

KATARZYNA PIEKAROWICZ

WEKTOR WIRUSOWY ZAWIERAJĄCY
MIĘŚNIOWO-SPECYFICZNY PROMOTOR HYBRYDOWY JAKO
NARZĘDZIE W TERAPII GENOWEJ LAMINOPATII

STRESZCZENIE

Dystrofie mięśniowe to zróżnicowana grupa obecnie nieuleczalnych chorób genetycznych, a najbardziej obiecującą perspektywą leczenia wydaje się być terapia genowa. W ramach niniejszej pracy opracowano układ modelowy do analizy dystrofii mięśniowej Emery-Dreifussa, zaproponowano strategię terapii, opracowano jej kluczowe elementy i przygotowano wektor z lekiem genetycznym.

Lek genetyczny i układ modelowy. Wybrano białko fuzyjne EGFP-prelamina A jako lek genetyczny optymalny na tym etapie badań, możliwy do zastosowania w układzie modelowym *in vivo* (myszy pozbawione laminy A). Ponadto prowadzono badania nad układem modelowym *in vitro*, który w przyszłości pozwoli na testowanie efektywności terapii dla dominującej postaci choroby: wyprowadzono komórki z biopsji od współpracujących pacjentów oraz przygotowano i analizowano linie komórkowe nadprodukujące mutanty laminy A. Wskazano potencjalne mechanizmy reakcji komórek układu modelowego na zbyt wysoki poziom nadprodukcji – specyficzne usuwanie laminy A w komórkach na wczesnym etapie różnicowania oraz przejściowa redystrybucja laminy C. Przeprowadzono charakterystykę nowych mutacji laminy A (L263P, D446V) w odniesieniu do kontrolnych, opisując ich wpływ na fenotyp i tempo proliferacji komórek.

Kaseta ekspresyjna. Opracowano nowatorski promotor zapewniający wysoką aktywność w komórkach mięśniowych. Przeprowadzono analizę poszczególnych elementów funkcjonalnych, wskazano kluczowe oraz te, które mogą być w przyszłości usunięte, gdyby szczegółowe testy wykazały zbyt niską

specyficzność. Badano aktywność z zastosowaniem zróżnicowanych układów: przejściowej transfekcji z zastosowaniem wydzielniczej lucyferazy lub EGFP, wektora lentiwirusowego, wektora AAV. Wykazano brak toksyczności ekspresji cDNA kodującego laminę A pod kontrolą zaprojektowanego promotora w komórkach mięśniowych oraz jej poprawną lokalizację. Przeprowadzono wstępne testy na modelu zwierzęcym, potwierdzające wysoką aktywność promotora *in vivo*.

Nośnik leku genetycznego. Przeprowadzono staranną analizę dostępnych nośników w oparciu o dane literaturowe, w tym o wnioski płynące z dotychczasowych badań klinicznych. Testowano wektory wirusowe: lentiwirusowe pseudotypowane różnymi glikoproteinami, adenowirusowe i AAV. Jako nośnik do testów na modelu komórkowym oraz do potencjalnej terapii *ex vivo* wybrano wektor lentiwirusowy z otoczką VSVg i testowano jego kompatybilność z kasetą ekspresyjną oraz z transgenem. Do terapii systemowej wybrano AAV-9 i wykazano jego kompatybilność z kasetą ekspresyjną.

Opracowano wektor z kasetą ekspresyjną, który może być następnie stosowany w terapii różnych typów dystrofii mięśniowych, z zastosowaniem szeregu strategii terapeutycznych (nadprodukcja, korekcja genu, wyciszenie itp.), w tym do testów skuteczności terapii EDMD.