły umożliwiają na ilościową i jakościową wizualizację FMRpolyG i FMRP w czasie. Metody te wyróżnia szybkość i łatwość zastosowania, co pozwala na wykorzystanie ich w testowaniu i selekcji terapeutyków przed użyciem bardziej wymagających analiz w modelach zwierzęcych FXTAS. Ponadto, po odpowiedniej modyfikacji, metody te mogą być wykorzystane do projektowania i testowania terapii eksperymentalnych innych chorób związanych z translacją i agregacją toksycznych białek.

Wyżej przytoczone rezultaty zawierają syntezę moich najważniejszych badań z ostatnich kilku lat, obejmujących działania mające na celu poznanie patomechanizmu i zaprojektowanie i przetestowanie różnorodnych metod przeciwdziałającym rozwojowi chorób nerwowo-mięśniowych. Badania terapeutyczne obejmowały między innymi metody oparte o wykorzystanie wektorów wirusowych rAAV, siRNA skierowanych na mRNA kodujące reporterowe/toksyczne białko, czy też badania wykazujące w jaki sposób można wykorzystać pętle autoregulacyjne w celu zaprojektowania skutecznej i nietoksycznej terapii. Pomimo że zarówno DMD, DM i FXTAS są chorobami na ten czas nieuleczalnymi, to wierzę, że wyżej przytoczone wyniki badań nie tylko poszerzyły naszą wiedzę, ale przyczynią się w niedalekiej przyszłości do stworzenia skutecznych terapeutyków.

Literatura dodatkowa (do punktu 4)

- Adams, J.S., P.E. Adams, D. Nguyen, J.A. Brunberg, F. Tassone, W. Zhang, K. Koldewyn, S.M. Rivera, J. Grigsby, L. Zhang, C. DeCarli, P.J. Hagerman, and R.J. Hagerman. 2007. Volumetric brain changes in females with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology*. doi:10.1212/01.wnl.0000269781.10417.7b.
- Arnett, A.L., **P. Konieczny**, J.N. Ramos, J. Hall, G. Odom, Z. Yablonka-Reuveni, J.R. Chamberlain, and J.S. Chamberlain. 2014. Adeno-associated viral vectors do not efficiently target muscle satellite cells. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* doi:10.1038/mtm.2014.38.
- Bargiela, A., B. Llamusi, E. Cerro-Herreros, and R. Artero. 2014. Two enhancers control transcription of *Drosophila* muscleblind in the embryonic somatic musculature and in the central nervous system. *PLoS One*. 9:e93125. doi:10.1371/journal.pone.0093125.
- Bondy-Chorney, E., T.E. Crawford Parks, A. Ravel-Chapuis, R. Klinck, L. Rocheleau, M. Pelchat, B. Chabot, B.J. Jasmin, and J. Côté. 2016. Stauf1 Regulates Multiple Alternative Splicing Events either Positively or Negatively in DM1 Indicating Its Role as a Disease Modifier. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1005827.
- Chamberlain, J.R., and J.S. Chamberlain. 2017. Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* 25:1125–1131. doi:10.1016/j.ymthe.2017.02.019.
- Charizanis, K., K.-Y. Lee, R. Batra, M. Goodwin, C. Zhang, Y. Yuan, L. Shiue, M. Cline, M. Scotti, G. Xia, A. Kumar, T. Ashizawa, H. Clark, T. Kimura, M. Takahashi, H.

