

Maciej Dąbrowski

Stymulowany aminoglikozydami
translacyjny odczyt przedwczesnych
kodonów STOP w wybranych genach
zaangażowanych w patogenezę
pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD)

M O N O G R A F I A

Copyright © Mgr Maciej Dąbrowski
Copyright © Instytut Genetyki Człowieka PAN
Poznań 2018

Recenzenci naukowci – prof. dr hab. Ewa Ziętkiewicz
dr Zuzanna Bukowy-Bieryłło
Projekt okładki – Mirka Korbańska
Zdjęcia i ilustracje pochodzą ze zbiorów autora

978-83-950393-0-0

Wydawca
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
www.igcz.poznan.pl

Maciej Dąbrowski

Stymulowany aminoglikozydami
translacyjny odczyt przedwczesnych
kodonów STOP w wybranych genach
zaangażowanych w patogenezę
pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD)

STRESZCZENIE

Mutacje nonsensowne wprowadzają przedwczesne kodony STOP (ang. *premature termination codons*; PTC) w regionie kodującym mRNA, prowadząc do niewłaściwej terminacji translacji a w efekcie, do powstania niefunkcjonalnych białek. Szacuje się, że obecność PTC jest przyczyną około 20% wszystkich chorób genetycznych. Translacyjny odczyt PTC (PTC *readthrough*) indukowany związkami chemicznymi jest metodą potencjalnie pozwalającą na przywrócenie ekspresji funkcjonalnych białek oraz redukcję objawów choroby, bez ingerencji w genom lub transkryptom pacjenta.

W niniejszej pracy zbadano zdolność wybranych antybiotyków aminoglikozydowych (ang. *aminoglycosides*; AAGs) do stymulacji PTC *readthrough* w genach, których mutacje są przyczyną pierwotnej dyskinezy rzęsek (ang. *primary ciliary dyskinesia*; PCD), choroby powodującej upośledzenie ruchliwości rzęsek obecnych w organizmie. Wpływ różnych stężeń kilku AAGs na PTC *readthrough* był badany w dwóch systemach eksperymentalnych: *in vitro* oraz *ex vivo*, przy użyciu konstruktów zawierających sekwencje PTC wraz z bliskim otoczeniem nukleotydowym. Wydajność PTC *readthrough* analizowano w odniesieniu do 17 mutacji w genach związanych z patogenezą PCD. Badania obejmowały także analizę cytotoksyczności AAGs dla komórek nabłonka oddechowego oraz ich wpływu na funkcję i tworzenie się rzęsek.

Dla pięciu analizowanych mutacji zaobserwowano PTC *readthrough*, wydajność tego procesu różniła się w zależności od typu PTC oraz zastosowanego stężenia i rodzaju AAGs. W eksperymentach *in vitro* poziom PTC *readthrough* wynosił między 1% a 28% poziomu translacji konstruktów typu dzikiego (nie zawierających przedwczesnego kodonu STOP). W warunkach *ex vivo* (transfekowane linie komórek HEK293), mimo zastosowania stężeń AAGs większych o dwa rzędy wielkości, supresja PTC była 3-5 razy niższa niż w warunkach *in vitro*. Ponadto, najbardziej efektywny AAGs, G418, był również najbardziej toksyczny dla komórek nabłonka oddechowego i w wyższych stężeniach wpływał negatywnie na tworzenie się rzęsek. Pozostałe AAGs (gentamycyna, paromomycyna i amikacyna), nie wykazywały zwiększonej toksyczności dla komórek nabłonka.

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy pozwoliły wytypować cztery najlepiej odpowiadające PTC i wybrać najbardziej efektywne AAGs. Równocześnie, badania wskazały na potrzebę poszukiwania dalszych związków indukujących PTC *readthrough*, o znacznie niższej toksyczności i większej przenikalności przez błonę komórkową.

SUMMARY

Nonsense mutations introduce premature termination codons (PTC) in the coding region of mRNA, leading to inappropriate termination of translation and, as a result, to the formation of non-functional proteins. It is estimated that the presence of PTC accounts for approximately 20% of all genetic diseases. Translational PTC readthrough induced by chemical compounds is a method, which potentially allows the restoration of functional protein expression and reduction of disease symptoms, without interfering with the patient's genome or transcriptome.

This work describes the investigation of the ability of selected aminoglycoside antibiotics (aminoglycosides; AAGs) to stimulate the translational readthrough of selected PTCs in genes, mutations in which are the cause of primary ciliary dyskinesia (PCD), inherited genetic disorder caused by the dysfunction of motile cilia and flagella. The effect of several AAGs on PTC readthrough has been studied in two experimental systems: *in vitro* and *ex vivo*, using constructs containing PTC sequences and its close nucleotide neighborhood. The efficiency of the PTC readthrough process in 17 mutations in five genes related to PCD pathogenesis was analyzed. The studies also included analysis of AAGs cytotoxicity on primary respiratory epithelial cells and their effect on the cilia formation and functioning.

PTC readthrough was observed in five mutations analyzed and its efficiency differed with the AAGs type and concentration. In *in vitro* experiments its level varied between 1% and 28% of the translation from the corresponding wild-type constructs (without premature STOP codon). Under *ex vivo* conditions (transfected HEK293 cell line) the suppression of premature STOP codons was 3-5 times lower than corresponding values *in vitro*, despite using AAGs concentrations that were two orders of magnitude higher. In addition, the most effective AAGs- G418 was also the most toxic to the cells and in higher concentrations had a negative effect on cilia formation. The AAGs tested (gentamicin, paromomycin and amikacin) had no toxic effects on the epithelial respiratory cells.

The results obtained in this study allowed to identify four best-responding PTCs and select the most effective types of AAGs. At the same time, project indicated the need to look for other compounds that induce PTC readthrough, with significantly lower toxicity and higher permeability through the cell membrane.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	1
SUMMARY.....	2
SPIS TREŚCI.....	3
SPIS TABEL I RYCIN	7
RYCINY:	7
TABELE:	8
RYCINY UZUPEŁNIAJĄCE:	8
TABELE UZUPEŁNIAJĄCE:	8
SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	10
1. WSTĘP	12
1.1. TERMINACJA TRANSLACJI.....	12
1.1.1. Zarys procesu terminacji translacji.....	12
1.1.2. Terminacja translacji u prokariotów.....	13
1.1.3. Terminacja translacji u eukariotów	13
1.2. TRANSLACYJNY ODCZYT KODONÓW STOP.....	14
1.3. WYDAJNOŚĆ TRANSLACYJNEGO ODCZYTU KODONÓW STOP	16
1.3.1. Wpływ tożsamości kodonów STOP	16
1.3.2. Wpływ sekwencji 3'	16
1.3.3. Wpływ sekwencji 5'	17
1.3.4. Sugerowane mechanizmy wpływu sekwencji otaczających kodony STOP	18
1.3.5. Pozostałe czynniki wpływające na translacyjny odczyt kodonów STOP.....	19
1.4. ROLA TRANSLACYJNEGO ODCZYTU KODONÓW STOP U EUKARIONTÓW	19
1.5. PRZEDWCZESNE KODONY STOP	20
1.5.1. Podłoże molekularne	20
1.5.2. Manifestacja fenotypowa	20
1.5.3. <i>Nonsense mediated mRNA decay</i> (NMD)	20
1.5.4. Strategie eksperymentalnego niwelowania wpływu PTC	22
1.6. PTC <i>READTHROUGH</i>	23
1.7. ZWIĄZKI AMINOGLIKOZYDOWE WYKAZUJĄCE ZDOLNOŚĆ STYMULACJI PTC <i>READTHROUGH</i>	24
1.7.1. Budowa i mechanizm działania.....	24
1.7.2. Terapeutyczny potencjał PTC <i>readthrough</i> stymulowanego AAGs.....	25
1.7.3. Toksyczność AAGs	27
1.8. ZWIĄZKI NIE-AMINOGLIKOZYDOWE STYMULUJĄCE PTC <i>READTHROUGH</i>	30

