

Wiele chorób wrodzonych wynika z obecności niewielkich zmian w DNA – mutacji nonsensownych. Skutkiem tych mutacji jest pojawienie się w sekwencji genów, przedwczesnych kodonów STOP (*premature termination codons*, PTC), które zaburzają proces translacji białka i prowadzą do powstania skróconych i często niefunkcjonalnych białek. Obecnie istnieją różnorodne podejścia terapeutyczne, które umożliwiają „zignorowanie” sygnału stop wywołanego obecnością PTC. Większość z nich zakłada bezpośrednią ingerencję w DNA i genom pacjenta, co wiąże się ze znacznym ryzykiem wystąpienia negatywnych efektów ubocznych. Alternatywnym podejściem do problemu PTC jest wykorzystanie specyficznych związków chemicznych m.in. antybiotyków aminoglikozydowych (AAG), które są w stanie „nakłonić” maszynę translacyjną komórki do zignorowania PTC. Takie podejście nazywane jest stymulowanym translacyjnym odczytem PTC (*PTC readthrough*) i zostało do tej pory przetestowane z powodzeniem w kilku różnych chorobach genetycznych. Niektóre z badanych związków są obecnie na etapie badań klinicznych.

Badania w naszym Zakładzie skupiają się nad możliwością zastosowania tej metody we wrodzonej chorobie genetycznej, pierwotnej dyskinezie rzęsek (*primary ciliary dyskinesia*, PCD). Przyczyną PCD są wady w budowie rzęsek ruchomych - niewielkich struktur obecnych na powierzchni wielu typów komórek ciała, a w szczególności komórek wyścielejających drogi oddechowe. U jednej trzeciej pacjentów, przyczyną tych wad jest obecność PTC w genach odpowiedzialnych za budowę i funkcję rzęsek. Defekty tych organelli komórkowych powodują jeden z najbardziej charakterystycznych objawów PCD – przewlekłe, nawracające infekcje dróg oddechowych, które z czasem mogą prowadzić do poważnego upośledzenia funkcji płuc, wymagającego leczenia operacyjnego, z transplantacją płuc włącznie. Innymi częstymi objawami PCD jest niepłodność męska (nieprawidłowy ruch męskich komórek rozrodczych- plemników), czy też odwrócenie symetrii organów wewnętrznych – serce zlokalizowane po prawej stronie ciała, a wątroba po lewej. Obecnie nie istnieje metoda leczenia, pozwalająca zwalczyć przyczyny powstawania tej rzadkiej choroby, możliwe jest jedynie łagodzenie niektórych z objawów, czy to farmakologicznie, czy to poprzez fizjoterapię. Zbadanie możliwości wykorzystania podejścia *PTC readthrough*, może stać się przyczynkiem stworzenia pierwszej skutecznej terapii leczenia przyczynowego.

Plan badań zakłada przetestowanie w dwóch systemach (podczas transkrypcji i translacji *in vitro* oraz w transfekowanych liniach komórek nabłonkowych) czterech AAG (gentamycyny, paromomycyny, amikacyny i G418), pod kątem potencjału stymulacji procesu *PTC readthrough* w mutacjach wprowadzających PTC, pochodzących z genów zaangażowanych w patogenezę PCD. Związki te były stosowane wcześniej w innych chorobach genetycznych, co pozwala przypuszczać, iż umożliwią efektywną stymulację również w przypadku PCD. Co więcej, ze względu na znane działanie toksyczne AAG m.in. na komórki nerek, zostaną przetestowane również nowsze analogi tych związków (NAAG), będące ich pochodnymi lub jedynie naśladujące ich sposób działania (PTC124, tylozyna i negamycynę). Zbadamy również wpływ powyższych substancji na żywotność i funkcję komórek nabłonka oddechowego oraz na tworzenie się rzęsek. Dodatkowo, jako cel opcjonalny (zależnie od dostępności materiału biologicznego od pacjentów), przewidujemy pomiar ilości transkryptów z badanymi mutacjami PTC w preparatach z komórek nabłonka oddechowego. Część analiz zostanie przeprowadzona w ramach stażu zagranicznego na Uniwersytecie w Southampton (Wielka Brytania) ze względu na duże doświadczenie tamtejszej placówki w hodowli komórek nabłonka oddechowego i ciliogenezie *in vitro*.

Analiza skuteczności w stymulacji *PTC readthrough* zarówno AAG jak i NAAG, pozwoli na wyselekcjonowanie związku skutecznie przywracającego ekspresję funkcjonalnego białka. W dalszej perspektywie może się to przyczynić do przywrócenia produkcji tego białka także u pacjentów z PCD. Określenie wpływu testowanych związków na nabłonek oddechowy umożliwi wybranie związków charakteryzujących się najmniejszą toksycznością dla komórek nabłonka oraz niewykazujących negatywnego wpływu na rzęski. Jest to kluczowym krokiem, jeśli rozważamy przyszłe zastosowanie kliniczne podejścia *PTC readthrough* w leczeniu PCD. Informacje o podatności konkretnych mutacji na *PTC readthrough* będą mieć także wkład w ogólną wiedzę na temat związku pomiędzy sekwencją DNA, charakterystyką użytych związków, a efektywnością procesu *PTC readthrough*. Te informacje będą mogły zostać następnie wykorzystane do innych badań, począwszy od badań podstawowych nad procesem *PTC readthrough* w komórce, aż do potencjalnego zastosowania terapeutycznego tego podejścia, w leczeniu chorób wrodzonych, wywołanych obecnością PTC w sekwencji genów.