- Fujimura, K. Jinnai, H. Yoshikawa, M. Gomes-Pereira, G. Gourdon, N. Sakai, S. Nishino, T. Foster, M. Ares, R. Darnell, and M. Swanson. 2012. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron*. 75:437–450. doi:10.1016/j.neuron.2012.05.029.
- Ciechanover, A., and Y.T. Kwon. 2017. Protein quality control by molecular chaperones in neurodegeneration. *Front. Neurosci.* doi:10.3389/fnins.2017.00185.
- Colella, P., G. Ronzitti, and F. Mingozzi. 2018. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* doi:10.1016/j.omtm.2017.11.007.
- Derbis, M., **P. Konieczny**, A. Walczak, M. Sekrecki, and K. Sobczak. 2018. Quantitative evaluation of toxic polyglycine biosynthesis and aggregation in cell models expressing expanded CGG repeats. *Front. Genet.* doi:10.3389/fgene.2018.00216.
- Dumont, N.A., and M.A. Rudnicki. 2016. Targeting muscle stem cell intrinsic defects to treat Duchenne muscular dystrophy. *npj Regen. Med.* doi:10.1038/npjregenmed.2016.6.
- Fox-Walsh, K.L., Y. Dou, B.J. Lam, S. -p. Hung, P.F. Baldi, and K.J. Hertel. 2005. The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.0508489102.
- Glineburg, M.R., P.K. Todd, N. Charlet-Berguerand, and C. Sellier. 2018. Repeat-associated non-AUG (RAN) translation and other molecular mechanisms in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Brain Res.* doi:10.1016/j.brainres.2018.02.006.
- Le Grand, F., and M.A. Rudnicki. 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* doi:10.1016/j.ceb.2007.09.012.
- Gregorevic, P., J.M. Allen, E. Minami, M.J. Blankinship, M. Haraguchi, L. Meuse, E. Finn, M.E. Adams, S.C. Froehner, C.E. Murry, and J.S. Chamberlain. 2006. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med.* 12:787–789. doi:10.1038/nm1439.
- Gregorevic, P., M.J. Blankinship, J.M. Allen, R.W. Crawford, L. Meuse, D.G. Miller, D.W. Russell, and J.S. Chamberlain. 2004. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med.* 10:828–834. doi:10.1038/nm1085.
- Guiraud, S., and K.E. Davies. 2017. Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Pharmacol.* doi:10.1016/j.coph.2017.04.002.
- Hagerman, R.J., and P. Hagerman. 2016. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome-features, mechanisms and management. *Nat. Rev. Neurol.* doi:10.1038/nrneurol.2016.82.
- Hardy, D., A. Besnard, M. Latil, G. Jouvion, D. Briand, C. Thépenier, Q. Pascal, A. Guguin, B. Gayraud-Morel, J.M. Cavaillon, S. Tajbakhsh, P. Rocheteau, and F. Chrétien. 2016. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0147198.
- Keire, P., A. Shearer, G. Shefer, and Z. Yablonka-Reuveni. 2013. Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells. *Methods Mol. Biol.* doi:10.1007/978-1-62703-128-8-28.
- Kennedy, T.L., S. Guiraud, B. Edwards, S. Squire, L. Moir, A. Babbs, G. Odom, D. Golebiowski, J. Schneider, J.S. Chamberlain, and K.E. Davies. 2018. Micro-utrophin Improves Cardiac and Skeletal Muscle Function of Severely Affected D2/mdx Mice. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 11:92–105. doi:10.1016/j.omtm.2018.10.005.
- Klinck, R., A. Fourrier, P. Thibault, J. Toutant, M. Durand, E. Lapointe, M.L. Caillet-Boudin, N. Sergeant, G. Gourdon, G. Meola, D. Furling, J. Puymirat, and B. Chabot. 2014. RBFOX1 cooperates with MBNL1 to control splicing in muscle, including events altered in myotonic dystrophy type 1. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0107324.
- Konieczny, P.**, E. Stepniak-Konieczna, and K. Sobczak. 2014. MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gku767.