1.8.1. Mimetyki AAGs.....	31
1.9. STYMULACJA READTHROUGH POPRZEC INHIBICJĘ PROCESU NMD	34
1.9.1. Inhibitory NMD.....	35
1.10. ZASTOSOWANIE STYMULOWANEGO PTC <i>READTHROUGH</i> W ODNIESIENIU DO GENÓW ZAANGAŻOWANYCH W PATOGENEZĘ PIERWOTNEJ DYSKINEZY RZĘSEK	36
1.10.1. Pierwotna dyskieneza rzęsek	36
1.10.2. Budowa rzęsek.....	39
1.10.3. Genetyczne podłoże PCD	39
2. CEL PRACY	40
3. MATERIAŁY	41
3.1. MATERIAŁ BIOLOGICZNY	41
3.2. WEKTOR REPORTEROWY pDLUC	41
3.2.1 Zasada działania wektora pDluc	41
3.3. SPIS UŻYWANYCH ODCZYNNIKÓW I SPRZĘTÓW	42
4. METODY	43
4.1. PRZYGOTOWANIE REKOMBINOWANYCH WEKTORÓW	43
4.1.1. Przygotowanie wstawek metodą amplifikacji PCR	43
4.1.2. Metoda syntezy chemicznej.....	45
4.1.3. Ligacja	46
4.2. NAMNAŻANIE ZREKOMBINOWANEGO PLAZMIDU W BAKTERIACH	47
4.2.1. Bakterie elektrokompetentne	47
4.2.2. Transformacja i selekcja bakterii.....	47
4.2.3. Kolonijny PCR	48
4.2.4. Izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej.....	49
4.2.5. Sekwencjonowanie plazmidowego DNA	49
4.2.6. <i>Stocki</i> glicerolowe.....	49
4.2.7. Izolacja plazmidowego DNA za pomocą zestawu <i>MaxiPrep</i>	49
4.3. TRANSKRYPCJA I TRANSLACJA <i>IN VITRO</i> (TnT)	50
4.3.1. Reakcja TnT	50
4.3.2. Rozdział białek na żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.	50
4.3.3. Analiza densytometryczna obrazu żeli poliakrylamidowych.....	51
4.4. HODOWLE KOMÓREK NABŁONKA ODDECHOWEGO	52
4.4.1. Wysiewanie komórek nabłonka oddechowego.....	52
4.4.2. Metoda sekwencyjna hodowli komórek nabłonka oddechowego.....	53
4.4.3. Hodowla komórek nabłonka oddechowego na styku fazy ciekłej i powietrza (ALI)	54
4.4.4. Potwierdzenie obecności rzęsek na zróżnicowanych komórkach nabłonka oddechowego.	54
4.5. BARWIENIA IMMUNOFLUORESCENCYJNE	55
4.5.1. Przygotowanie preparatów do immunofluorescencji.....	55
4.5.2. Protokół barwienia immunofluorescencyjnego	56

4.6. SKANINGOWA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA (SEM)	56
4.6.1. Przygotowanie preparatów z hodowli sekwencyjnej do skaningowego mikroskopu elektronowego	56
4.6.2. Przygotowanie preparatów z hodowli ALI do skaningowego mikroskopu elektronowego.....	57
4.7. WIDEOMIKROSKOPIA	57
4.8. HODOWLA KOMÓREK HEK293	57
4.8.1. Transfekcja komórek HEK293	58
4.8.2. Analiza <i>Dual-Luciferase</i>	58
4.9. ANALIZY DODATKOWE.....	59
4.9.1. Pomiar zmiany wartości oporu elektrycznego w hodowli ALI.....	59
4.9.2. Przesiewowe badanie toksyczności szerokiego zakresu stężeń związków NAGs.....	59
4.9.3. Analiza cytotoksyczności AAGs i NAGs za pomocą zestawu <i>MultiTox-Fluor</i>	59
4.9.4. Szybkoklatkowa wideomikroskopia <i>Time-lapse</i>	60
5. WYNIKI.....	61
5.1. SELEKCJA MUTACJI WPROWADZAJĄCYCH PTC W GENACH ZWIĄZANYCH Z PATOGENEZĄ PCD	61
5.2. OPTYMALIZACJA METODY PRZYGOTOWYWANIA KONSTRUKTÓW ZAWIERAJĄCYCH SEKWENCJE Z PTC ...	64
5.2.1. Wektory reporterowe ze wstawkami otrzymanymi metodą amplifikacji PCR.....	64
5.2.2. Wektory reporterowe ze wstawkami otrzymanymi metodą syntezy chemicznej	65
5.3. ANALIZA EFEKTYWNOŚCI PROCESU PTC <i>READTHROUGH</i> STYMULOWANEGO AAGs W SYSTEMIE	
TRANSKRYPCJI/ TRANSLACJI (TnT) <i>IN VITRO</i>	67
5.3.1. Wybór stężeń AAGs do eksperymentów TnT <i>in vitro</i>	67
5.3.2. Pomiar efektywności procesu PTC <i>readthrough</i> stymulowanego AAGs w systemie TnT <i>in vitro</i>	70
5.4. POMIAR EFEKTYWNOŚCI PROCESU PTC <i>READTHROUGH</i> STYMULOWANEGO AAGs W SYSTEMIE <i>EX VIVO</i> ..	73
5.5. PORÓWNANIE PODATNOŚCI NA SUPRESJĘ SYGNAŁU TERMINACJI ANALIZOWANYCH PTC W OBU	
SYSTEMACH EKSPERYMENTALNYCH.....	75
5.6. WPŁYW AAGs NA KOMÓRKI PIERWOTNE NABŁONKA ODDECHOWEGO	78
5.6.1. Ocena wielkości sferoidów.....	78
5.6.2. Ocena stopnia orzęsienia sferoidów.....	79
5.6.2.1. Analiza z użyciem wideomikroskopii szybkoklatkowej	79
5.6.2.2. Analiza immunofluorescencyjna.....	80
5.7. PODSUMOWANIE	81
5.8. WYNIKI DODATKOWE.....	82
5.8.1. Przesiewowe badanie toksyczności NAGs	82
5.8.2. Analiza cytotoksyczności AAGs i NAGs za pomocą zestawu <i>MultiTox</i>	82
5.8.3. Wpływ związków na integralność i przepuszczalność warstwy komórek nabłonka w hodowli ALI.	83
5.8.4. Wpływ AAGs i NAGs na ruchliwość rzęsek (mikroskopia <i>Time-lapse</i>).....	86
6. DYSKUSJA.....	88
6.1. WYBÓR JEDNOSTKI CHOROBOWEJ	88
6.2. WPŁYW BADANYCH STĘŻEŃ AAGs NA PTC <i>READTHROUGH</i>	89
6.3. WPŁYW KODONU STOP I NUKLEOTYDU +4 NA PTC <i>READTHROUGH</i>	90

6.4. STABILNOŚĆ TRANSKRYPTÓW - WPŁYW PROCESU NMD	89
6.5. WPŁYW ZWIĄZKÓW STYMULUJĄCYCH NA KOMÓRKI NABŁONKA	89
6.6. BIODOSTĘPNOŚĆ ZWIĄZKÓW STYMULUJĄCYCH PTC <i>READTHROUGH</i>	94
6.7. WYBRANE PROBLEMY ZWIĄZANE Z PERSPEKTYWĄ KLINICZNEGO ZASTOSOWANIA TERAPII WYKORZYSTUJĄCYCH PODEJŚCIE PTC <i>READTHROUGH</i>	95
6.7.1. Aminokwas wbudowany na skutek PTC <i>readthrough</i> , a funkcjonalność białka.....	95
6.7.2. Poziom transkryptu w komórkach a genomowe mutacje PTC	100
6.7.3. Ilość białka potrzebna do zniesienia/złagodzenia symptomów chorobowych.....	101
6.7.4. Skuteczna dawka i sposób podawania związków stymulujących proces PTC <i>readthrough</i>	102
6.8. ZNACZENIE OTRZYMANYCH WYNIKÓW DLA ROZWOJU DZIEDZINY NAUKOWEJ ORAZ ROZWOJU CYWILIZACYJNEGO	103
7. WNIOSKI	105
8. LITERATURA	106
9. MATERIAŁY DODATKOWE	122

SPIS TABEL I RYCIN

Ryciny:

