

Badanie mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA w regionach mikrosatelitarnych z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9

Krótkie powtórzenia tandemowe (ang. short tandem repeats, STR), znane również jako mikrosatelity składają się z motywu sekwencji od 1 do 6 nukleotydów, powtórnego tandemowo od 10 do 50 razy. Są one niestabilne podczas podziałów komórki i wykazują się zmienną długością w obrębie populacji jak również heterogennością somatyczną. Cecha ta jest wykorzystywana m.in. w genetyce populacyjnej, kryminalistyce czy diagnostyce nowotworów. W niektórych przypadkach długość ciągu STR przekracza granice normy i staje się główną przyczyną wielu chorób genetycznych człowieka. Ekspansja motywu (CAG)_n w regionach kodujących różnych genów ma związek z występowaniem nieuleczalnych jak dotąd, chorób neurodegeneracyjnych, z których najbardziej znane są choroba Huntingtona (HD) i ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3).

Ostatnie lata przyniosły ogromny postęp w technologii edycji genomów, a nowe narzędzia umożliwiają tworzenie lepszych modeli chorób czy opracowywanie nowych podejść terapeutycznych. Geny zawierające patologicznie wydłużone ciągi powtórzeń CAG/CTG były również edytowane przy pomocy nukleaz z motywem palca cynkowego (ang. Zinc finger nucleases, ZFN), TALEN (ang. Transcription activator-like effector nucleases) oraz CRISPR/Cas9 (ang. Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9). Pierwsze wyniki tych badań ujawniły wiele ciekawych i niewyjaśnionych zjawisk ściśle związanych z właściwościami sekwencji STR. Aktywacja mechanizmów naprawy DNA w wyniku działania narzędzi edycji genomów w regionach STR prowadziła do niestabilności ciągu powtórzeń. Co ciekawe, niektóre z nukleaz indukowały preferencyjne skracanie powtórzeń, inne ich wydłużanie i skracanie. Wciąż jednak nie wiadomo jak kontrolować te zjawiska, w jaki sposób pęknięcia DNA w regionach oskrzydających powtórzenia mogą je destabilizować, jaki jest wpływ lokalizacji pęknięcia DNA, długości ciągu powtórzeń czy sekwencji nukleotydowej regionu oskrzydającego STR na mechanizm naprawy DNA.

Obecność długich ciągów STR w DNA ma wpływ na budowę chromatyny, jej stabilność oraz wiązanie się różnych czynników, w tym białek systemu naprawy DNA. Dodatkowo obecność regionów homologii sekwencji angażuje niekanoniczne mechanizmy naprawy DNA, które są słabo poznane. Nowa wiedza na temat mechanizmów zaangażowanych w naprawę DNA w regionach STR pozwoli na opracowanie bardziej skutecznych i specyficznych narzędzi edycji genomu wykorzystywanych m.in. w eksperymentalnej terapii chorób związanych z ekspansją STR. Pomoże również w przewidywaniu potencjalnych efektów ich działania.

W związku z tym w ramach tego projektu: (i) scharakteryzujemy mutacje generowane w wyniku edycji i naprawy genu *HTT* w regionie powtórzeń CAG, (ii) określimy czynniki wpływające na wycinanie/skracanie powtórzeń CAG w wyniku naprawy DNA, (iii) zbadamy wpływ lokalizacji powtórzeń CAG na ich niestabilność oraz (iv) zbadamy udział białek zaangażowanych w różne mechanizmy naprawy DNA w procesie niestabilności STR. W odróżnieniu od wcześniejszych badań niestabilności STR, wykorzystujących głównie model drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) w ramach tego projektu wykorzystamy ludzkie linie komórkowe traktowane nukleazami typu CRISPR/Cas9, celującymi w region STR genu *HTT*.