- Konieczny, P., E. Stepniak-Konieczna, and K. Sobczak.** 2016. Modified Antisense Oligonucleotides and Their Analogs in Therapy of Neuromuscular Diseases.
- Konieczny, P., E. Stepniak-Konieczna, and K. Sobczak.** 2018. MBNL expression in autoregulatory feedback loops. *RNA Biol.* doi:10.1080/15476286.2017.1384119.
- Konieczny, P., E. Stepniak-Konieczna, K. Taylor, L.J. Sznajder, and K. Sobczak.** 2017. Autoregulation of MBNL1 function by exon 1 exclusion from MBNL1 transcript. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkw1158.
- Konieczny, P., K. Swiderski, and J.S. Chamberlain.** 2013. Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle and Nerve.* doi:10.1002/mus.23738.
- Lozano, R., A. Azarang, T. Wilaisakditipakorn, and R.J. Hagerman. 2016. Fragile X syndrome: A review of clinical management. *Intractable Rare Dis. Res.* doi:10.5582/irdr.2016.01048.
- Mendell, J.R., and M. Lloyd-Puryear. 2013. Report Of MDA Muscle Disease Symposium On Newborn Screening For Duchenne Muscular Dystrophy. *Muscle and Nerve.* doi:10.1002/mus.23810.
- Muir, L.A., and J.S. Chamberlain. 2009. Emerging strategies for cell and gene therapy of the muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med.* 11:e18. doi:10.1017/S1462399409001100.
- Nelson, C.E., J.N. Robinson-Hamm, and C.A. Gersbach. 2017. Genome engineering: a new approach to gene therapy for neuromuscular disorders. *Nat Rev Neurol.* 13:647–661. doi:10.1038/nrneurol.2017.126.
- Perronnet, C., and C. Vaillend. 2010. Dystrophins, Utrophins, and Associated Scaffolding Complexes: Role in Mammalian Brain and Implications for Therapeutic Strategies. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2010/849426.
- Roy, M., N. Kim, Y. Xing, and C. Lee. 2008. The effect of intron length on exon creation ratios during the evolution of mammalian genomes. *RNA.* doi:10.1261/rna.1024908.
- Teplova, M., and D. Patel. 2008. Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:1343–1351. doi:10.1038/nsmb.1519.
- Terenzi, F., and A. Ladd. 2010. Conserved developmental alternative splicing of muscleblind-like (MBNL) transcripts regulates MBNL localization and activity. *RNA Biol.* 7:43–55.
- Wang, E., N. Cody, S. Jog, M. Biancolella, T. Wang, D. Treacy, S. Luo, G. Schroth, D. Housman, S. Reddy, E. Lécuyer, and C. Burge. 2012. Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell.* 150:710–724. doi:10.1016/j.cell.2012.06.041.
- Wang, E.T., A.J. Ward, J.M. Cherone, J. Giudice, T.T. Wang, D.J. Treacy, N.J. Lambert, P. Freese, T. Saxena, T.A. Cooper, and C.B. Burge. 2015. Antagonistic regulation of mRNA expression and splicing by CELF and MBNL proteins. *Genome Res.* doi:10.1101/gr.184390.114.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Pozostałe badania opublikowane z doświadczeń prowadzonych po okresie doktoratu

- (6) Sznajder, L.J., M. Michalak, K. Taylor, P. Cywoniuk, M. Kabza, A. Wojtkowiak-Szlachcic, M. Matłoka, **P. Konieczny**, and K. Sobczak. 2016. Mechanistic determinants of MBNL activity. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkw915.
- (7) **Konieczny, P., E. Stepniak-Konieczna, and K. Sobczak.** 2016. Modified Antisense Oligonucleotides and Their Analogs in Therapy of Neuromuscular Diseases. In: Jurga S, Erdmann VA, Barciszewski J (eds) *Rna Technol.* Cham: Springer International Publishing,

(8) **Konieczny, P.***, K. Swiderski*, and J.S. Chamberlain. 2013. Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*. doi:10.1002/mus.23738.

(* równy współudział autorów)

(9) Ng, R., G. Banks, J. Hall, L. Muir, J. Ramos, J. Wicki, G. Odom, **P. Konieczny**, J. Seto, J. Chamberlain, and J. Chamberlain. 2012. Animal models of muscular dystrophy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 105:83–111. doi:10.1016/b978-0-12-394596-9.00004-4.