RYCINA 1. SCHEMATYCZNE PRZEDSTAWIENIE KOMPLEKSU OBU PODJEDNOSTEK RYBOSOMU WRAZ Z NOWOPOWSTAŁYM ŁAŃCUCHEM POLIPEPTYDOWYM.....	12
RYCINA 2. GŁÓWNE ELEMENTY KOMPLEKSU TERMINUJĄCEGO TRANSLACJĘ U EUKARIONTÓW.	14
RYCINA 3. ZASADA TRANSLACYJNEGO ODCZYTU KODONÓW STOP.....	15
RYCINA 4. UPROSZCZONY SCHEMAT INICJACJI DEGRADACJI TRANSKRYPTÓW NA SZLAKU NMD.....	21
RYCINA 5. PROCES TRANSLACJI.....	23
RYCINA 6. SCHEMATY BUDOWY AMINOGLIKOZYDÓW.....	25
RYCINA 7. ZWIĄZKI Z GRUPY NB	30
RYCINA 8. SCHEMAT BUDOWY ATALURENU.	31
RYCINA 9. SCHEMAT BUDOWY TYLOZYNY.	32
RYCINA 10. SCHEMAT BUDOWY ESCYNY.....	33
RYCINA 11. SCHEMAT BUDOWY KLITOCYNY.	34
RYCINA 12. SCHEMAT BUDOWY AMLEKSANOKSU	35
RYCINA 13. FRAGMENT ORZĘSIONEGO NABŁONKA ODDECHOWEGO.....	37
RYCINA 14. BUDOWA RZĘSKI	38
RYCINA 16. ZASADA DETEKЦИИ PTC <i>READTHROUGH</i> W PLAZMIDZIE PDLUC.....	42
RYCINA 15. BUDOWA PLAZMIDU PDLUC.....	42
RYCINA 17. ANALIZA ŻELI POLIAKRYLOAMIDOWYCH PO REAKCJI TNT.	51
RYCINA 18. ZASADA HODOWLI KOMÓREK NABŁONKA ODDECHOWEGO METODĄ ALI.....	54
RYCINA 19. POTWIERDZENIE OBECNOŚCI RZĘSEK NA ZRÓŻNICOWANYCH KOMÓRKACH NABŁONKA ODDECHOWEGO.....	55
RYCINA 20. LOKALIZACJA WYBRANYCH MUTACJI PTC W GENACH DNAH5, DNAH11, RSPH4A, SPAG1 I CCDC40 ORAZ NA CHROMOSOMACH.	61
RYCINA 21. PRZYKŁADOWY SCHEMAT STRUKTURY WSTAWKI	62
RYCINA 22. PRZYKŁADOWY WYNIK REAKCJI KOŁONIJNEGO PCR.....	66
RYCINA 23. PRZYKŁADOWY CHROMATOGRAM DLA KONSTRUKTU ZAWIERAJĄCEGO WSTAWKĘ DNAH5_32. ...	67
RYCINA 24. POWSTAWANIE PRODUKTÓW BIAŁKOWYCH NA SKUTEK TRANSKRYPCJI I TRANSLACJI PLAZMIDU PDLUC.	68
RYCINA 25. WPŁYW AAGS NA WYDAJNOŚĆ TRANSLACJI	69
RYCINA 26. POZIOM PTC <i>READTHROUGH</i> OBSERWOWANY W WARUNKACH <i>IN VITRO</i>	71
RYCINA 27. POZIOM PTC <i>READTHROUGH</i> OBSERWOWANY W WARUNKACH <i>EX VIVO</i>	74
RYCINA 28. ANALIZA HSVI ORZĘSIONEGO SFEROIDU W PROGRAMIE <i>SAVA</i>	79
RYCINA 29. WYNIKI ANALIZY CYTOTOKSYCZNOŚCI Z WYKORZYSTANIEM ZESTAWU <i>MULTITOX</i>	83
RYCINA 30. ANALIZA WPŁYWU UŻYTYCH ROZPUSSZCZALNIKÓW NA INTEGRALNOŚĆ NABŁONKA ODDECHOWEGO.....	85
RYCINA 31. ANALIZA WPŁYWU NAGS NA INTEGRALNOŚĆ NABŁONKA ODDECHOWEGO.....	85

RYCINA 32. WPŁYW ZWIĄZKÓW STYMULUJĄCYCH PTC <i>READTHROUGH</i> LUB ICH ROZPUSZCZALNIKÓW NA CZĘSTOTLIWOŚĆ BICIA RZĘSEK NABŁONKA ODDECHOWEGO.	89
RYCINA 33. WPŁYW ZWIĄZKÓW STYMULUJĄCYCH PTC <i>READTHROUGH</i> LUB ICH ROZPUSZCZALNIKÓW NA PROCENT BIĄCYCH RZĘSEK W POLU WIDZENIA.	87
RYCINA 34. POŁOŻENIE BADANYCH SUBSTYTUCJI AMINOKWASOWYCH W ODNIESIENIU DO LOKALIZACJI FUNKCJONALNYCH DOMEN W BIAŁKACH.	99

Tabele:

TABELA 1. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH MUTACJI WPROWADZAJĄCYCH PTC W GENACH ZAANGAŻOWANYCH W PATOGENEZĘ PCD.	63
TABELA 2. WYDAJNOŚĆ PTC <i>READTHROUGH</i> W EKSPERYMENTACH PROWADZONYCH W WARUNKACH <i>IN VITRO</i> (SYSTEM TNT)	72
TABELA 3. WYDAJNOŚĆ PTC <i>READTHROUGH</i> W EKSPERYMENTACH W WARUNKACH <i>EX VIVO</i>	75
TABELA 4. PODATNOŚCI BADANYCH KONSTRUKTÓW NA STYMULOWANY PTC <i>READTHROUGH</i>	76
TABELA 5. PORÓWNANIE POZIOMU STYMULOWANEGO PTC <i>READTHROUGH</i> WZGLĘDEM SEKWENCJI KODONU STOP ORAZ NUKLEOTYDU W POZYCJI +4.	77
TABELA 6. BLISKOZNACZNE ANTYKODONY DLA TRZECH KODONÓW STOP.	97
TABELA 7. POZYCJE PTC PROWADZĄCYCH DO POTENCJALNYCH SUBSTYTUCJI AMINOKWASOWYCH W BIAŁKACH DNAH5 I DNAH11.	98
TABELA 8. WPŁYW SUBSTYTUCJI AMINOKWASOWYCH WPROWADZANYCH PRZEZ ODCZYT BADANYCH PTC ODPOWIEDAJĄCYCH NA STYMULACJĘ AAGS.	98

Ryciny uzupełniające:

RYCINA UZUPEŁNIAJĄCA 1. PRZYKŁADOWE WYNIKI SEKWENCJONOWANIA KONSTRUKTÓW ZE WSTAWKAMI WYTWORZONYMI METODĄ PCR.	122
RYCINA UZUPEŁNIAJĄCA 2. PRZYKŁADOWE WYNIKI SEKWENCJONOWANIA KONSTRUKTÓW ZE WSTAWKAMI WYTWORZONYMI METODĄ SYNTEZY CHEMICZNEJ OLIGONUKLEOTYDÓW.	124

Tabele uzupełniające:

TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 1. POŻYWKI DO HODOWLI KOMÓREK LINII HEK293.	124
TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 2. POŻYWKI DO HODOWLI KOMÓREK PIERWOTNYCH NABŁONKA ODDECHOWEGO METODĄ ALI.	125
TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 3. POŻYWKI DO HODOWLI BAKTERII <i>E. COLI</i>	125
TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 4. POŻYWKI DO HODOWLI SEKWENCYJNEJ KOMÓREK PIERWOTNYCH NABŁONKA ODDECHOWEGO.	125
TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 5. SEKWENCJE STARTERÓW I OLIGONUKLEOTYDÓW WYKORZYSTYWANYCH W BADANIACH.	126
TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 6. WYKORZYSTYWANY SPRZĘT LABORATORYJNY.	129

TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 7. ŻELE POLIAKRYLAMIDOWE I AGAROWE ORAZ BUFORY STOSOWANE W TRAKCIE BADAŃ	130
TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 8. WYKORZYSTYWANE KOMERCYJNE ZESTAWY ODCZYNNIKÓW.....	132
TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 9. SPIS DOSTAWCÓW USŁUG ZEWNĘTRZNYCH.	132
TABELA UZUPEŁNIAJĄCA 10. SPIS UŻYWANYCH ODCZYNNIKÓW.....	133

