

Wykorzystanie katalitycznych kwasów nukleinowych do regulacji ekspresji genów mitochondrialnych.

mgr inż. Paweł Mariusz Głodowicz

Streszczenie

Informacja genetyczna w komórce eukariotycznych zawarta jest w sekwencji genomu jądrowego oraz w DNA organelli, takich jak mitochondria u zwierząt czy chloroplasty i mitochondria u roślin. Od prawidłowego funkcjonowania metabolicznych i sygnałowych szlaków łączących pomiędzy organellami i jądrem zależy homeostaza komórkowa. Mitochondria są niezbędne dla przeżycia komórki, jej aktywności, oddziaływania ze środowiskiem, odpowiedzi na stres, adaptacji czy tolerancji na czynniki środowiska. Ponadto są one również zaangażowane w procesy starzenia oraz odgrywają kluczową rolę w procesach programowanej śmierci komórki, apoptozy i nekrozy. Duża część białek mitochondrialnych kodowana jest przez genom jądrowy, a następnie importowana do mitochondriom po translacji zachodzącej w cytozolu. Dotyczy to również kilku specyficznych RNA.

Mitochondria wykazują swoistą autonomię w związku z czym wciąż skonstruowanie i skuteczne zastosowanie metod interwencji w ich program genetyczny jest niezwykle trudne.

Rozwój metod wprowadzania nowego materiału genetycznego do poszczególnych kompartmentów komórkowych stał się podstawą do projektowania strategii transformacji mitochondriów przy zastosowaniu różnych markerów selekcyjnych. Pomimo wielu prób, system transformacji genetycznej mitochondrialnego DNA stworzono tylko dla dwóch organizmów jednokomórkowych (drożdże i glony *Chlamydomonas reinhardtii*). Nadal wielkim wyzwaniem pozostaje poszukiwanie skutecznych strategii dostarczania DNA i RNA do mitochondriów *in vitro* lub w systemie komórkowym. Transfekcja mitochondriów oraz poznanie genetyki tych organelli pozostaje w nurcie nowatorskich badań podstawowych, a także aplikacyjnych w kontekście terapii chorób o podłożu mitochondrialnym.

W związku z powyższym poszukiwanie i opracowywanie nowych strategii mających na celu dostarczenie katalitycznych RNA lub oligonukleotydów antysensowych do mitochondriów może być przełomem w badaniach genomów mitochondrialnych. Opracowanie i zbadanie takiej strategii stało się głównym celem badawczym niniejszej pracy doktorskiej.

W pierwszej jej części wykorzystano opracowany w naszym laboratorium system dostarczania cząsteczek aktywnych katalitycznie z wykorzystaniem struktur podobnych do

tRNA (ang. *tRNA-like*) do modyfikacji genomu mitochondrialnego w komórkach roślinnych. Jako sekwencje docelowe wybrano geny, których funkcja w roślinach nie była dotychczas w pełni znana (matR oraz mttB). Jako aktywną sekwencję pasażerską w systemie roślinnym wykorzystano katalityczne kwasy nukleinowe (rybozomy typu *hammerhead*) oraz sekwencje antysensowych oligonukleotydów. Uzyskane w toku realizacji pracy wyniki potwierdziły skuteczność opracowanej metody w obniżaniu ekspresji docelowych genów mitochondrialnych. Ponadto po zastosowaniu zbudowanego konstrukt w badaniach funkcjonalnych potwierdzono zaangażowanie genu matR w proces składania genów mitochondrialnych należących do intronów grupy II.

W drugiej części pracy podjęto próbę adaptacji opracowanego w modelu roślinnym systemu do modyfikacji ekspresji ludzkiego genomu mitochondrialnego. W tym podejściu wytypowano dwie sekwencje podobne do tRNA oraz wykazano ich zdolność do przechodzenia przez podwójną błonę mitochondriów komórek ludzkich w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Wykorzystując tę możliwość, skonstruowano wektor zawierający jako sekwencję pasażerską aktywną katalitycznie cząsteczkę w postaci rybozomu. Potwierdzono potencjał transportowy konstrukt oraz efektywne obniżenia poziomu ekspresji genów mitochondrialnych. Nie obserwowano jednocześnie efektów niespecyficznych i cytotoksycznych w badanych liniach komórkowych.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że zaprojektowany i zmodyfikowany w ramach niniejszej pracy system może być z powodzeniem wykorzystany do badania funkcji genów mitochondrialnych zarówno w systemie roślinnym, jaki w ludzkich liniach komórkowych. To nowatorskie podejście otwiera nową drogę do badań genetycznych mitochondriów, odczytywania procesów regulacji i identyfikacji nierozpoznanych jeszcze funkcji genomu mitochondrialnego.