

Charakterystyka molekularna transkryptów *HTT* i *ATXN3* w kontekście ich roli w patogenezie i użycia jako cele w terapii chorób poliglutaminowych HD i SCA3

Paweł Joachimiak

Choroby poliglutaminowe (poliQ) są to choroby neurodegeneracyjne, w większości autosomalne dominujące. Są spowodowane mutacją, która polega na wydłużeniu ciągu powtórzeń CAG w otwartych ramkach odczytu (ang. *open reading frame*, ORF) konkretnych genów, co skutkuje obecnością wielu reszt glutaminy w kodowanych białkach. Pacjenci zazwyczaj posiadają dwa allele danego genu – allel normalny (WT) oraz allel zmutowany (MUT). Dla większości chorób poliQ, allel normalny charakteryzuje się liczbą powtórzeń CAG z zakresu 5-30, natomiast liczba powtórzeń CAG w allelu zmutowanym dla większości chorób zaczyna się od ok. 39. Dwie najlepiej poznane i najszerzej opisane choroby poliQ to choroba Huntingtona (ang. *Huntington's disease*, HD) oraz ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (ang. *spinocerebellar ataxia type 3*, SCA3). Mimo ciągle postępującej wiedzy na temat tych chorób, cały czas nie udało się opracować skutecznej terapii.

Większość opracowań literaturowych dotyczących chorób poliQ porusza role zmutowanych białek, jako głównych czynników patogennych. W przypadku transkryptów poliQ wykazano, że mogą stanowić dobry cel terapeutyczny dla potencjalnych strategii dążących do obniżenia ekspresji zmutowanych genów. Jednakże, rola transkryptów w patogenezie chorób poliQ nie została jeszcze dobrze zbadana. Stąd też głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było poznanie cech transkryptów związanych z chorobami poliQ, które mają znaczenie w patogenezie oraz dla projektowania strategii terapeutycznych.

W pierwszej kolejności podjąłem aspekt terapeutyczny, a konkretnie brałem udział w poznaniu mechanizmu prowadzącego do allelo-selektywnego wyciszenia ekspresji zmutowanych genów poliQ, na przykładzie oligonukleotydu A2 celującego w ciąg powtórzeń CAG w sekwencji mRNA huntingtyny (*HTT*). Wyniki badań pozwoliły wykazać udział w mechanizmie wyciszenia takich procesów jak inhibicja translacji czy deadenylacja transkryptu, a także pozwoliły określić w nim rolę białka AGO2. Następnie, poruszając kontekst zaangażowania zmutowanych transkryptów w patogenezę chorób poliQ, przeanalizowałem

dostępne informacje i dane dotyczące poliadenylacji i alternatywnej poliadenylacji (ang. *alternative polyadenylation, APA*) tych mRNA i zaproponowałem dalsze potencjalne perspektywy w tych badaniach. Kolejno, opracowałem podejście eksperymentalne służące do ilościowej analizy endogennych transkryptów ataksyny-3 (*ATXN3*) oraz *HTT*. Wykorzystuje ono technikę emulsyjnego PCR (ang. *droplet digital PCR, ddPCR*) oraz warianty SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) pozwalające na rozróżnienie transkryptu WT od transkryptu MUT. Następnie wykorzystałem w/w metodę do precyzyjnego określenia stosunku procentowego endogennych transkryptów (WT/MUT) w różnych liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów HD i SCA3 oraz w tkankach pobranych z modelu mysiego HD. Wykazałem, że wraz z różnicowaniem neuronalnym może zmieniać się stosunek procentowy alleli WT/MUT, a także ulega zmianie łączna liczba (WT+MUT) badanych transkryptów przypadająca na jedną komórkę. Ponadto, opisane podejście eksperymentalne zostało wykorzystane do oceny efektywności allelo-selektywnej strategii terapeutycznej dla chorób poliQ, jak i do weryfikacji czy metody inżynierii genetycznej wpływają na ekspresję modyfikowanych alleli.

Podsumowując, moje badania wniosły wkład do lepszego poznania zmutowanych transkryptów, zarówno w kontekście rozwoju choroby oraz jako celów molekularnych w strategiach terapeutycznych dla chorób poliQ.