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 3'UTR – ang. *3'untranslated region*; rejon 3' niepodlegający translacji
- AAGs – ang. *aminoglycoside antibiotics*; antybiotyki aminoglikozydowe
- ALI – ang. *air-liquid interface*; hodowla komórek nabłonka oddechowego na styku fazy ciekłej i powietrza
- AMLX – ang. *amlexanox*, amleksanoks
- ATAL – ang. *ataluren*
- AZTM – ang. *azitromycin*; azytromycyna
- CP – ang. *central pair*; para centralna
- DMD – ang. *Duchenne muscular dystrophy*; dystrofia mięśniowa Duchenne'a
- dNTP – ang. *deoxynucleotides*; deoksynukleotydy
- eIF3 – ang. *eukaryotic translation initiation factor*; eukariotyczny czynnik inicjacji translacji
- EJC – ang. *exon junction complex*; kompleks białkowy występujący w miejscu połączeń eksonów po składaniu pre-mRNA
- eRF1/3 – ang. *eukaryotic release factor 1/3*; eukariotyczny czynnik uwalniający
- GTP – ang. *guanosine-triphosphate*; tri-fosforan guanozyny
- HSVM – ang. *high speed videomicroscopy*, wideomikroskopia szybkoklatkowa
- IDA – ang. *inner dynein arms*; wewnętrzne ramiona dyneinowe
- LDHB – ang. *lactate dehydrogenase subunit B*; podjednostka B dehydrogenazy mleczanowej
- MDH1 – ang. *malate dehydrogenase 1*, dehydrogenaza jabłczanowa typu I
- mRNA – ang. *matrix RNA*; matrycowe RNA
- NAGs – ang. *non-aminoglycoside compounds*; związki nie-aminoglikozydowe
- nc-tRNA – ang. *near-cognate-tRNA*; bliskoznaczne tRNA
- N-DRC – ang. *nexin-dynein regulatory complex*; neksynowo-dyneinowy kompleks regulatorowy
- NMD – ang. *nonsense-mediated mRNA decay*; szlak degradacji nonsensownych transkryptów
- NSCCs – ang. *non-selective cation channels*, nieselektywne kanały kationowe
- nt – nukleotyd
- NTC – ang. *normal termination codon*; normalny kodon STOP

ODA – ang. *outer dynein arms*; zewnętrzne ramiona dyneinowe

PAA – ang. *poly-L-aspartic acid*; kwas poli-L-asparaginowy

PABP – ang. *poly(A)-binding protein*; białko wiążące sekwencję poli (A)

PF – ang. *paraformaldehyde*; paraformaldehyd

PCD – ang. *primary ciliary dyskinesia*; pierwotna dyskineza rzęsek

PCR – ang. *polymerase chain reaction*; łańcuchowa reakcja polimerazy

PTC – ang. *premature termination codons*; przedwczesny kodon STOP

PTC *readthrough* – ang. *premature termination codons readthrough*; translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP

pz- para zasad nukleotydowych

ROS – ang. *reactive oxygen species*; reaktywne formy tlenu

rpm – ang. *revolutions per minute*; obroty na minutę

rRNA – ang. *ribosomal RNA*; rybosomalne RNA

siRNA – ang. *small interfering RNA*; małe interferujące RNA

RT- ang. *room temperature*; temperatura pokojowa

TEER- ang. *transepithelial electrical resistance*; wartości oporu elektrycznego poprzez warstwę komórek nabłonka oddechowego

T_m – ang. *melting temperature*; temperatura topnienia

TnT- ang. TnT®*Transcription/Translation System* (Promega), System translacji/transkrypcji TnT firmy Promega

tRNA – ang. *transfer RNA*; transportujące RNA

TYL– ang. *tylosin*, tylozyna

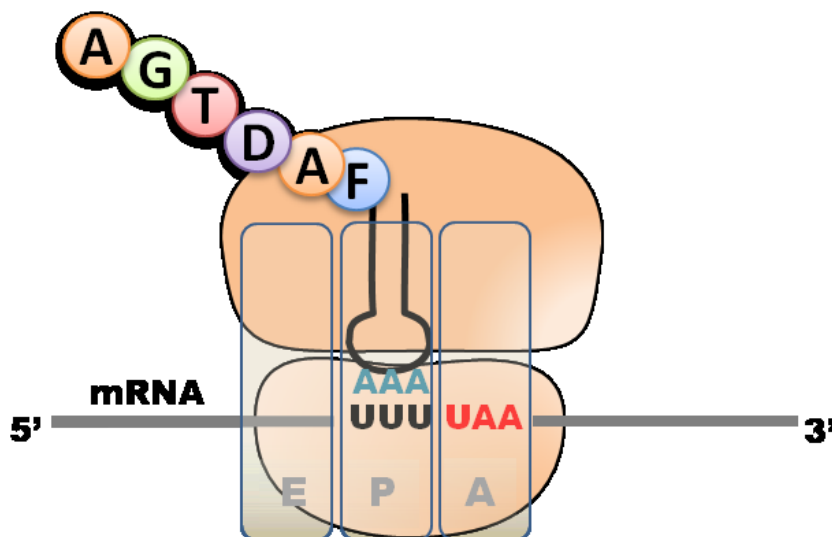
VEGF-A – ang. *human vascular endothelial growth factor A*; ludzki czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego typu A

1. WSTĘP

1.1. Terminacja translacji

1.1.1. Zarys procesu terminacji translacji

Terminacja translacji jest jednym z najbardziej skomplikowanych etapów biosyntezy białka. Proces ten rozpoczyna się, gdy kodon STOP (o sekwencji UAA, UGA lub UAG), obecny na 3' końcu transkryptu, znajdzie się w miejscu A małej podjednostki rybosomu¹. Częsteczki tRNA posiadające antykodony komplementarne do kodonów STOP i zdolne do ich odczytu występują w komórce jedynie w nielicznych wypadkach (np. selenocysteina²). Zazwyczaj, gdy w miejscu A małej podjednostki rybosomu znajduje się kodon STOP, zamiast tRNA do kodonu STOP zostają przyłączone białka uwalniające (ang. *release factor*, RF). Na skutek ich aktywności dochodzi do odłączenia nowopowstałego łańcucha polipeptydowego od peptydylo-tRNA ulokowanego w rybosomalnym miejscu P³ (Ryc. 1). Następnie, rybosom dysocjuje na dwie podjednostki, dużą i małą, które są później wykorzystywane w kolejnych rundach translacji.



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie kompleksu obu podjednostek rybosomu wraz z nowopowstałym łańcuchem polipeptydowym.

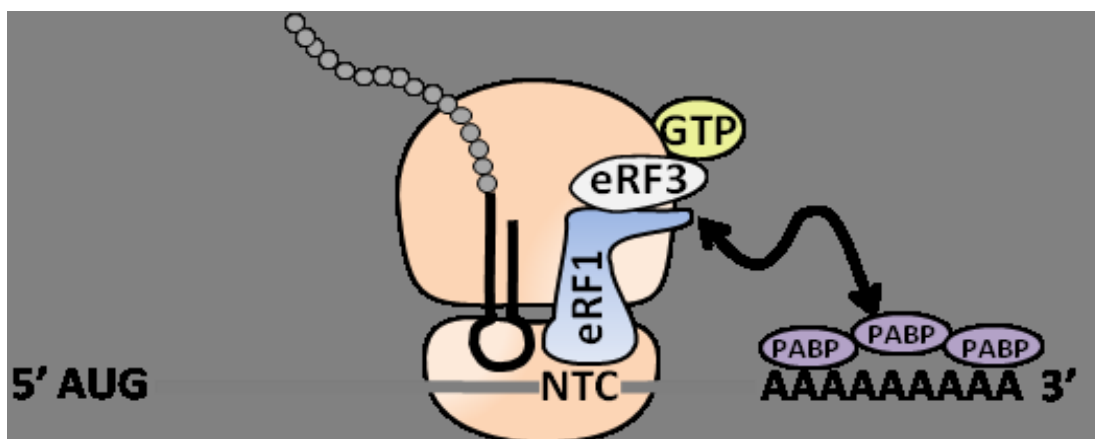
Zarówno u prokariotów jak i eukariotów w procesie terminacji translacji pośredniczą dwie klasy czynników uwalniających (I i II)⁴. Czynniki klasy I odpowiadają za rozpoznanie kodonu STOP, natomiast czynnik klasy II posiada aktywność GTPazy. Mimo zbieżnej nomenklatury, budowa i mechanizm działania tych czynników są odmienne dla obu domen systematycznych³.

