

Optimalizacja technologii CRISPR-Cas9 w kontekście celowania w sekwencje powtarzające się

Magdalena Dąbrowska

STRESZCZENIE

Choroby poliglutaminowe (poliQ) są neurodegeneracyjnymi chorobami genetycznymi spowodowanymi mutacją, która polega na zwiększeniu liczby powtórzeń trójki nukleotydów CAG w genach odpowiedzialnych za te choroby. Choroba Huntingtona (HD) występuje najczęściej ze wszystkich zaburzeń poliQ. Pomimo, że gen *HTT* odpowiedzialny za tę chorobę został dobrze scharakteryzowany, nadal nie są znane wszystkie aspekty jej patogenezы, co utrudnia stworzenie potencjalnej terapii.

Technologia CRISPR-Cas9 stwarza ogromne możliwości, zarówno na polu tworzenia lepszych modeli badawczych, jak również opracowania nowych podejść terapeutycznych. Wykorzystanie systemu CRISPR-Cas9 do badania sekwencji powtarzających się stanowi jednak duże wyzwanie technologiczne. Wydłużona sekwencja CAG tworzy drugorzędowe struktury RNA i DNA oraz przyczynia się do poślizgów polimerazy podczas amplifikacji, co stanowi utrudnienie dla większości metod stosowanych w biologii molekularnej.

Celem ogólnym niniejszej pracy była optymalizacja technologii CRISPR-Cas9 w kontekście celowania w regiony sekwencji powtarzającej się. W swoich badaniach używałam systemu CRISPR-Cas9 oraz jego modyfikacji do indukowania pęknięć nici DNA w regionie sekwencji CAG w genie *HTT*. Te badania przyczyniły się do opracowania nowej strategii terapeutycznej, która skutkowała „bezszywowym” wycięciem sekwencji CAG. W celu dokładnego poznania efektów edycji w obrębie sekwencji powtarzającej się stworzyliśmy nową metodę o nazwie qEva-CRISPR. Ta metoda jest dedykowana do wykrywania specyficznych i niespecyficznych cięć oraz rozróżniania zdarzeń wynikających z różnych mechanizmów naprawy DNA. Ponadto praca doktorska obejmuje zagadnienia związane z tworzeniem nowych modeli komórkowych HD za pomocą technologii CRISPR-Cas9. W niniejszej pracy uzyskane linie komórkowe posłużyły do testowania cząsteczek terapeutycznych oraz zbadania niektórych aspektów patogenezы HD.

Wyniki uzyskane w ramach tej rozprawy doktorskiej przyczyniły się do usprawnienia technologii CRISPR-Cas9 w kontekście jej aktywności w regionach sekwencji powtarzającej się oraz do zwiększenia efektywności i specyficzności modyfikacji DNA w tym regionie. Ponadto badanie efektów edycji w obrębie sekwencji CAG zrodziło pytania o to jakie mechanizmy są zaangażowane w jej naprawę oraz jak nimi sterować? Stworzona w ramach doktoratu metoda qEva-CRISPR może służyć do określania specyficzności cięcia zaprojektowanych komponentów systemu CRISPR-Cas9, włączając w to testowanie nowych białek należących do rodziny CRISPR. Ponadto nowe modele komórkowe umożliwią wykrycie bezpośredniego efektu ekspansji powtórzeń na fenotyp i funkcje komórki oraz pozwolą zbadać różne aspekty patogenezы HD.