

Identyfikacja procesów zaangażowanych w skracanie ciągu powtórzeń CAG w wyniku indukcji dwuniciowych pęknięć DNA w genie *HTT*

mgr inż. Mateusz Nowaczyk

Streszczenie

Ekspansje powtórzeń CAG są przyczyną wielu neurodegeneracyjnych, dziedzicznych i obecnie nieuleczalnych chorób człowieka (choroby poliQ). Jednym z takich schorzeń, jest choroba Huntingtona (HD). Nowatorską strategią terapii dedykowanej tej chorobie jest kontrolowane skracanie ciągu powtórzeń, za pomocą narzędzi inżynierii genetycznej, takich jak CRISPR-Cas9. Indukcja dwuniciowych pęknięć DNA (DSBs) w obrębie ciągów powtórzeń CAG prowadzi do ich niestabilności, zarówno wydłużania, jak i skracania ciągu, lecz mechanizmy stojące za obserwowaną niestabilnością nie są do końca poznane. Wcześniejsze badania sugerują zaangażowanie w ten proces niektórych ścieżek naprawy DNA. Brak jest jednak badań dotyczących mechanizmów naprawy DSBs w obrębie powtórzeń CAG w endogennym *locus* w ludzkim modelu komórkowym.

Celem niniejszej pracy było dokładniejsze poznanie mechanizmów naprawy DSBs w regionach powtórzeń CAG w endogennym *locus* w komórkach ludzkich. Wyniki niniejszej pracy ukazały złożoność naprawy DSBs w regionach z powtórzeniami CAG. Pozwoliły na identyfikację czynników i mechanizmów zaangażowanych w ten proces na różnych jego etapach oraz przyczyniły się do stworzenia modeli naprawy DNA w regionach z powtórzeniami CAG u ludzi. W niniejszej pracy wykazano udział resekcji końców DNA w naprawie DSBs w regionach z powtórzeniami CAG i przedstawiono przesłanki sugerujące zależność intensywności resekcji a w konsekwencji wyboru mechanizmu naprawy DNA i jej efektów od długości ciągu. Stwierdzono silny wpływ umiejscowienia DSB względem powtórzeń CAG oraz sekwencji flankujących ciąg na wybór mechanizmu naprawy DNA. Wykazano, że naprawa DSB indukowanego na początku ciągu powtórzeń CAG angażuje mechanizm NHEJ oraz polimerazę DNA theta (POL θ), prowadząc do wycięcia całego ciągu powtórzeń. Stwierdzono, że indukcja DSB wewnątrz ciągu, skutkuje jego skracaniem z zachowaniem ramki odczytu, co odbywa się z udziałem mechanizmu NHEJ oraz wykorzystującego dalekie resekcje mechanizmu angażującego białka rekombinacji homologicznej takie jak RAD51.

W efekcie praca ta przyczyniła się do lepszego poznania zjawisk odpowiedzialnych za niestabilność ciągów powtórzeń CAG. Poszerzenie wiedzy w tej dziedzinie może przyczynić się do opracowania skutecznej i bezpiecznej terapii chorób poliQ wykorzystujących technologie edycji genomu, takie jak CRISPR-Cas9.