1.1.2. Terminacja translacji u prokariotów

U prokariotów wyróżnia się dwa czynniki uwalniające klasy I: RF1 i RF2, posiadające specyficzne sekwencje peptydowe, bezpośrednio rozpoznające kodony STOP. Czynniki RF1 oddziałuje z kodonem UAG oraz UAA, natomiast czynnik RF2 z kodonami UGA i UAA. Po związaniu z kodonem STOP, zarówno RF1 jak i RF2 pośredniczą w procesie hydrolizy wiązań estrowych między polipeptydem a tRNA^{5,6}. Następnie, RF3, czynnik uwalniający klasy II, posiadający aktywność GTPazy, odłącza czynniki klasy I od kompleksu post-terminacyjnego, umożliwiając ich ponowne wykorzystanie w komórce⁷⁻⁹.

1.1.3. Terminacja translacji u eukariotów

W terminację translacji u eukariotów, zaangażowany jest kompleks składający się z dwóch czynników uwalniających, eRF1 (klasa I) i eRF3 (klasa II)¹. Eukariotyczny czynnik eRF1 jest w stanie rozpoznać wszystkie trzy kodony STOP^{4,10,11}. Czynniki eRF1 jest białkiem o strukturze przypominającej budowę cząsteczki tRNA, zawierającym trzy domeny: N-kończową, środkową i C-kończową. Zakonserwowane ewolucyjnie reszty aminokwasowe ułożone w domenę N-kończową¹²⁻¹⁴ służą do rozpoznania kodonu STOP, podczas gdy domeny środkowa i C-kończowa eRF1 oddziałują z czynnikiem eRF3, wiążącym dodatkowo cząsteczkę GTP. Do aktywacji białka eRF3 wymagana jest dodatkowa interakcja kompleksu terminacyjnego z białkami wiążącymi się z sekwencją poli(A) (ang. *poly(A)-binding protein*, PABP) przyłączonymi do 3'UTR nici mRNA¹⁵ (Ryc. 2).



Rycina 2. Główne elementy kompleksu terminującego translację u eukariontów. AUG - miejsce startu translacji; NTC – normalne miejsce terminacji; PABP – białka wiążące poly(A); eRF1 i eRF3 – czynniki uwalniające; GTP – guanozynotrifosforan.

Oddziaływanie eRF3 z PABP prowadzi do zmiany konformacji eRF3 i do hydrolizy GTP^{16,17}. W efekcie dochodzi do prawidłowego ustawienia środkowej domeny czynnika eRF1 (jej zakonserwowanego motywu GQG) w rybosomalnym centrum transferazy peptydylowej, cięcia wiązania peptydylo-tRNA i uwolnienia łańcucha polipeptydowego z rybosomu¹⁸.

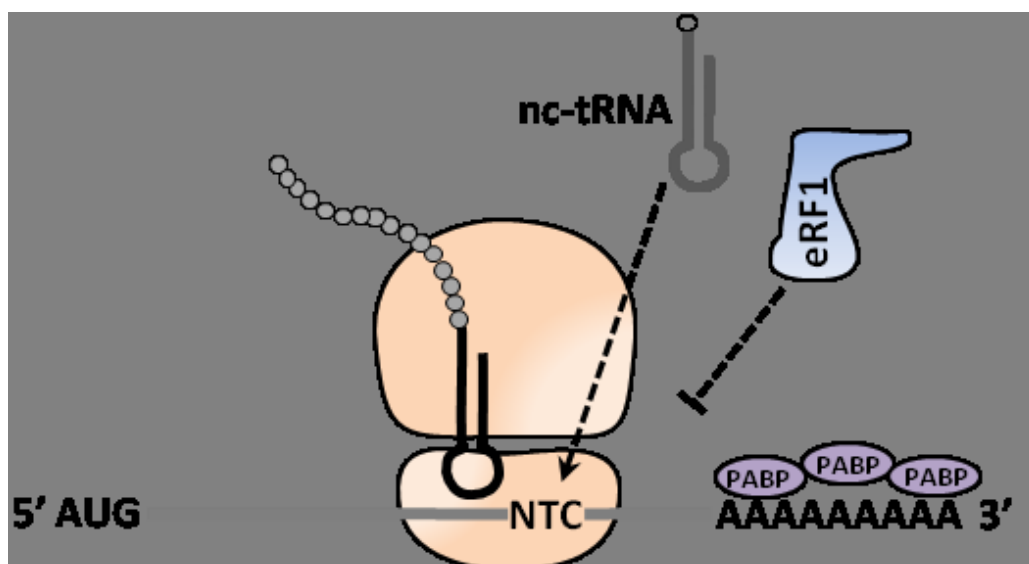
Efektywna terminacja translacji u eukariontów wymaga zatem obecności kodonu STOP w miejscu A małej podjednostki rybosomu, jego interakcji z dwoma czynnikami uwalniającymi eRF1 i eRF3, oraz bliskiego oddziaływania pomiędzy rybosomem a PABP, związanymi z 3'UTR mRNA ulegającego translacji.

1.2. Translacyjny odczyt kodonów STOP

Proces terminacji translacji nie jest w 100% skuteczny. Istnieją mechanizmy, które umożliwiają jego zablokowanie (supresję). Są to między innymi: tzw. *ribosomal frameshifting* (zmiana ramki odczytu)¹⁹, supresorowe tRNA (aminoacylo-tRNA z antykodonami komplementarnymi do kodonów STOP)^{20,21} oraz translacyjny odczyt kodonów STOP²².

Translacyjny odczyt kodonów STOP odzwierciedla konkurencję pomiędzy rozpoznaniem kodonu STOP przez czynnik eRF1 a jego rozpoznaniem przez aminoacylowane tRNA. Pierwszy scenariusz prowadzi do uruchomienia właściwego procesu zakończenia syntezy białka, natomiast drugi skutkuje supresją kodonu STOP, czyli zahamowaniem procesu terminacji translacji. W tym procesie istotną rolę odgrywają

bliskoznaczne tRNA (ang. *near-cognate-tRNA*, nc-tRNA), których antykonon jest komplementarny do kodonu STOP w dwóch z trzech jego pozycji^{23,24}. Rozpoznanie kodonu STOP przez nc-tRNA prowadzi do błędnego odkodowania (supresji) sygnału STOP, co powoduje kontynuację translacji aż do napotkania kolejnego kodonu STOP (Ryc. 3).



Rycina 3. Zasada translacyjnego odczytu kodonów STOP. Bliskoznaczne tRNA (nc-tRNA) skutecznie konkuruje z eRF1, co prowadzi do supresji kodonu STOP.

Opierając się na definicji nc-tRNA, jako posiadającego antykonon komplementarny do kodonu STOP w dwóch z trzech pozycji, można wyróżnić 23 takie nc-tRNA (Tabela 6; rozdział Dyskusja). Analiza produktów translacyjnego odczytu kodonów STOP w drożdżach wykazała jednak, że wbudowywanie aminokwasu w miejscu PTC zachodzi tylko wtedy, gdy niesparowanie tzw. *mismatch* antykononu z kodonem występuje w pozycji 3 lub 1 kodonu STOP²³.

Proces translacyjnego odczytu kodonów STOP występuje stosunkowo często u wirusów²⁵⁻²⁷, jednakże w przypadku komórek eukariotycznych jest zjawiskiem rzadziej spotykanym. Do tej pory, większość genów eukariotycznych podlegających kontrolowanemu procesowi translacyjnego odczytu kodonów STOP zidentyfikowano za pomocą porównań filogenetycznych^{28,29} lub profilowania rybosomalnego^{30,31}; tylko kilka z nich zostało zbadanych eksperymentalnie^{32,33}.

1.3. Wydajność translacyjnego odczytu kodonów STOP

Wydajność translacyjnego odczytu kodonów STOP jest złożonym zagadnieniem, ze względu na zależność tego procesu od wielu różnych czynników. Poniżej zostały przedstawione najważniejsze z nich. Szczegółowe omówienie wpływu różnych czynników na wydajność translacyjnego odczytu kodonów STOP zostało przedstawione w opublikowanej w trakcie realizowania niniejszej pracy doktorskiej pracy przeglądowej (Dąbrowski i wsp.; *RNA Biology*, 2016)²².

1.3.1. Wpływ tożsamości kodonów STOP

Wydajność translacyjnego odczytu (supresji) kodonów STOP jest odwrotnie proporcjonalna do efektywności terminacji translacji charakteryzującej te kodony. Kodon UAA charakteryzuje się najmniejszą „nieszczelnością” (ang. *leakiness*) i najrzadziej ulega supresji³⁴. Pozostałe dwa kodony STOP są bardziej „nieszczelne”, przy czym kodon UGA wykazuje największą, a kodon UAG – pośrednią podatność na supresję. Obserwacje te zostały potwierdzone w szeregu badań z wykorzystaniem różnych metod doświadczalnych^{35,36,33}. Badania eksperymentalne wykazały również, że podatność na supresję kodonów STOP zależy też od innych czynników, omówionych poniżej.