Wyżej wymienione publikacje stanowią uzupełnienie badań zawartych w części głównej osiągnięcia naukowego. Lista ta zawiera jedną publikację oryginalną oraz trzy badania przeglądowe. Wszystkie artykuły obejmują tematykę chorób nerwowo-mięśniowych. W przypadku dwóch z czterech prac jestem pierwszym autorem, w tym w jednej autorem o równym współudziale w pracy. Artykuły przeglądowe dotyczą zastosowania modeli zwierzęcych w poznaniu patomechanizmu i terapii dystrofii mięśniowych oraz różnego rodzaju metod terapeutycznych w przypadku DMD i innych chorób nerwowo-mięśniowych. Opisane są między innymi terapie z wykorzystaniem wektorów wirusowych, antysensownych oligonukleotydów i związków niskocząsteczkowych oraz formy terapii oparte o dostarczanie domięśniowe i systemowe komórek macierzystych. Dane zawarte w publikacji oryginalnej stanowią z kolei pozostałe wyniki dotyczące izoformów MBNL1 niezawarte w pracach stanowiących główne osiągnięcie naukowe.

Publikacja Ng et al. (2012) dotyczy **zwierzęcych modeli dystrofii mięśniowych, heterogennej grupy dziedzicznych zaburzeń, które w różnym stopniu zaburzają funkcjonowanie mięśni szkieletowych, serca, a czasem także mięśni gładkich** (Emery, 2011). Do tej pory opisano ponad 50 różnych genów powodujących jeden lub więcej typów dystrofii mięśniowej. W wielu przypadkach to właśnie zwierzęce modele stanowią nieodzowne narzędzie umożliwiające poznanie mechanizmu choroby oraz opracowanie interwencji terapeutycznych. W pracy tej skupiliśmy się między innymi na opisanu modeli zwierzęcych wykorzystywanych w badaniach DMD, DM, dystrofii twarzowo-łopatkowo ramieniowej (facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD), dystrofiach mięśniowych powodowanych przez mutacje w genach kodujących α -aktyninę, desminę, lamininę $\alpha 2$, kolagen 6 oraz białka, których funkcjonalny brak powoduje różnego typu dystrofie kończynowo-obręczowe (limb-girdle muscular dystrophies, LGMD). Do tych ostatnich zalicza się mutacje w genach kodujących między innymi białka sarkoglikanowe, dysferlinę, kalpainę 3, titinę i fukutynę. Moim udziałem w badaniu był opis modeli zwierzęcych

wykorzystywanych w badaniach LGMD2A, choroby powodowanej przez mutacje w genie kalpajny 3. Modele mysie w tym przypadku pozwoliły między innymi na wykazanie, że kalpaina 3 uczestniczy w przebudowie sarkomerów przez promowanie ubikwitynacji ligandów (Krameroва et al., 2005), jak również tego, że myszy z niedoborem kalpajny 3 cechuje zmniejszone uwalnianie wapnia we włókienkach mięśniowych z powodu zaburzeń w kompleksie białkowym związanym z triadą, struktury formowanej przez kanalik T oraz retikulum sarkoplazmatyczne (Krameroва et al., 2008).

W kolejnej publikacji (Konieczny et al., 2013) skupiliśmy się na **przeglądzie metod terapeutycznych w DMD. Badanie zostało podzielone na dwie główne części, opisie terapii z wykorzystaniem wektorów wirusowych, oraz pozostałych form terapii, do których wykorzystuje się między innymi oligonukleotydy i komórki macierzyste.** W przypadku wektorów wirusowych, najbardziej znaczące są tutaj formy terapii oparte o integrujące z genomem gospodarza wektory lentiwirusowe, które często wykorzystuje się do transdukcji proliferujących komórek *ex vivo* i korekcji zmutowanego genu, jak i nieintegrujące wektory rAAV, dzięki którym można dostarczyć terapeutyczne białka do włókienek mięśniowych i innych komórek *in vivo*. Metody terapeutyczne w DMD oparte o oligonukleotydy służą między innymi do zmiany splicingu eksonów w celu przywrócenia prawidłowej ramki odczytu, edycji genomu w przypadku pojedynczych mutacji, a także zamaskowaniu przedwczesnych kodonów stop i odczytaniu dalszych sekwencji na zmutowanym mRNA przez rybosom. Metody oparte o dostarczanie komórek do organizmu można z kolei podzielić na domięśniowe iniekcje komórek satelitarnych i mioblastów oraz systemową administrację komórek szpiku, komórek progenitorowych CD133+, mezoangioblastów, czy indukowanych komórek pluripotentnych, mających możliwość do różnicowania do komórek mięśniowych.

