



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Małgorzata Kurkowiak **Instytut Genetyki Człowieka PAN**

Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Analiza nowych genów zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek **Analysis of new genes involved in Primary Ciliary Dyskinesia (PCD)**

Pierwotna dyskineza rzęsek (Primary Ciliary Dyskinesia, PCD) to choroba heterogenna genetycznie, dziedziczona autosomalnie recesywnie, o częstości występowania 1:16 000 żywych urodzeń (MIM244400). Choroba jest powodowana przez niewłaściwą strukturę i funkcję rzęsek ruchowych. Defekty genetyczne wpływające na ruchliwość rzęsek powodują objawy choroby takie jak: nawracające infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych, przewlekłe zapalenie zatok, rozstrzenie oskrzeli, randomizacja układu narządów wewnętrznych i często męska niepłodność. Najczęstsze wady struktury rzęsek obejmują zewnętrzne i wewnętrzne ramiona dyneinowe (ODA i IDA), które są złożonymi kompleksami składającymi się z wielu białek, odpowiednio generujących i regulujących ruch rzęsek.

Diagnostyka PCD często opiera się na analizie defektów ultrastruktury aksonemy/rzęski, ale techniki stosowane w analizie ultrastruktury są trudne, nie są powszechnie dostępne a niejednokrotnie dają niejednoznaczne wyniki. Ponadto istnieją pacjenci z nieprawidłową funkcją rzęsek, gdzie jednak struktura tych organelli jest prawidłowa. Trudności te są przyczyną dla której ważne jest poznanie genetycznych podstaw PCD. Do dziś znanych jest 29 genów, mutacje w których prowadzą do PCD, ale wyjaśnia to jedynie 50-65% (zależnie od badanej populacji) przypadków, dlatego wciąż poszukuje się nowych genów i mutacji leżących u podłoża PCD.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było badanie genetycznych podstaw pierwotnej dyskinezy rzęsek: poznanie nowych genów oraz analiza funkcjonalna nowych mutacji.

Materiał do badań stanowiły próbki DNA i nabłonka oddechowego pacjentów z PCD zgromadzone i przechowywane w Laboratorium Kliniki i Polikliniki Chorób Dzieci i Młodzieży w Münster oraz w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.

Metody i techniki używane w trakcie realizacji pracy to m.in.:

- bioinformatyczna analiza *in silico* obejmująca analizę sprzężeń i mapowanie homozygotyczności, pozwalająca wytypować regiony w obrębie których należałoby spodziewać się mutacji sprawczych w genach kandydujących w patogenezie PCD,
- izolacja DNA z krwi obwodowej pacjentów, amplifikacja DNA metodą PCR, sekwencjonowanie metodą Sangera, analiza cDNA z użyciem enzymów restrykcyjnych, będąca metodą przesiewową w poszukiwaniu mutacji hot-spot w genie *DNAI1*, oraz HRM (wysokorozdzielcza analiza krzywej topnienia produktu PCR) użyta jako metoda przesiewowa w poszukiwaniu mutacji w genie *ZMYND10* w obrębie polskiej populacji chorych na PCD,
- analiza danych z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), umożliwiająca ocenę obrazu przekroju poprzecznego rzęski z preparatów tkanki nabłonka oddechowego pacjentów z PCD, oraz barwienie immunofluorescencyjne preparatów tkanki nabłonka oddechowego z użyciem specyficznych przeciwciał w celu zobrazowania lokalizacji badanego białka w obrębie komórki rzęskowej.

W ramach projektu doktorskiego dokonano analizy 24 genów - kandydatów. Łącznie zidentyfikowano dziesięć mutacji w trzech nowych genach (*LRRC6*, *ZMYND10* i *CCDC151*) zaangażowanych w patogenezę PCD.

W genie *LRRC6* zidentyfikowano siedem nowych mutacji, spośród których dwie mutacje wykryto również w innych grupach pacjentów z PCD (Horani et al, 2013; Kott et al, 2012; Zariwala et al, 2013). Najczęściej obserwowaną mutacją była delecja dwóch nukleotydów w eksonie 5. (c.598_599delAA), prowadząca do przedwczesnej terminacji translacji (p.Lys200Glufs*3). Wysoka częstość mutacji c.598_599delAA wyjaśnia zjawisko efektu założyciela (Kott et al, 2012).