1.3.2. Wpływ sekwencji 3'

Zarówno u prokariotów jak i eukariotów, nukleotyd bezpośrednio za kodonem STOP (pozycja +4, gdzie pierwszy nukleotyd kodonu STOP oznaczany jest jako +1) wykazuje największy wpływ na wydajność terminacji translacji^{37–40}. Wpływ ten wykazano zarówno w badaniach z wykorzystaniem drożdży^{41,42} jak i u wyższych eukariotów, gdzie efekt tożsamości nukleotydu +4 był silnie związany z sekwencją kodonu STOP. Dlatego też, u eukariotów warto posłużyć się pojęciem tetranukleotydowego kodonu STOP, zamiast rozważać osobno sekwencję kodonu STOP i tożsamość następującego po nim nukleotydu (+4).

Kwestia, który tetranukleotyd ma największy wpływ na supresję terminacji translacji, pozostaje sporna. W jednym z eksperymentów pokazano, że w komórkach ssaczych, poziom translacyjnego odczytu tetranukleotydu UGA-C (3-4%) jest około 3-6 razy wyższy niż dla pozostałych tetranukleotydów UGA-N (gdzie N to nukleotyd T, G lub A). Jednakże, dla pozostałych kodonów STOP, obecność C w pozycji +4 nie wpływała znacząco na poziom supresji sygnału terminacji (dla UAG-C translacyjny odczyt kodonu

STOP wynosił 1-2%, a dla UAA-C 0,5%)^{34,43}. Z analizy sekwencji genomu muszki owocówki (łac. *Drosophila melanogaster*) wynika, iż z 280 genów podlegających supresji kodonu STOP, aż 32% zawiera kodon UGA z następującą po nim cytozyną (UGA-C). Co więcej, u *Drosophili* geny z tetranukleotydem UGA-C są blisko 10 razy bardziej podatne na supresję kodonu STOP niż geny z inną sekwencją sygnału terminacji translacji²⁸.

Badania potwierdzają, że u eukariontów kolejność kodonów STOP odzwierciedlająca ich podatność na supresję sygnału terminacji to: UGA>UAG>UAA³⁴. Z kolei, wpływ nukleotydu w pozycji +4 opisuje kolejność C>U>G>A^{22,28,40}. Wspólnym wnioskiem wynikającym z analizy szeregu danych literaturowych dotyczących wpływu sekwencji mRNA na supresję sygnału STOP jest decydująca rola cytozyny w pozycji +4, mimo niepełnej zgody odnośnie kolejności pozostałych nukleotydów. Potwierdzeniem tej tezy jest bardzo rzadkie występowanie tetranukleotydu UGA-C u ssaków, co może odzwierciedlać negatywną selekcję ewolucyjną sekwencji DNA promujących translację białek z wydłużonym C-końcem⁴⁰. Równocześnie jednak, powyższe badania wskazują, że znajomość sekwencji tetranukleotydowego kodonu STOP nie jest wystarczająca, by przewidzieć podatność danego genu na supresję sygnału terminacji translacji.

1.3.3. Wpływ sekwencji 5'

Ewolucyjne zakonserwowanie sekwencji poprzedzających miejsca terminacji translacji w genach *Escherichia coli* i człowieka sugeruje, że również sekwencja poprzedzająca kodon STOP (otoczenie 5' kodonu STOP) odgrywa istotną rolę w efektywnej terminacji translacji⁴⁴. Wykazano, że u bakterii i drożdży, przedostatni i ostatni nukleotyd przed kodonem STOP (odpowiednio, pozycje -2 i -1) mogą wpływać na efektywność supresji terminacji translacji⁴⁵. U drożdży, obecność adeniny w dwóch pozycjach bezpośrednio przed kodonem STOP stymuluje translacyjny odczyt kodonu UAG a najprawdopodobniej również pozostałych kodonów STOP^{42,46}. Jest to zgodne z obserwacją, że adenina w pozycji -1 i/lub -2 jest ewolucyjnie zakonserwowana w genach, których regulacja zachodzi poprzez translacyjny odczyt kodonu STOP. Spośród 91 roślinnych wirusowych RNA podlegających temu procesowi, aż 65 posiadało adeninę w pozycji -1, a 69 w pozycji -2; 50 z tych genów posiadało adeninę zarówno w pozycji -1 jak i -2^{21,46}. Istotność kontekstu sekwencji poprzedzającej kodon STOP w procesie translacyjnego odczytu kodonów STOP badano również w komórkach

ssaczach, jednakże wyniki nie były jednoznaczne. W eksperymencie z wykorzystaniem mysich fibroblastów (NIH3T3) i ludzkich komórek nerkowych (HEK293), najsilniejszą supresję kodonu STOP uzyskano w przypadku, gdy w pozycji -1 znajdowała się adenina, lub generalnie puryna; natomiast uracyl w pozycji -1 był zawsze związany z najniższym poziomem supresji^{33,47}.

W każdym z opisywanych w literaturze przypadków, wpływ sekwencji 5' na translacyjny odczyt kodonów STOP był znacznie mniejszy, niż kontekst sekwencji sąsiadującej z kodonem STOP od strony 3'⁴⁸.

1.3.4. Sugerowane mechanizmy wpływu sekwencji otaczających kodony STOP na ich translacyjny odczyt

Mechanizm wyjaśniający wpływ kontekstu sekwencji DNA na wydajność translacyjnego odczytu kodonów STOP jest przedmiotem wielu badań, jednakże szczegóły molekularne tego procesu nadal pozostają nie do końca opisane.

Efekt nukleotydu w pozycji +4 jest najprawdopodobniej związany z interakcją pomiędzy mRNA a aparatem translacyjnym (rybosomem), a nie jak sądzono wcześniej, wynikiem bezpośredniego oddziaływania tetranukleotydu (kodonu STOP i nukleotydu w pozycji +4) z nc-tRNA⁴⁹. Innym wytłumaczeniem, w jaki sposób sekwencja poniżej kodonu STOP może wpływać na efektywność terminacji translacji, jest zdolność nici mRNA do tworzenia struktur drugorzędowych (np. pętli i pseudowęzłów), które mogą oddziaływać z rybosomem^{50,51}. Wykazano, że taka interakcja może promować wiązanie się nc-tRNA do rybosomalnego miejsca A zamiast czynnika eRF1¹.

W odniesieniu do sekwencji 5' od kodonu STOP, sugeruje się, że adenina w pozycjach -1 i -2 może indukować translacyjny odczyt kodonów STOP poprzez zmianę struktury mRNA w rybosomalnym miejscu P. Zmiana struktury mRNA zaburza właściwą strukturę rybosomu i moduluje kompetycję pomiędzy czynnikami uwalniającymi a nc-tRNA⁴⁶.

1.3.5. Pozostałe czynniki wpływające na translacyjny odczyt kodonów STOP

Sekwencja kodonu STOP i otaczającego go DNA to nie jedyne czynniki wpływające na wydajność translacyjnego odczytu kodonów STOP. Supresja kodonów STOP zależy także od poziomu i efektywności składników maszynerii odpowiedzialnej za normalną

terminację translacji, takich jak czynniki uwalniające eRF1 lub eRF3⁵²⁻⁵⁴. Znaczny wpływ może mieć również poziom samego mRNA, które pełni funkcję matrycy w procesie translacji⁵⁵. W naturalnych warunkach, poziom ten zależy od efektywności procesu transkrypcji, który z kolei zależy jest od genu, tkanki czy warunków środowiska. Duży wpływ na poziom mRNA w komórce mają także mutacje; w przypadku mutacji wprowadzających przedwczesne kodony STOP, poziom mRNA zależy także od efektywności procesu degradacji transkryptów zawierających taki kodon (ang. *Nonsense mediated mRNA decay; NMD*)⁵⁶ (czytaj więcej w rozdziale 1.5.3.).