Modyfikowane oligonukleotydy antysensowne w terapii chorób nerwowo-mięśniowych były z kolei głównym tematem kolejnego artykułu przeglądowego (Konieczny et al., 2016). Opisałem tutaj różnego rodzaju modyfikacje, które wpływają na zwiększenie stabilności, czy odporności na nukleazy. Także, w zależności od budowy i modyfikacji chemicznej, oligonukleotydy mogą promować degradację targetów poprzez aktywację Rnazy H lub blokować miejsce wiązania dla innych cząsteczek bez indukcji degradacji. W kolejnych rozdziałach **opisałem różnego rodzaju modyfikowane antysensowne oligonukleotydy wykorzystywane w blokowaniu włączania eksonów w terapii eksperymentalnej DMD**

badź promowaniu włączania eksonu 7 w mRNA *SMN2* w rdzeniowym zaniku mięśni [spinal muscular atrophy, SMA (Hamilton and Gillingwater, 2013)]. Z kolei, **w przypadku choroby Huntingtona** (Kumar et al., 2015) skupilem się na opisanu analogów kwasów nukleinowych indukujących specyficzną degradację zmutowanego transkryptu poprzez **przyłączanie się do regionów polimorficznych** (single nucleotide polymorphism sites, SNPs) **sprzężonych z powtórzeniami CAG lub inhibicji translacji toksycznego białka** za pomocą zmodyfikowanych oligonukleotydów przyłączających w dużych ilościach się do fragmentów RNA zawierających zwiększoną liczbę powtórzeń.

Praca oryginalna, której jestem współautorem (Sznajder et al., 2016), poddaje szczegółowej analizie funkcjonalność różnych izoform białek MBNL1, 2 i 3. Wyniki badań sugerują, że pomimo preferencyjnego wiązania się do tego samego motywu RNA, białka te z różną efektywnością wpływają na splicing alternatywnych eksonów. Co więcej, paralogi MBNL także w różny sposób wchodzi w interakcje z toksycznymi powtórzeniami CUG, co może zostać użyte do ulepszenia strategii terapeutycznych skierowanych przeciwko DM. Moim wkładem w prace są dane uzyskane z wysokoprzepustowego sekwencjonowania targetów izoform MBNL1 40, 41 oraz 43 uzyskanych za pomocą metody CLIP-seq (Darnell, 2010). Do przygotowanych przez mnie konstruktów dodałem znacznik FLAG, w celu immunoprecypitacji kompleksów białko/RNA z przeciwciałem skierowany przeciwko FLAG. Izoformy 40 oraz 41 różnią się między innymi od izoformy 43 obecnością eksonu 5 determinującego lokalizację jądrową białka. **Zgodnie z przewidywaną lokalizacją poszczególnych izoform, uzyskane dane pokazują zwiększoną ilość odczytów intronowych dla białka MBNL1 43 w stosunku do pozostałych badanych izoform, które z kolei z większą preferencją wiązały się do sekwencji kodujących białko oraz regionów zawartych we fragmentach 3'UTR.**

Badania opublikowane z doświadczeń prowadzonych w okresie doktoratu i pracy magisterskiej

(10) Steiner-Champlaud, M.F., Y. Schneider, B. Favre, F. Paulhe, S. Praetzel-Wunder, G. Faulkner, **P. Konieczny**, M. Raith, G. Wiche, A. Adebola, R.K. Liem, L. Langbein, A. Sonnenberg, L. Fontao, and L. Borradori. 2010. BPAG1 isoform-b: Complex distribution pattern in striated and heart muscle and association with plectin and α -actinin. *Exp. Cell Res.* doi:10.1016/j.yexcr.2009.11.010.

