

Terapia genowa jest bardzo obiecującym podejściem terapeutycznym, które polega na wprowadzaniu kwasów nukleinowych do komórek pacjenta. Umożliwia leczenie chorób dziedzicznych i wieloczynnikowych. Te terapeutyczne kwasy nukleinowe są dostarczane za pomocą wektorów, spośród których wektory wirusowe są najbardziej skuteczne w zastosowaniach *in vivo*. Wektory wirusowe mogą wprowadzać swój materiał genetyczny do komórek docelowych (innymi słowy, mogą transdukować komórki docelowe) i zapewniać ekspresję korzystnego genu. Ostatnie badania kliniczne i zatwierdzenie pierwszych leków opartych na kwasach nukleinowych dowiodły skuteczności i bezpieczeństwa wektorów wirusowych skonstruowanych na podstawie wirusów towarzyszących adenowirusom (AAV) jako nośników DNA, ale nadal jedną z głównych przeszkód w większości zastosowań jest osiągnięcie wystarczającej wydajności dostarczania genów u pacjentów. Z uwagi na to, że istnieje ciągła potrzeba opracowania nowych, bardziej skutecznych wektorów do dostarczania genów, niezbędny jest głębszy wgląd w mechanizmy biologii i transdukcji AAV. Obecne odkrycia pokazują, że istnieje wiele barier dla udanej transdukcji komórek wektorami AAV, w tym dostępność odpowiednich receptorów na powierzchni komórki, wewnątrzkomórkowe modyfikacje białek wektora lub rozpoznanie wprowadzonego materiału genetycznego jako obcego lub uszkodzonego DNA. Co więcej, ponieważ wektory pochodzą od wirusów, mogą wywoływać łagodne odpowiedzi przeciwwirusowe, które jeszcze bardziej zredukują wydajność transdukcji.

W proponowanym badaniu podjęto próbę zajęcia się jednym z najważniejszych aspektów dotyczących biologii wektorów AAV, którym jest wyjaśnienie ich mechanizmów transdukcji i identyfikacja barier komórkowych wpływających na skuteczne dostarczenie i ekspresję terapeutycznego genu. Celem tego projektu jest zidentyfikowanie szlaków sygnałowych aktywowanych w odpowiedzi na wektory AAV różnych serotypów w komórkach, które są odporne i podatne na transdukcję AAV oraz zbadanie konsekwencji tych interakcji pod względem odpowiedzi przeciwwirusowej, reakcji na obce/uszkodzone DNA, a także wydajności transdukcji. Aby uzyskać wiarygodne wyniki, wykonamy wszystkie zaplanowane eksperymenty na kardiomiocytach i fibroblastach otrzymanych z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Takie komórki będą bardzo przypominać prawidłowe komórki, które tworzą ludzki mięsień sercowy. Ponadto, ponieważ większość wcześniejszych badań dotyczących biologii AAV skupiała się na serotypie 2 AAV, porównamy różne serotypy AAV (AAV2, AAV6 i AAV9) i spróbować określić, czy obserwowane efekty są zależne od serotypu. Proponowane badanie obejmie śledzenie wszystkich kolejnych etapów i barier dla skutecznej ekspresji transgenów z wektorów AAV. Pod względem odpowiedzi cytoplazmatycznej skupimy się na ocenie modyfikacji białek kapsydu wirusowego, a następnie skonstruowaniu zmutowanych wersji wektorów, które będą wykazywać mniejszą podatność na takie zmiany. Ponadto, zbadamy rolę odpowiedzi antywirusowej na wektory AAV w komórkach nieimmunologicznych, ponieważ wykazano, że zarówno kardiomiocyty, jak i fibroblasty posiadają liczne receptory rozpoznające wzorce, które odgrywają znaczącą rolę w odporności wrodzonej. Następnie, przeanalizujemy drogi transportu jądrowego i odpowiedź uwzględniającą mechanizmy naprawy DNA na materiał genetyczny AAV z jednoczesną identyfikacją białek oddziałujących z DNA wektora przy użyciu metod spektrometrii mas.

Uważamy, że porównanie prawidłowych komórek wykazujących różną permisywność w stosunku do wektorów AAV w tej samej tkance może ułatwić identyfikację najbardziej istotnych czynników ograniczających wydajność transdukcji. Jesteśmy również przekonani, że uzyskane wyniki wypełnią kilka luk kluczowych dla lepszego zrozumienia biologii AAV i mogą przyczynić się do opracowania nowych, ulepszonych, bardziej wydajnych wektorów, potencjalnie obniżając koszty terapii genowej wektorami AAV w przyszłości.