

Ciliopatie są rosnącą grupą dziedzicznych chorób wywołanych dysfunkcją pierwotnych lub ruchomych rzęsek, ewolucyjnie konserwowanych organelli obecnych na powierzchni wielu komórek eukariotycznych. W ostatnich latach intensywne prace badawcze zostały ukierunkowane na zrozumienie genetyki i molekularnych podstaw ciliopatii, ale jak dotąd wiele zagadnień pozostaje nieznanymi lub nie zbadanych. Pierwotna dyskineza rzęsek (PCD), której objawami są nawracające infekcje dróg oddechowych, niepłodność męska i randomizacja osi symetrii ciała, jest flagową ciliopatią spowodowaną dziedziczną dysfunkcją ruchomych rzęsek. Genetycznie heterogenna, PCD jest powodowana mutacjami w genach kodujących białka, które albo stanowią strukturalne/funkcjonalne elementy ruchomych rzęsek, albo są niezbędne do ich tworzenia. Spośród setek genów związanych z rzęskami (geny ciliomu), w ponad 40 wykryto mutacje, które powodują PCD. Pomimo znacznego postępu w wyjaśnianiu molekularnych podstaw patogenezy PCD, mutacje leżące u podstaw tej choroby u ~ 30% pacjentów pozostają nieznanymi. Jak dotąd nie wiadomo, czy jest to spowodowane obecnością nieznanymi patogennymi wariantów, leżących poza zwykle badanymi pozycjami w znanych genach PCD, czy też obecnością patogennymi mutacji w nowych, nieznanymi genach kandydujących do miana genów PCD.

Zastosowanie nowoczesnych technik sekwencjonowania, takich jak technologia sekwencjonowania całego eksomu (WES), w nierozwiązanych przypadkach PCD nie zawsze bywa rozstrzygające. W niektórych przypadkach, aby zrozumieć genetyczną przyczynę choroby u pacjentów, trzeba zastosować inne techniki. Duże insercje lub delecje genomowe można wykrywać za pomocą technik wrażliwych na liczbę kopii (np. sekwencjonowanie całego genomu o dużym pokryciu, WGS). Niektórych patogennymi wariantów nie można zidentyfikować za pomocą analizy samej sekwencji genomowej i konieczne jest zastosowanie analizy transkryptomu komórek rzęskowych (RNAseq); właściwa interpretacja tych wyników wymaga zrozumienia roli izoform transkryptów genów PCD na różnych etapach różnicowania komórek rzęskowych u osób zdrowych.

Na podstawie naszych wyników uzyskanych podczas poprzedniego projektu dotyczącego analizy całego eksomu u pacjentów z PCD, chcielibyśmy szczegółowo zbadać genom i transkryptom pacjentów z PCD, u których analiza WES nie przyniosła rozstrzygających wyników. Nasz cele to: identyfikację patogennymi wariantów powodujących strukturalne zmiany sekwencji genomowej; identyfikacja nieprawidłowego składania transkryptów (zdarzeń splicingowych) w genach PCD; badanie znaczenia izoform transkryptów genów PCD na różnych etapach biogenezy rzęsek ruchomych

Materiał do analizy (komórki rzęskowe z nabłonka dróg oddechowych) będą pobierane od wybranych pacjentów z PCD, u których wcześniejsze badania genomu nie wyjaśniły genetycznej przyczyny choroby, a także od osób zdrowych. Komórki będą hodowane w specjalnych pożywkach, umożliwiających ich namnożenie i następnie zróżnicowanie (orzęsenie) bez ingerencji czynników środowiskowych. W projekcie wykorzystane zostaną technologie sekwencjonowania o wysokiej przepustowości: sekwencjonowanie całego genomu i sekwencjonowanie całego transkryptomu. Dalsze analizy zostaną przeprowadzone w celu potwierdzenia i interpretacji uzyskanych wyników.

Wyjaśnienie genetycznej podstawy PCD u pacjentów, u których sekwencjonowanie eksomu nie doprowadziło do znalezienia mutacji jest niezbędne dla uzyskania pełnej diagnostyki molekularnej u tych osób. Oszacowanie częstotliwości występowania dużych genomowych indeli (insercji i delecji) oraz wariantów sekwencji wpływających na splicing w genach PCD pozwoli na zaprojektowanie lepszych schematów diagnostyki molekularnej PCD w populacji polskiej i słowiańskiej. Lepsze zrozumienie roli izoform transkryptów genów rzęskowych u różnicowaniu komórek nabłonka oddechowych u ludzi zdrowych jest konieczne do poszerzenia naszego rozumienia biologii rzęsek ruchomych. Wiedza ta jest również niezbędna do opracowania nowych strategii terapeutycznych w PCD (na przykład, najnowsze terapie oparte na zastosowaniu niekodujących RNA).