(11) **Konieczny, P.**, P. Fuchs, S. Reipert, W.S. Kunz, A. Zeöld, I. Fischer, D. Paulin, R. Schröder, and G. Wiche. 2008. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-

disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J. Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.200711058.

(12) Reznicek, G.A., **P. Konieczny**, B. Nikolic, S. Reipert, D. Schneller, C. Abrahamsberg, K.E. Davies, S.J. Winder, and G. Wiche. 2007. Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with β -dystroglycan. *J. Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.200604179.

(13) **Konieczny, P.**, and G. Wiche. 2008. Muscular integrity-a matter of interlinking distinct structures via plectin. *Adv. Exp. Med. Biol.* doi:10.1007/978-0-387-84847-1_12.

(14) Switonski M., **Konieczny P.**, Klukowska J., Janyga B., G. Aguirre. Mikrodelecja w genie RPE65 wywołująca dziedziczną dystrofię siatkówki w polskiej populacji psów rasy briard. *Medycyna Weterynaryjna* 2002; 58, 946-949 A

Wyniki, które uzyskałem na Uniwersytecie Wiedeńskim w ramach realizacji pracy doktorskiej zaowocowały powstaniem czterech prac, trzech oryginalnych oraz jednej przeglądowej. Wszystkie one dotyczą roli plektyny - białka cytoszkieletowego wiążącego filamenty pośrednie, w patomechanizmie dystrofii mięśniowej sprzężonej z pęcherzykowym oddzielaniem się naskórka (EBS-MD) (Winter and Wiche, 2013). W przypadku dwóch z wyżej wymienionych prac jestem pierwszym autorem. Badania te zainspirowały mnie do wyjazdu do Stanów Zjednoczonych i kontynuacji pracy w obszarze dystrofii mięśniowych i chorób nerwowo-mięśniowych w laboratorium profesora Jeffreya Chamberlaina.

W pracy Reznicek et al. (2007) pokazujemy odmienną lokalizację izoform plektyny eksprymowanych w mięśniach w znaczących ilościach - 1, 1b, 1f, oraz 1d. Na podstawie wizualizacji za pomocą przeciwciał i konstruktyw tagowanych GFP wykazujemy, że izoformy 1 oraz 1f znajdują się na sarkolemmie. Z kolei, izoforma 1d lokalizuje specyficznie do dysków Z. Co ważne, nasze badania ujawniły, że plektyna we włóknach mięśniowych wiąże się z dystrofina, utrofina oraz β -dystroglikanem, kluczowymi białkami membranowego kompleksu dystrofina(utrofina)-glikoproteinowego (Le Rumeur et al., 2010). Na podstawie uzyskanych wyników, proponujemy, że plektyna działa jako białko kotwiczące filamenty desminowe do sarkolemmy. **Jedną z ważniejszych moich kontrybucji w trakcie powstawania tej pracy było rozwinięcie metody polegającej na utrwaleniu włókienek mięśniowych *in vivo*, dzięki czemu stało się możliwe precyzyjne określenie organizacji podmembranowych struktur białkowych [kostamerów (Ervasti, 2003)] w mięśniach za pomocą przeciwciał. Metoda ta umożliwiła między innymi na ujawnienie preferencyjnej lokalizacji plektyny w kostamerach myszy pozbawionej dystrofiny.**