1.4. Rola translacyjnego odczytu kodonów STOP u eukariontów

Translacyjny odczyt kodonów STOP nie jest jedynie błędem terminacji translacji; proces ten jest również elementem regulacji ekspresji pewnych genów, prowadzącym do zmiany lub nadania białkom nowych funkcji. Do niedawna u wyższych eukariontów znane były jedynie pojedyncze przypadki białek, których transkrypty podlegały funkcjonalnej supresji terminacji translacji, np. geny *syn*, *kelch* i *hdc* u *Drosophila melanogaster*^{57,58,28} oraz gen β -globiny u królików⁵⁹. Jednakże, na podstawie realizowanych niedawno, dużych porównań filogenetycznych muszki owocówki z genomami innych twardzików oraz profilowania rybosomalnego, liczba znanych genów podlegających temu procesowi znacząco wzrosła. Obecnie ich liczbę u *Drosophila* szacuje się na około 900^{28,33,60}. Również u człowieka znana jest pewna liczba genów podlegających funkcjonalnemu translacyjnemu odczytowi kodonów STOP^{28,29,33}, a w analizach *in silico* wytypowano kolejnych 57 kandydatów⁶¹. Przykładami takich genów mogą być ludzki czynnik wzrostu śródbłoka naczyniowego A (ang. *human vascular endothelial growth factor A*; VEGF-A), pochodna białka mieliny, (ang. *myelin protein zero*, L-MPZ^{32,62} czy też podjednostka B dehydrogenazy mlekowej (ang. *lactate dehydrogenase subunit B*; LDHB) i blisko związane z nią białko, dehydrogenaza jabłczanowa (ang. *malate dehydrogenase 1*; MDH1)⁶³. W przypadku czynnika VEGF-A, dłuższa izoforma białka znosi stymulację angiogenezy, wywoływaną przez izoformę krótszą. Z kolei w przypadku LDHB i MDH1, efektem translacyjnego odczytu kodonu STOP, jest zmiana lokalizacji komórkowej obydwu białek: wydłużone formy LDHB i MDH1 są kierowane do peroksysomów, podczas gdy formy krótsze lokalizują się w cytoplazmie. Powyższe przykłady pokazują, jak różnorodne funkcje może pełnić funkcjonalny translacyjny odczyt kodonów STOP.

1.5. Przedwczesne kodony STOP

1.5.1. Podłoże molekularne

Przedwczesne kodony STOP (ang. *premature termination codons*, PTC) mogą powstawać w wyniku mutacji punktowych, które poprzez zmianę jednej zasady azotowej, zmieniają kodon kodujący aminokwas w kodon STOP⁴⁸ (tzw. mutacje nonsensowne). Znane są również drugorzędowe PTC, które związane są z występowaniem mutacji innego typu, np. insercji lub delecji, prowadzących do zmiany ramki odczytu (ang. *frameshifts*)¹⁹, czy też związane z mutacjami w miejscach odpowiedzialnych za prawidłowe składanie (ang. *splicing*) mRNA⁶⁴. PTC mogą także powstać poprzez błędy w procesie obróbki pre-mRNA^{65,66}. Szacuje się, że powstające w różny sposób PTC mogą być przyczyną aż 30% wszystkich chorób genetycznych⁶⁷.

1.5.2. Manifestacja fenotypowa

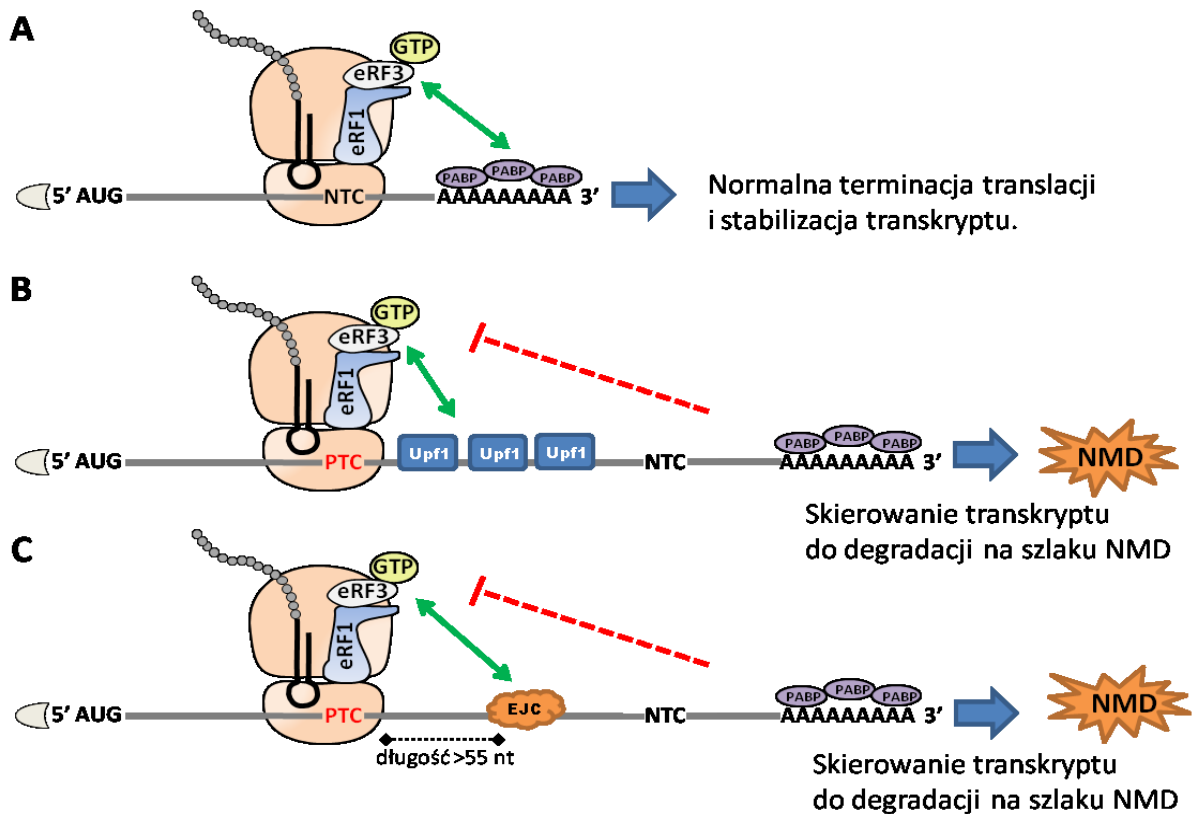
PTC zlokalizowane w rejonie kodującym mRNA prowadzą do niewłaściwej terminacji procesu translacji oraz do powstania skróconych białek⁶⁷. Efektem takich mutacji jest zwykle utrata funkcjonalności białka (ang. *loss-of-function*)⁶⁸. W większości przypadków, redukcja ilości funkcjonalnego białka pełnej długości wywiera efekt recesywny; dopiero obecność PTC w obu allelach prowadzi do konsekwencji klinicznych. Rzadsze są przypadki tzw. *gain-of-function*⁶⁷, gdzie na skutek mutacji wprowadzającej PTC białko nabywa nowe funkcje. Takie mutacje wywierają często efekt dominujący; przykładem może być β -talasemia, gdzie skrócone białka wywodzące się z transkryptów zawierających PTC są odpowiedzialne za powstanie toksycznych dla komórki, nierozpuszczalnych łańcuchów globinowych⁶⁹.

1.5.3. Nonsense mediated mRNA decay (NMD)

W przypadku PTC zlokalizowanych w sekwencji mRNA będącej w normalnych warunkach sekwencją kodującą, ważnym czynnikiem wpływającym na redukcję ilości białka jest proces degradacji transkryptów zawierających PTC (ang. *nonsense mediated mRNA decay*; NMD)⁷⁰.

Według obecnie przyjętego ujednoliconego modelu, wstępne rozpoznanie transkryptów zawierających PTC związane jest ze zwiększoną długością sekwencji 3'UTR⁷¹. Do wydłużonego 3'UTR przyłączają się liczne białka Upf1. Zwiększona ilość białek Upf1 powoduje wzrost prawdopodobieństwa wiązania się tych białek z kompleksem

terminującym translację, tym samym stwarzając konkurencję dla wiązania się z PABP, biorącym udział w normalnym procesie terminacji translacji^{72,73}. Skutkiem oddziaływania białka Upf1 z kompleksem terminującym jest skierowanie transkryptu do degradacji na szlaku NMD. Czynnikiem wspomagającym, choć niewymaganim do skierowania na szlak NMD, jest obecność kompleksów białek EJC (ang. *exon junction complex*, EJC)^{74,75} (Ryc. 4).