W genie *ZMYND10* znanych jest obecnie 15 różnych mutacji powodujących PCD, w tym zidentyfikowana w trakcie projektu doktorskiego delecja eksonów 7-12. Ponadto w ramach pracy doktorskiej zidentyfikowano nową mutację w populacji słowiańskiej pacjentów z PCD, c.367delC (p.His123Thrfs*16) u dwóch niespokrewnionych ze sobą pacjentów. Dane te nie zostały jeszcze opublikowane.

W ramach pracy zidentyfikowano również mutację STOP (c.925G>T, p.E308*) w genie *CCDC151* u jednego pacjenta z PCD. Mutacja ta została również zidentyfikowana u innego chorego na PCD, spokrewnionego z analizowanym przypadkiem (wynik uzyskany przez pracowników Laboratorium Kliniki i Polikliniki Chorób Dzieci i Młodzieży w Münster).

Analizy z użyciem technik barwienia immunofluorescencyjnego oraz analizy przekroju poprzecznego rzęski z transmisyjnego mikroskopu elektronowego u pacjentów z mutacjami w każdym z badanych trzech genów wskazały na brak zewnętrznych i wewnętrznych ramion dyneinowych. Z danych tych w połączeniu z danymi z organizmów modelowych wynika,

że białka kodowane przez wszystkie trzy nowo zidentyfikowane geny pełnią rolę w procesie składania ramion dyneinowych. U pacjentów z mutacjami w genie *LRRC6*, *ZMYND10* lub *CCDC151* obserwowano defekt zewnętrznych i wewnętrznych ramion dyneinowych (ODA+IDA defect). Defekt ten jest najczęściej występującą wadą ultrastruktury rzęski u pacjentów z PCD (Papon et al, 2010; Escudier et al, 2009).

Praca doktorska cechuje się dużą wartością poznawczą w obszarze nowoczesnej medycyny i realnie przyczynia się do rozwoju stanu obecnej wiedzy z zakresu genetyki człowieka. Wyniki uzyskane w toku projektu doktorskiego wnoszą nowe informacje na temat patogenezы rzęsek i roli nowych genów w występowaniu PCD oraz pozwalają zmniejszyć procent przypadków o niewyjaśnionej genetycznej przyczynie PCD. Wyniki badań dostarczają również nowych danych na temat rozkładu mutacji wśród pacjentów z PCD o pochodzeniu słowiańskim oraz pomagają określić różnice pomiędzy polskimi pacjentami z PCD a chorymi z innych populacji, a także pozwalają ustalić najczęstsze mutacje powodujące PCD.

Uzyskane dane mogą zostać wykorzystane do poszerzenia testów diagnostycznych (również tych dopasowywanych do pochodzenia etnicznego osoby chorej), dzięki czemu możliwe będzie szybsze postawienie trafnej diagnozy, umożliwiając rozpoczęcie właściwej terapii we wczesnym okresie życia pacjentów. Będzie to miało bezpośrednie przełożenie na poprawę jakości życia chorych z PCD oraz zwiększenie ich społecznej i zawodowej aktywności. Wcześnie rozpoczęta terapia w znaczący sposób ograniczy objawy choroby i ich negatywny wpływ na życie i funkcjonowanie pacjentów.

Każdy z nowo zidentyfikowanych trzech genów koduje białko cytoplazmatyczne, nieobecne w aksonemie. Tym samym dane uzyskane w trakcie projektu doktorskiego przyczyniają się do głębszego zrozumienia i wyjaśnienia procesu składania ramion dyneinowych. Ponadto, białka cytoplazmatyczne, ze względu na większą fizyczną dostępność w komórce niż białka strukturalne aksonemy, mogą być bardziej wrażliwe na działanie potencjalnych nowych terapii w leczeniu PCD. Zwiększa to możliwości tworzenia nowych leków na PCD.

Zastosowane podczas badań metody i techniki wpłyną na wzrost potencjału naukowego Wielkopolski, a otrzymane wyniki, po wdrożeniu ich do klinicznej diagnostyki pacjentów, zaowocują tworzeniem przewagi regionu w obszarze praktycznego zastosowania badań genetycznych. Osiągnięte do tej pory rezultaty dają szansę na podjęcie skutecznej współpracy z sektorem przedsiębiorstw branży medycznej w zakresie prowadzenia szybkiej i skutecznej diagnostyki laboratoryjnej u osób chorych na PCD.