Moim głównym zadaniem podczas pracy doktorskiej była analiza patomechanizmu włókienek mięśniowych myszy, w której gen plektyny był kondycyjalnie wycięty we włókienkach mięśniowych i kardiomiocytach, z uwagi na wczesną śmiertelność myszy, w której wyciszenie nastąpiło we wszystkich tkankach (Andrä et al., 1997). **Analizy ujawniły postępującą dystrofię mięśni szkieletowych, cechującą się oddzielaniem się sarkolemmy od wnętrza włókienek mięśniowych oraz nekrozą i regeneracją włókienek mięśniowych** (Konieczny et al., 2008). **Dalsze badania ujawniły agregację pośrednich filamentów desminowych oraz dezorganizację aparatu kurczliwego we włókienkach mięśniowych i kardiomiocytach. Towarzyszyła temu także zmieniona lokalizacja i proporcja białek membranowych, w tym dystrofiny oraz β -dystroglikanu, a także zaburzona lokalizacja i funkcjonowanie białek kompleksu oddechowego i mitochondriów. Dodatkowe badania obejmujące analizę myszy z delecją poszczególnych izoformów plektyny, wykazały oddzielanie się sarkolemmy oraz zaburzoną lokalizację mitochondriów i białek membranowych w myszy pozbawionej izoformy 1d.**

Na podstawie wyżej wymienionych dwóch prac zaproponowałem model, w którym różne izoformy plektyny wiążą się z jednej strony z pośrednimi filamentami desminowymi, a z drugiej kotwiczą je do różnego rodzaju struktur we włókienkach mięśniowych – izoforma 1d do dysków Z, 1b do mitochondriów, 1 do jąder komórkowych i 1f do kompleksów transmembranowych (Konieczny and Wiche, 2008). Organizacja taka skutkuje zależnością organizacji filamentów pośrednich od prawidłowej lokalizacji białek plektyny zarówno we włókienkach mięśniowych, jak i kardiomiocytach. Dodatkowo, skupiając się na wzajemnej organizacji izoform plektyny, kompleksów transmembranowych oraz filamentów pośrednich, przedstawiam i porównuję modele organizacji białek w komórkach mięśniowych myszy dzikich, oraz pozbawionych odpowiednio plektyny, desminy i dystrofiny. **Dyskutuję również na temat roli plektyny w organizacji trzech różnych typów transmembranowych kompleksów białkowych, dystofino-dystroglikanowego, opartego o integryny, a także spektryny.**

Ostatnia publikacja z cyklu prac obejmujących dane uzyskane podczas pobytu na Uniwersytecie Wiedeńskim, dotyczy asocjacji izoformy 1b białka BPAG, jego lokalizacji w mięśniach szkieletowych oraz asocjacji z plektyną i α -aktyniną (Steiner-Champlaud et al., 2010). Co ciekawe, izoforma BPAG 1b, podobnie do plektyny, jest białkiem ctyoszkietowym lokalizującym do dysków Z i odpowiedzialnym za utrzymanie architektury

i utrzymanie integralności włókienek mięśniowych i kardiomiocytów. **W pracy tej wykazałem redukcję ilości białka BPAG 1b we wnętrzu włókienek mięśniowych myszy pozbawionej plectyny za pomocą przeciwciał. Lokalizacja membranowa białka BPAG 1b była z kolei niezmienną.**

Powyżej przedstawiłem krótki opis 13 z 14 publikacji dotyczących patomechanizmu i aspektów terapeutycznych chorób nerwowo-mięśniowych, które opublikowałem na przestrzeni swojej dotychczasowej kariery naukowej. Ich liczba cytowań bez autocytowań wynosi 348. Jestem pierwszym autorem dziewięciu z przytoczonych artykułów, w tym pierwszym współautorem trzech z nich. Według bazy Web of Science mój współczynnik *h* wynosi obecnie dziewięć.

