

Opracowanie allelo-selektywnej strategii terapeutycznej dla chorób poliglutaminowych z wykorzystaniem wektorowych narzędzi technologii interferencji RNA

mgr inż. Anna Kotowska-Zimmer

Streszczenie

Choroby poliglutaminowe (poliQ) są grupą genetycznych chorób neurodegeneracyjnych, których wspólną cechą jest występowanie mutacji polegającej na ekspansji powtórzeń CAG w określonych genach. Mutacja ta prowadzi do powstania toksycznego białka z wydłużonym ciągiem poliglutaminowym. Do grupy chorób poliQ zaliczamy chorobę Huntingtona (HD), ataksje rdzeniowo-mózdzkowe typu 1, 2, 3, 6, 7 i 17 (SCAs), zanik zębatoczerwienny pallidoniskowzgórzowy (DRPLA) oraz rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA). W zależności od choroby, dochodzi do degeneracji neuronów w różnych regionach mózgu, a co za tym idzie do wystąpienia różnorodnych objawów neurologicznych, jak i emocjonalnych, które pojawiają się najczęściej w czwartej dekadzie życia. Na wystąpienie choroby wpływa liczba powtórzeń CAG w określonym genie, która różni się w przypadku każdej z chorób, np. dla HD jest to >40 powtórzeń CAG, natomiast dla SCA3 >60. Niestety, mimo wielu lat badań nad skuteczną terapią, choroby te są w dalszym ciągu nieuleczalne, a łagodzone są jedynie ich objawy. Jedną z bardziej obiecujących strategii terapeutycznych, mających na celu ograniczenie rozwoju choroby, jest technologia interferencji RNA (RNAi). Wyniki licznych eksperymentów *in vitro*, jak i *in vivo*, potwierdziły skuteczność stosowania narzędzi tej technologii, takich jak siRNA (ang. *small interfering RNA*), shRNA (ang. *short-hairpin RNA*) i amiRNA (ang. *artificial miRNA*) w wyciszaniu ekspresji zmutowanych genów.

W związku z tym, głównym celem mojej pracy doktorskiej był rozwój strategii terapeutycznej, polegającej na selektywnym wyciszaniu ekspresji zmutowanych genów, odpowiedzialnych za rozwój chorób poliQ, przy pomocy wektorowych narzędzi technologii RNAi, celujących w powtórzenia CAG.

W pierwszym etapie badań zaprojektowałam serię cząsteczek typu shRNA ze wstawionymi sekwencjami siRNA celującymi w powtórzenia CAG i posiadającymi niesparowania

w określonych pozycjach z sekwencją docelową, co umożliwiło działanie allelo-selektywne na drodze inhibicji translacji.

Ich efektywność oraz allelo-selektywność sprawdziłam w komórkowych modelach chorób poliQ, takich jak HD, SCA3, SCA7 i DRPLA. Wykazałam, że cząsteczki te są precyzyjnie docinane w komórkach, powodują specyficzne obniżenie poziomu zmutowanych białek i nie wywołują istotnych efektów niespecyficznych w liniach komórkowych. Ze względu na to, że doniesienia literaturowe pokazują, że cząsteczki shRNA mogą być toksyczne w zastosowaniu *in vivo*, w kolejnych etapach prac podjęłam się zgłębienia i analizy wiedzy dotyczącej cząsteczek amiRNA oraz zaprojektowania i przetestowania własnych cząsteczek tego typu. W pracy przeglądowej, której jestem głównym autorem, zebrana została najbardziej aktualna wiedza dotycząca biogenezy miRNA, cech strukturalnych i sekwencyjnych cząsteczek pri-miRNA wpływających na ich obróbkę komórkową, a także zasady projektowania cząsteczek amiRNA i wykorzystane tego typu narzędzi w potencjalnych terapiach chorób neurodegeneracyjnych, nowotworowych i wirusowych. Zdobyta wiedza pozwoliła mi na zaprojektowanie cząsteczek amiRNA, mających obniżyć poziom zmutowanej HTT w linii komórkowej fibroblastów HD. Cząsteczka działająca najbardziej efektywnie i selektywnie posiadała tę samą wstawkę siRNA, co działający najefektywniej shRNA, czyli posiadający substytucję A w 8 pozycji od końca 5' cząsteczki. Wstawiona była w kadłub pri-miR-136, który wykazuje homogenną obróbkę komórkową. Obie cząsteczki, shRNA jak i amiRNA, zostały przeze mnie przetestowane w mysim modelu HD, YAC128. Wykazałam, że obie cząsteczki powodują efektywne i allelo-selektywne obniżenie poziomu zmutowanej HTT. Potwierdziłam również, że cząsteczki shRNA mogą powodować wystąpienie efektów toksyczności u myszy. Działanie cząsteczki amiRNA nie spowodowało wystąpienia tego typu efektów. Barwienia immunofluorescencyjne skrawków mózgu myszy nie wykazały aktywacji mikrogleju i astrocytów po iniekcji wektora AAV5 niosącego amiRNA. Ponadto cząsteczka ta spowodowała zmniejszenie ilości agregatów HTT w prążkowie myszy. Zaobserwowana została także częściowa poprawa fenotypu u tych zwierząt.

Podsumowując, zaprojektowane przeze mnie cząsteczki shRNA i amiRNA, celujące w powtórzenia CAG, efektywnie i allelo-selektywnie obniżają poziom zmutowanych białek poliQ. Ponadto działanie cząsteczki amiRNA, w porównaniu do shRNA jest bezpieczne w organizmie myszy i prowadzi do poprawy fenotypu chorych zwierząt.