

Choroby poliglutaminowe są chorobami genetycznymi wywołanymi wydłużeniem trójki nukleotydów CAG, które kodują glutaminę. Jak dotąd znanych jest dziewięć chorób poliQ do których należą choroba Huntingtona, zanik czerwienno-zębaty (DRPLA), opuszkowo rdzeniowy zanik mięśni (SBMA) oraz różne typy ataksji rdzeniowo-mózdkowej (SCA). Objawy chorobowe związane są głównie z upośledzeniem funkcjonowania układu nerwowego na skutek akumulacji zmutowanego białka w niedzielących się komórkach neuronalnych, która w efekcie prowadzi do ich degeneracji. Najnowsze badania pokazują, że u podstaw tych chorób leżą zaburzenia w mechanizmach naprawy DNA, które są słabo poznane w komórkach ludzkich.

Znanych jest kilka podejść terapeutycznych w leczeniu chorób poliQ. Jedno z nich polega na degradacji zmutowanego transkryptu. Jednak w tym roku badania przedkliniczne z użyciem jednej z tych strategii zakończyły się niepowodzeniem. Kolejnym podejściem jest usuwanie lub skracanie zmutowanej sekwencji CAG na poziomie DNA np. przy użyciu technologii CRISPR-Cas. Te podejście jest korzystne z punktu widzenia terapii ponieważ naprawiona sekwencja jest przekazywana w trakcie podziałów komórkowych do nowych komórek.

CRISPR jest systemem odpornościowym bakterii, który został zmodyfikowany na potrzeby inżynierii genetycznej. Ta technologia została uznana za przełom w biologii molekularnej i doczekała się Nagrody Nobla w dziedzinie chemii. Obecnie jest wykorzystywana do usuwania mutacji na poziomie DNA, wstawiania pożądaných sekwencji w wybrane miejsca w genomie, tworzenia modeli zwierzęcych i komórkowych. Technologia CRISPR-Cas jest również stosowana w badaniach przedklinicznych do stworzenia potencjalnej terapii dla około 30 chorób (większość stanowi choroby genetyczne).

W swoich badaniach chcę wykorzystać system CRISPR-Cas do badania mechanizmów naprawy DNA odpowiedzialnych za skracanie sekwencji powtórzeń CAG. Badania będą kontynuacją grantu Etiuda 8, którego jestem laureatką. Zauważono, że spowodowanie podwójnych pęknięć nici DNA w obrębie sekwencji powtórzeń CAG powoduje ich skrócenie lub wydłużenie podczas naprawy. Jednak dalej nie wiadomo jakie mechanizmy naprawy DNA są za to odpowiedzialne oraz jak nimi sterować aby preferencyjnie skracać zmutowane ciągi. Dlatego celem mojego projektu jest poznanie tych mechanizmów. Badania będą prowadzone na modelu komórkowym DRPLA. W tym celu przeprowadzę CRISPR interference screening- analizę, która polega na wyciszaniu w tym samym czasie około 20 tys. genów naprawczych aby sprawdzić, które z nich są zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć nici DNA wewnątrz sekwencji powtórzeń CAG. Ponadto porównam efekt naprawy sekwencji powtórzeń w komórkach neuronalnych i nieneuronalnych oraz przeprowadzę edycję obu alleli o różnej długości sekwencji powtórzeń CAG w tym samym czasie. Pozwoli to na zbadanie interakcji występujących pomiędzy allelami o różnej długości sekwencji powtarzającej się. W swoich badaniach zamierzam wykorzystać najnowocześniejsze metody badawcze aby lepiej zobrazować efekt edycji wewnątrz sekwencji powtarzającej się. Modelem badawczym będą komórki nie-neuronalne i neurony wprowadzone z komórek od pacjentów cierpiących na DRPLA.

Wyniki moich badań przyczynią się do lepszego poznania mechanizmów naprawy DNA w komórkach ssaczy oraz stworzą możliwość sterowania nimi, co może stanowić podstawę do stworzenia nowej terapii genetycznej dla wszystkich chorób poliQ.