Literatura dodatkowa (do punktu 5)

- Andrä, K., H. Lassmann, R. Bittner, S. Shorny, R. Fässler, F. Propst, and G. Wiche. 1997. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.11.23.3143.
- Darnell, R.B. 2010. HITS-CLIP: Panoramic views of protein-RNA regulation in living cells. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* doi:10.1002/wrna.31.
- Emery, A.E.H. 2011. Fortnightly review: The muscular dystrophies. *BMJ.* doi:10.1136/bmj.317.7164.991.
- Ervasti, J.M. 2003. Costameres: the Achilles' Heel of Herculean Muscle. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.R200021200.
- Hamilton, G., and T.H. Gillingwater. 2013. Spinal muscular atrophy: Going beyond the motor neuron. *Trends Mol. Med.* doi:10.1016/j.molmed.2012.11.002.
- Konieczny, P.,** P. Fuchs, S. Reipert, W.S. Kunz, A. Zeöld, I. Fischer, D. Paulin, R. Schröder, and G. Wiche. 2008. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J. Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.200711058.
- Konieczny, P.,** E. Stepniak-Konieczna, and K. Sobczak. 2016. Modified Antisense Oligonucleotides and Their Analogs in Therapy of Neuromuscular Diseases. In: Jurga S, Erdmann VA, Barciszewski J (eds) *Rna Technol.* Cham: Springer International Publishing, 2016:243–71. doi:10.1007/978-3-319-34175-0_11.
- Konieczny, P.,** K. Swiderski, and J.S. Chamberlain. 2013. Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle and Nerve.* doi:10.1002/mus.23738.
- Konieczny, P.,** and G. Wiche. 2008. Muscular integrity-a matter of interlinking distinct structures via plectin. *Adv. Exp. Med. Biol.* doi:10.1007/978-0-387-84847-1_12.
- Kramerova, I., E. Kudryashova, G. Venkatraman, and M.J. Spencer. 2005. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin - Proteasome pathway. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddi217.
- Kramerova, I., E. Kudryashova, B. Wu, C. Ottenheijm, H. Granzier, and M.J. Spencer. 2008. Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddn223.
- Kumar, A., S. Kumar Singh, V. Kumar, D. Kumar, S. Agarwal, and M.K. Rana. 2015.

- Huntington's disease: An update of therapeutic strategies. *Gene*. doi:10.1016/j.gene.2014.11.022.
- Ng, R., G. Banks, J. Hall, L. Muir, J. Ramos, J. Wicki, G. Odom, **P. Konieczny**, J. Seto, J. Chamberlain, and J. Chamberlain. 2012. Animal models of muscular dystrophy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 105:83–111. doi:10.1016/b978-0-12-394596-9.00004-4.
- Rezniczek, G.A., **P. Konieczny**, B. Nikolic, S. Reipert, D. Schneller, C. Abrahamsberg, K.E. Davies, S.J. Winder, and G. Wiche. 2007. Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic (mdx) muscle fibers through multiple interactions with β -dystroglycan. *J. Cell Biol.* doi:10.1083/jcb.200604179.
- Le Rumeur, E., S.J. Winder, and J.F. Hubert. 2010. Dystrophin: More than just the sum of its parts. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. doi:10.1016/j.bbapap.2010.05.001.
- Steiner-Champlaud, M.F., Y. Schneider, B. Favre, F. Paulhe, S. Praetzel-Wunder, G. Faulkner, **P. Konieczny**, M. Raith, G. Wiche, A. Adebola, R.K. Liem, L. Langbein, A. Sonnenberg, L. Fontao, and L. Borradori. 2010. BPAG1 isoform-b: Complex distribution pattern in striated and heart muscle and association with plectin and α -actinin. *Exp. Cell Res.* doi:10.1016/j.yexcr.2009.11.010.
- Sznajder, L.J., M. Michalak, K. Taylor, P. Cywoniuk, M. Kabza, A. Wojtkowiak-Szlachcic, M. Matłoka, **P. Konieczny**, and K. Sobczak. 2016. Mechanistic determinants of MBNL activity. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkw915.
- Winter, L., and G. Wiche. 2013. The many faces of plectin and plectinopathies: Pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* doi:10.1007/s00401-012-1026-0.

Patryk Konieczny