

Zmiany w sekwencji DNA wiążą się z ważnymi konsekwencjami dla funkcjonowaniu całego organizmu, począwszy od nowotworów, aż po dziedziczne choroby genetyczne. Wiele chorób wrodzonych jest wywołanych obecnością niewielkich, szkodliwych zmian w DNA, znanych jako przedwczesne kodony stop (*premature termination codons*, PTC). PTC zaburzają proces syntezy białek, w konsekwencji czego nowopowstałe białka są zbyt krótkie i nie funkcjonują właściwie. Do tej pory opracowano różnorodne podejścia terapeutyczne, które umożliwiają „sforśowanie” sygnału stop wywołanego obecnością PTC. Większość z tych metod zakłada jednak bezpośrednią ingerencję w DNA pacjenta, co jest obciążone sporym ryzykiem. Alternatywnym podejściem do problemu PTC jest zastosowanie specyficznych związków chemicznych, które „nakłaniają” 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 chorobach genetycznych. Niektóre badane związki są nawet w fazie testów klinicznych.

Nasz zespół chciałby zbadać możliwość zastosowania tego podejścia w pierwotnej dyskinezie rzęsek (*primary ciliary dyskinesia*, PCD), rzadkiej, wrodzonej chorobie, którą zajmujemy się w naszym Zakładzie. PCD jest powodowana molekularne defekty rzęsek ruchomych - małych wypustek obecnych na powierzchni wielu komórek ciała, w tym komórek wyścielających drogi oddechowe oraz w witykach plemników (które są przekształconymi rzęskami). Defekty rzęsek ruchomych powodują najbardziej charakterystyczny objaw PCD - nawracające infekcje dróg oddechowych, z czasem powodujące poważne upośledzenie funkcji płuc, wymagające nawet transplantacji. Do pozostałych częstych objawów PCD należy niepłodność męska (plemniki nieprawidłowo się poruszają) oraz odwrócona symetria organów wewnętrznych - z sercem znajdującym się po prawej stronie i wątrobą po lewej. Z czasem, głównie na skutek problemów oddechowych, zdolność pacjentów do pracy oraz ich komfort życia spada, co sprawia, że PCD jest sporym problemem, zarówno medycznym, jak i społecznym. U jednej trzeciej pacjentów choroba spowodowana jest obecnością PTC w genach odpowiedzialnych za strukturę i funkcję rzęsek. Konieczne jest zbadanie, czy możliwe jest wykorzystanie podejścia *PTC readthrough* do leczenia tej choroby. Ponieważ wiele czynników warunkuje sukces tej metody, należy je zoptymalizować przed rozważeniem zastosowania klinicznego *PTC readthrough*.

W naszych poprzednich badaniach, przetestowaliśmy cztery najczęściej używane antybiotyki aminoglikozydowe (AAG) pod kątem potencjału stymulacji procesu *PTC readthrough* w PTC pochodzących z genów zaangażowanych w patogenezę PCD. Mimo obiecujących wyników, badania wykazały potrzebę zastosowania związków o niższej toksyczności i zwiększonej zdolności penetracji przez błonę komórkową.

W obecnym projekcie, zamierzamy kontynuować tę linię badań, testując wybrane związki nie-aminoglikozydowe (*non-aminoglycoside antibiotics*, NAAG), m. in. PTC124, tylozynę, negamycynę oraz RTC13, RTC14, GJ071, GJ072. Związki te charakteryzuje zredukowana toksyczność oraz niższa masa cząsteczkowa (dzięki czemu lepiej wnikają do wnętrza komórek). Zbadamy wpływ związków na żywotność i funkcję komórek nabłonka oddechowego oraz na formowanie się rzęsek. W dwóch systemach (podczas transkrypcji i translacji *in vitro* oraz w transfekowanych liniach komórek nabłonkowych) zbadamy także efektywność NAAG w stymulacji procesu *PTC readthrough* w genach związanych z występowaniem PCD. W razie możliwości, (zależnie od dostępności materiału biologicznego od pacjentów), zmierzmy także ilość transkryptów z badanymi mutacjami PTC w komórkach nabłonka oddechowego pacjentów oraz ich podatność na degradację w procesie NMD- chroniącym komórki przed wadliwymi transkryptami.

Do tej pory nie ukazały się prace opisujące zastosowanie podejścia *PTC readthrough* w PCD. Określenie wpływu testowanych NAAG na nabłonek oddechowy umożliwi wyselekcjonowanie związków najmniej toksycznych dla komórek nabłonka, niewykazujących negatywnego wpływu na rzęski. Jest to kluczowym krokiem, jeśli rozważamy przyszłe zastosowanie kliniczne podejścia *PTC readthrough* w leczeniu PCD. Dodatkowo, porównanie efektywności NAAG z poprzednio testowanymi AAG, pozwoli na wybranie najskuteczniejszej kombinacji aktywnego związku i PTC. Identyfikacja kolejnych mutacji, wysoce podatnych na translacyjny odczyt PTC, może zwiększyć liczbę chorych na PCD, mogących odnieść korzyść z zastosowania podejścia *PTC readthrough*. 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 różnorodnych 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 DNA.