

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20863> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Maczuga, Piotr

Title: Towards RNAi based therapy of liver diseases : diversity and complexity of shRNA and miRNA processing and functions

Issue Date: 2013-05-07

Streszczenie

Wątroba odgrywa bardzo ważną rolę w metabolizmie oraz pełni wiele istotnych dla organizmu funkcji włączając magazynowanie glikogenu, rozkład czerwonych krwinek, syntezę białek osocza, produkcję hormonów oraz detoksykację. Rodzinna hipercholesterolemia (FH) jest chorobą genetyczną, którą charakteryzuje wysoki poziom LDL (lipoprotein o niskiej gęstości) cholesterolu zwiększających ryzyko chorób układu krążenia. FH, a także wiele innych chorób wątroby może być potencjalnie leczone przy pomocy mechanizmu interferencji RNA (RNAi). RNAi jest naturalnym procesem regulacji ekspresji genów w którym małe cząsteczki RNA wiążąc się do sekwencji w mRNA genu, wywołują zjawisko wyciszania lub wyłączenia danego genu. Celem tej pracy było opracowanie skutecznej, a przede wszystkim bezpiecznej terapii FH w oparciu o mechanizm interferencji RNA i wyciszanie genu Apolipoproteiny B100 (ApoB). Białko ApoB jest jednym z głównych składników lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), które odpowiedzialne są za transport "złego" cholesterolu LDL-C..

W **rozdziale 2** testowaliśmy shRNA przeciwko ApoB (shApoB), który był dostarczany za pomocą wirusa zależnego od adenowirusów (AAV). AAV-shApoB spowodował silne wyciszenie genu oraz białka ApoB, co w konsekwencji spowodowało spadek poziomu cholesterolu we krwi i jednocześnie zwiększenie zawartości lipidów w wątrobie. W tym badaniu shRNA było produkowane przez promotor polimerazy RNA klasy III, który wykazuje wysoki poziom ekspresji. Prawdopodobnie dlatego wysokie dawki AAV-shRNA spowodowały (łagodne) uszkodzenie wątroby.

Dlatego też, w **rozdziale 3**, zbadaliśmy możliwość zastosowania słabszych promotorów polimerazy RNA II do ekspresji shRNA. Promotory polimerazy RNA II mogą zwiększyć bezpieczeństwo terapii genowej ponieważ, w przeciwieństwie do promotorów pol III, mogą one być regulowane, a także tkankowo-specyficzne- czyli aktywne tylko w danym typie tkanki. Ponieważ uzyskana przez nas ekspresja shRNA przy wykorzystaniu promotorów pol II nie była optymalna, jako alternatywę użyliśmy sztuczne cząsteczki mikro RNA (miRNA), które wykazały skuteczność porównywalną do shRNA produkowane przez pol III.

W **rozdziale 4**, zbadaliśmy długoterminową skuteczność shRNA oraz sztucznego miRNA przeciwko genowi ApoB (odpowiednio shApoB i miApoB) w warunkach *in vivo*. Jako dodatkowy zabezpieczenie miApoB było produkowane przez promotor polimerazy RNA klasy II, specyficzny dla komórek wątroby (LP1 promotor). Zarówno AAV-shApoB oraz AAV-miApoB spowodowały silne wyciszenie genu ApoB, co zaowocowało wyraźnym fenotypem w postaci obniżonego poziomu cholesterolu we krwi. Co ciekawe, silny efekt wyciszenia genu ApoB przez AAV-shApoB szybko ustał, podczas gdy efekt wywołany przez AAV-miApoB był bardziej długotrwały. Analiza shApoB i miApoB ujawniła, że obydwie cząsteczki ulegają różnej obróbce w komórkach, co może wpływać na ich selektywność w wyciszaniu genów oraz efekty uboczne.

Skutki różnicowej obróbki oraz działania shApoB oraz miApoB były kolejno badane przez nas w **rozdziale 5** poprzez analizę histologiczną, transkryptomu (profilu ekspresji genów) oraz komórkowych szlaków metabolicznych. Co ciekawe, wyłącznie AAV-shApoB spowodował wzrost ilości dzielących się komórek wątroby (hepatocytów) oraz wzrost ekspresji genów biorących udział w procesach rozmnażania i śmierci komórek oraz odpowiedzi immunologicznej. Ponadto, wpływ shApoB oraz miApoB na profile ekspresji komórkowego miRNA był także różny

W **rozdziale 6**, w celu dalszego zwiększenia bezpieczeństwa i skuteczności terapii genowej, zaprojektowaliśmy i przetestowaliśmy system do regulowanej ekspresji sztucznych cząsteczek miRNA. W tym celu użyliśmy system GeneSwitch który może być regulowany związkiem chemicznym- Mifepristonem. W celach ulepszenia właściwości systemu tzn. zmniejszenia podstawowej ekspresji oraz zwiększenia maksymalnej aktywacji systemu, poszczególne komponenty systemu zostały szczegółowo zbadane. W badaniach *in vitro* wykazaliśmy, że system GeneSwitch umożliwia specyficzne oraz regulowane, w zależności od dawki, wyciszenie docelowego genu. Nasze badania wskazują, że system może być stosowany w przyszłości w celach terapii genowej opartej na RNAi.

Podsumowując, wykazaliśmy, że terapia genowa za pomocą wirusów AAV oraz sztucznych cząsteczek miRNA jest obiecującą metodą leczenia FH oraz innych chorób wątroby. Badania mechanistyczne wykazały różnice w obróbce i funkcjonowaniu shRNA i miRNA w warunkach *in vivo*. Nasze wyniki mają istotny wpływ na zrozumienie oraz rozwiązanie problemów związanych z bezpieczeństwem i skutkami ubocznymi terapii genowej opartej na zastosowaniu wirusów AAV i interferencji RNA.