

Tytuł: „Opracowanie przedklinicznej strategii terapeutycznej choroby Huntingtona i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 z wykorzystaniem wyciszających reagentów RNA celujących w powtórzenia CAG w transkryptach genów *HTT* i *ATXN3*”

Choroby poliglutaminowe (poliQ) należą do grupy 9 rzadkich chorób genetycznych tj. choroba Huntingtona (HD), ataksje rdzeniowo-mózdkowe (SCA) typu 1, 2, 3, 6, 7, 17, zanik czerwienno-zębaty (DRPLA) i rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA). Choroby te są wynikiem mutacji w regionie kodującym genów sprawczych polegającej na ekspansji powtórzeń trójnukleotydowych cytozyna – adenina – guanina (CAG) kodujących nadmiernie wydłużony ciąg glutamin w białku. Pacjenci z chorobami poliglutaminowymi najczęściej posiadają dwa allele danego genu. Jeden allel z prawidłową liczbą (około 5–35), natomiast drugi zmutowany allel ze zwiększoną liczbą (>35) powtórzeń CAG. Częstotliwość występowania chorób poliQ mieści się w przedziale około 1–10 przypadków na 100 000 ludzi. HD (ang. *Huntington's disease*; HD) i SCA3 (ang. *spinocerebellar ataxia type 3*; SCA3) cechują się najwyższym wskaźnikiem występowania na świecie oraz są najlepiej opisane spośród wszystkich chorób poliQ.

W przypadku HD, SCA3 oraz innych chorób poliQ, strategia terapeutyczna celująca w zmutowany ciąg CAG w mRNA może okazać się skutecznym sposobem na obniżenie poziomu patogennego białka. Aby zbadać tę strategię terapeutyczną *in vivo*, zaprojektowano różne reagenty shRNA (ang. *short-hairpin RNA*) oraz siRNA (ang. *small interfering RNA*) odpowiednio w formacie wektorowym oraz biwalentnym, ukierunkowane na powtórzenia CAG w mRNA. Humanizowane modele myszy HD (Hu^{128Q/21Q}) i SCA3 (Ki^{150Q/21Q}) ze zmutowanym allelem zawierającym ponad 100 powtórzeń CAG oraz z prawidłowym allelem zawierającym 21 CAG wykorzystano do symulacji warunków biallelicznych u pacjentów. Systemowo, do zatoki oczodołowej podano wektory AAV-PHP.eB zawierające shRNA jako nieinwazyjną terapię przechodzącą przez barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*; BBB). Cząsteczki biwalentne z siRNA podano bezpośrednio do mózgu poprzez iniekcje lokalne.

Pierwszym celem pracy był wybór reagentów do dalszych badań poprzez przeprowadzenie krótkoterminowych eksperymentów oceniających bezpieczeństwo i efektywność zaprojektowanych shRNA. Pozwoliło to wybrać dwa reagenty A4(P10A), A4(P10,11A)

cechujące się najniższymi efektami ubocznymi i najefektywniejszym obniżaniem poziomów zmutowanego białka w różnych obszarach mózgu w porównaniu do pozostałych testowanych shRNA. Wybrane shRNA w formacie AAV-PHP.eB postanowiono przetestować w długoterminowych eksperymentach, uwzględniających obserwacje pooperacyjną, ocenę zaburzeń behawioralnych, ewentualnych skutków ubocznych, efektywność obniżania poziomu zmutowanych i prawidłowych białek, ocenę efektu terapeutycznego na poziomie komórkowym (inkluzyje) oraz związany z tym stopień alleloselektywności reagentów. Zaobserwowano, że wektor AAV-PHP.eB zawierający shRNA skutecznie transdukował mózg i jego określone regiony przy braku transdukcji tkanek obwodowych. Skuteczność obniżenia poziomu białek zależała od poziomu transdukcji regionu mózgu. W podejściu wektorowym, opracowano skuteczną transdukcję i dostarczanie reagentów celujących w CAG do mózgu przy użyciu wektorów przekraczających BBB, co jest szczególnie korzystne w terapii poliQ i innych zaburzeń OUN. Drugim testowanym podejściem był cząsteczki biwalentne z siRNA celujące w ciąg CAG, które również efektywnie transdukowały myśi mózgu, skutkując redukcją zmutowanego białka. Jednakże w przypadku tych cząsteczek zarejestrowano nasilone skutki uboczne w modelu HD. Wykazano działanie zastosowanych reagentów biwalentnych *in vivo* na modelach dwóch najczęściej występujących chorób poliglutaminowych, jednakże reagenty te wymagają dalszych badań w celu zminimalizowania efektów niepożądanych.

Podsumowując, pokazano skuteczność podejścia terapeutycznego celującego w ciąg powtórzeń CAG w mRNA zmutowanych genów dla HD i SCA3. Badania pokazują, że podejście to może zostać zastosowane w terapii wielu chorób poliQ. Co więcej reagenty shRNA powodują obniżanie zmutowanego białka poliQ w mózgu, a sposobem ich dostarczenia jest mało inwazyjne podanie do krwi i przejście przez barierę-krew mózg co ma niebagatelne znaczenie kliniczne.