

Szkielet błony erythrocytu tworzą błonowe białka peryferyjne stanowiące bardzo ważny element strukturalny tej komórki, gdyż nie posiada ona żadnych innych struktur szkieletowych. Jednocześnie, komórka ta narażona jest na wielki stres mechaniczny oraz odkształcenia podczas krążenia w krwiobiegu, gdyż wielokrotnie w ciągu doby przeciska się przez kapilary o średnicy czterokrotnie mniejszej od średnicy krwinki. Za właściwości mechaniczne błony erythrocytu odpowiadają w równym stopniu interakcje szkieletu z dwuwarstwą lipidową zawierającą białka integralne. Zaburzenia struktury błony erythrocytu prowadzą do schorzeń określanych mianem anemii hemolitycznych, w przypadkach których dochodzi do utraty właściwości mechanicznych erythrocytu. Erythrocyty ulegają przyspieszonemu rozpadowi (czas życia erythrocytu zmniejsza się z normalnych 120 do 3 dni). Ten ubytek kompensowany jest przez wzmożoną erytropoezę, o czym świadczy zwykle znacznie podwyższona liczba retikulocytów. Najczęściej występującą wśród populacji północnoeuropejskiej jest **dziedziczna sferocytoza (HS)**. U podstaw dziedzicznej sferocytozy leżą mutacje w genach kodujących białka błony erythrocytu. Pomimo wielkiego postępu w dziedzinie badań szkieletu błony i molekularnej patologii erythrocytu, nadal jednak istnieje wiele przypadków mutacji w genach kodujących białka błony erythrocytów, w przypadku których mechanizmy molekularne leżące u podstaw zaburzenia struktury i funkcji błon erythrocytów pozostają nieznanne. Zatem, celem niniejszego projektu jest:

1. **poznanie szczegółów mechanizmu (-ów) szeregu wybranych typów dziedzicznej sferocytozy (HS)** znanych z naszych badań lub literatury, ale trudnych do wyjaśnienia znanymi oddziaływaniami między błoną a białkami szkieletowymi erythrocytów, w szczególności odnoszących się do oddziaływań wzajemnych białek błony erythrocytu. Podejmiemy się ustalenia szczegółowego mechanizmu molekularnego kilku przypadków HS. Podstawową metodą badawczą będzie „konstrukcja” rekombinowanych fragmentów (domen) białek błony erythrocytu ze sztucznie wprowadzoną mutacją naśladującą tę występującą w białku błony erythrocytu pacjenta. Następnie będziemy analizować interakcje *in vitro* i *in vivo* z partnerami białkowymi badanej domeny.

2. **próba określenia nowych, nieopisanych dotąd w literaturze i bazach danych mutacji w genach białek erythrocytów** w rodzinach, w których molekularne defekty HS nie zostały jeszcze ustalone.

W tym celu przeprowadzimy analizę molekularną genomowego DNA pacjentów HS i kontroli (osób zdrowych) metodą sekwencjonowania całego genomu. Grupę badaną stanowią będą pacjenci HS z 4 rodzin zarejestrowanych i zdiagnozowanych w Klinice Hematologii i Chorób Rozrostowych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Grupę kontrolną stanowią będą zdrowi ochotnicy w wieku zbliżonym do wieku pacjentów oraz asymptomatyczni członkowie rodzin. Mutacje i polimorfizmy potwierdzimy poprzez systematyczne sekwencjonowanie powielonych techniką PCR badanych fragmentów DNA. W przypadkach nie dających się wykryć powyższą metodą zastosujemy badania RNA metodą „RNA-seq” prowadzące do wykrycia genów różniących się poziomem ekspresji oraz mutacjami w stosunku do RNA retikulocytów kontrolnych. Uzyskane w powyższej analizie dane poddamy weryfikacji klasycznymi metodami.

Poznanie tych mechanizmów powinno przyczynić się z jednej strony do pogłębienia wiedzy dotyczącej roli poszczególnych białek a także ich domen w formowaniu i funkcji szkieletu błony a zatem błony. Z drugiej strony, wyjaśnienie molekularnego podłoża schorzenia może wspomóc działania lekarzy zmierzające do poprawy jakości życia pacjentów z HS. Spodziewamy się też, wzbogacić katalog mutacji w genach kodujących białka błony erythrocytów, co powinno ułatwić pełną diagnostykę molekularną kolejnych przypadków HS.