

Opracowanie strategii terapii genowej progerii Hutchinsona-Gilforda

mgr Volha Dzianisava

Progeria Hutchinsona-Gilforda jest rzadką chorobą genetyczną, należącą do grupy chorób zwanych laminopatiami, która obejmuje choroby związane z mutacjami w genie *LMNA*. W przypadku progerii mutacja powoduje aktywację alternatywnego miejsca splicingu transkryptu genu *LMNA* i syntezę skróconej formy laminy A nazywanej progeryną, co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia organizacji otoczki jądrowej i struktury jądra komórkowego. Objawy zaczynają przejawiać się po pierwszym roku życia, prowadząc do śmierci około 13. roku życia. Choroba jest obecnie nieuleczalna. Z tego względu opracowanie terapii genowej powinno znacząco poprawić jakość i długość życia pacjentów oraz zahamować rozwój objawów.

Celem niniejszej pracy było wyselekcjonowanie sekwencji małych interferujących RNA specyficznie rozpoznających mRNA progeryny i powodujących obniżenie poziomu tego białka, a dodatkowo cechujących się podwyższoną stabilnością we krwi.

W celu uzyskania modelu eksperymentalnego pozwalającego na wygodną selekcję i ocenę efektywności projektowanych sekwencji konieczne było przygotowanie nowego modelu badawczego oraz jego charakterystyka. Zdecydowano się na stworzenie sublinii komórek HeLa z nadprodukcją białek fuzyjnych GFP-progeryny, GFP-laminy A oraz samego GFP. Nowy model komórkowy umożliwiła łatwą i szybką analizę poziomu i lokalizacji białek egzogennych. Jego zastosowanie pozwoliło na uzyskanie większej ilości materiału oraz znaczne skrócenie czasu analizy w porównaniu do powszechnie stosowanych komórek pierwotnych od dawców z progerią.

Opracowana w niniejszym badaniu terapia genowa oparta jest na małych interferujących RNA, które selektywnie rozpoznają mRNA progeryny i poprzez interferencję RNA prowadzą do jego degradacji, a w konsekwencji do obniżenia poziomu progeryny. Zaprojektowano i przetestowano szereg sekwencji w celu wyselekcjonowania najbardziej efektywnych i specyficznych. Potwierdzono, że po zastosowaniu zaprojektowanych oligonukleotydów poziom niezmutowanej laminy A nie ulegał zmianie, w przeciwieństwie do progeryny.

Zbadano efekt kombinowanej terapii, wykorzystującej inhibitor farnesylacji – lonafarnib, stosowany w klinicznej terapii progerii, w połączeniu z jednym z wyselekcjonowanych oligonukleotydów. Wyniki badań potwierdziły, że oba te związki mogą być stosowane razem, zachowując swoją skuteczność, a ich kombinacja ma efekt addytywny.

Następnie zaprojektowano szereg małych interferujących RNA zawierających modyfikowane nukleotydy w celu zwiększenia ich stabilności w surowicy krwi. Dla jednego rodzaju modyfikacji potwierdzono zwiększoną stabilność wraz z zachowaniem efektywności działania oligonukleotydu w porównaniu do sekwencji bez modyfikowanych nukleotydów.

W ostatnim etapie oligonukleotydy o największej skuteczności zostały poddane analizie w fibroblastach pochodzących od dawców z progerią. Stwierdzono znaczne obniżenie poziomu progeryny po zastosowaniu oligonukleotydów, które dodatkowo zwiększało się wraz z wydłużeniem czasu trwania terapii i zwiększenia liczby dawek. Potwierdzono również, że zastosowanie badanych oligonukleotydów znacząco obniża poziom progeryny, nie wykazując istotnego wpływu na poziom laminy A.

Opracowane sekwencje terapeutyczne będą mogły posłużyć do stworzenia leku genetycznego dla progerii Hutchinsona-Gilforda. Dwuniciowe sekwencje oligonukleotydowe zawierające modyfikowane nukleotydy mogą być skoniugowane z nośnikiem umożliwiającym ich wnikanie do komórek, oligonukleotydy mogą również być zastosowane w formie jednoniciowej, co umożliwiłoby ich niezależne od nośników wniknięcie do komórek. Na podstawie opracowanych sekwencji może być też stworzona kasetta ekspresyjna do nadprodukcji mikroRNA lub RNA o motywie spinki do włosów.