Rycina 4. Uproszczony schemat inicjacji degradacji transkryptów na szlaku NMD. A) Normalna terminacja translacji (brak PTC w transkrypcie). B) Terminacja translacji w przypadku występowania PTC w transkrypcie i skierowanie mRNA do degradacji na skutek zwiększonej ilości białek Upf1 na długim końcu 3'UTR. C) Terminacja translacji w miejscu PTC i skierowanie transkryptu do degradacji na skutek obecności kompleksu EJC poniżej PTC w odległości większej niż 55 nukleotydów.

EJC składają się z białek przyłączanych do mRNA w pobliżu połączeń ekson-ekson w procesie składania mRNA (ang. *splicing*)⁷³. W prawidłowym transkrypcie, z kodonem STOP w ostatnim eksonie, pierwsza runda procesu translacji powinna usunąć wszystkie EJC z nici mRNA⁷⁶. W przypadku transkryptów zawierających przedwczesny kodon STOP, rybosom sunący po nici mRNA zostaje zatrzymany w miejscu PTC.

W efekcie, EJC znajdujące się w dalszej części mRNA pozostają nadal związane z mRNA, a ich obecność jest sygnałem do aktywacji maszynerii procesu NMD⁷⁷. Jeżeli jednak PTC jest położony zbyt blisko ostatniego kompleksu EJC w transkrypcie (mniej niż 55 nukleotydów), proces NMD nie zostaje uruchomiony, a efektem jest synteza białka o nieprawidłowej długości^{78,56}.

1.5.4. Strategie eksperymentalnego niwelowania wpływu PTC

Do tej pory testowano różne podejścia, które miałyby umożliwić przywrócenie ekspresji funkcjonalnego białka i redukcję objawów klinicznych w chorobach wywołanych obecnością PTC w sekwencji genów. Jedną z bardziej znanych strategii opiera się na terapii genowej wykorzystującej wektory wirusowe wprowadzające prawidłową kopię genu, lub wektory nie-wirusowe, np. nanocząsteczki opłaszczone DNA⁷⁹⁻⁸¹. Najnowszym podejściem jest edycja genomu za pomocą systemu CRISPR/Cas9, mająca na celu skorygowanie sekwencji DNA zawierającej PTC^{82,83}. Pomimo dużego teoretycznego potencjału, podejścia te zakładają istotną modyfikację genomu, a stąd obciążone są dużym ryzykiem i wymagają jeszcze wielu badań przed możliwym zastosowaniem terapeutycznym.

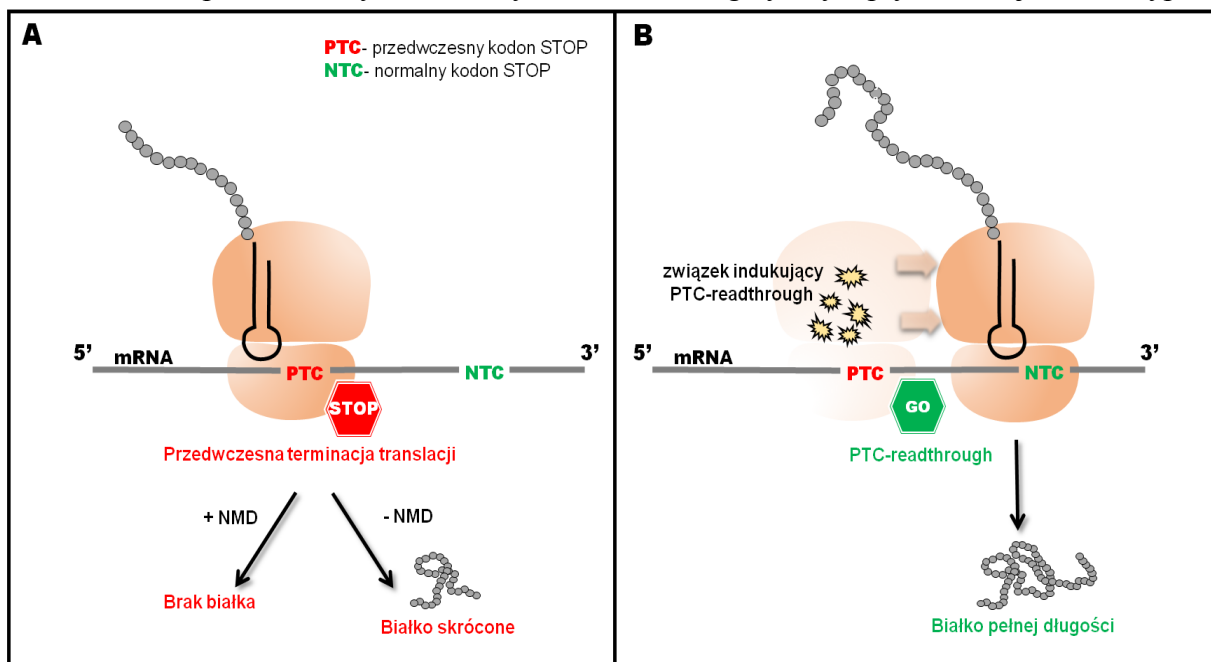
Alternatywna strategia polega na zastosowaniu metod mających na celu obniżenie efektywności procesu przedwczesnej terminacji translacji. Do metod takich można zaliczyć wykorzystanie supresorowych tRNA⁸⁴, tzn. aminoacylowanych tRNA posiadających antykodony komplementarne do kodonów STOP²¹. W czasie terminacji translacji, supresorowe tRNA konkurują z czynnikami uwalniającymi (eRF1 u eukariontów lub RF1 i RF2 u prokariotów) a po związaniu się z sekwencją kodonu STOP prowadzą do wbudowania przenoszonego przez nie aminokwasu do nowopowstającego polipeptydu. Wykazano, że supresorowe tRNA mogły przywrócić ekspresję funkcjonalnych białek w liniach komórek ludzkich od pacjentów z β -talasemią⁸⁵, ze skórą pergaminową barwnikową (łac. *xeroderma pigmentosum*)⁸⁶, chorobą Ulrich'a⁸⁷, oraz niedawno, w dziedzicznym rozlanym raku żołądka⁸⁸. Mimo zachęcających wyników wstępnych, kliniczne zastosowanie supresorowych tRNA wymaga pokonania wielu trudności, między innymi związanych z efektywnością ich dostarczania do komórki lub ekspresją *in vivo*, przy zachowaniu jak najmniejszej toksyczności dla organizmu pacjenta. Kolejnym podejściem zmniejszającym efektywność terminacji translacji i tym samym zwiększającym translacyjny odczyt kodonów STOP jest użycie siRNA (ang. *small interfering RNA*), mające na celu zmniejszenie ekspresji czynnika

eRF1⁵². Jednakże, podejście to wiąże się z niską specyficznością (niemożliwe jest odróżnienie przedwczesnych kodonów STOP od naturalnych kodonów STOP) oraz, podobnie jak w przypadku supresorowych tRNA, z problemami w dostarczeniu do organizmu i właściwej ekspresji.

Inną metodą niwelowania wpływu PTC jest, będąca przedmiotem niniejszej pracy, stymulowana supresja PTC wykorzystująca naturalne zjawisko translacyjnego odczytu kodonów STOP.

1.6. PTC *readthrough*

Translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP (z ang. PTC *readthrough*) opiera się na podobnych mechanizmach jak translacyjny odczyt prawidłowych kodonów STOP. Wydajność PTC *readthrough* jest nawet dziesięciokrotnie wyższa (0,01-1% normalnego poziomu translacji danego białka) od efektywności odczytu prawidłowych kodonów STOP (0,001-0,1%)^{22,40}. Mimo to, w warunkach naturalnych, PTC *readthrough* zachodzi na poziomie zbyt niskim, by zniwelować negatywny wpływ mutacji na fenotyp.



Rycina 5. Proces translacji w przypadku: A) transkryptu zawierającego mutację PTC B) transkryptu zawierającego mutację PTC, po stymulacji związkami indukującymi proces PTC *readthrough*.

W celach terapeutycznych, konieczne jest więc zwiększenie efektywności translacyjnego odczytu PTC. Liczne badania wykazały, że proces PTC *readthrough* może

być stymulowany działaniem niskocząsteczkowych związków chemicznych (Ryc. 5)⁶. Najlepiej poznaną grupą związków stymulujących proces translacyjnego odczytu PTC są antybiotyki aminoglikozydowe (ang. *aminoglycoside antibiotics*, AAGs).

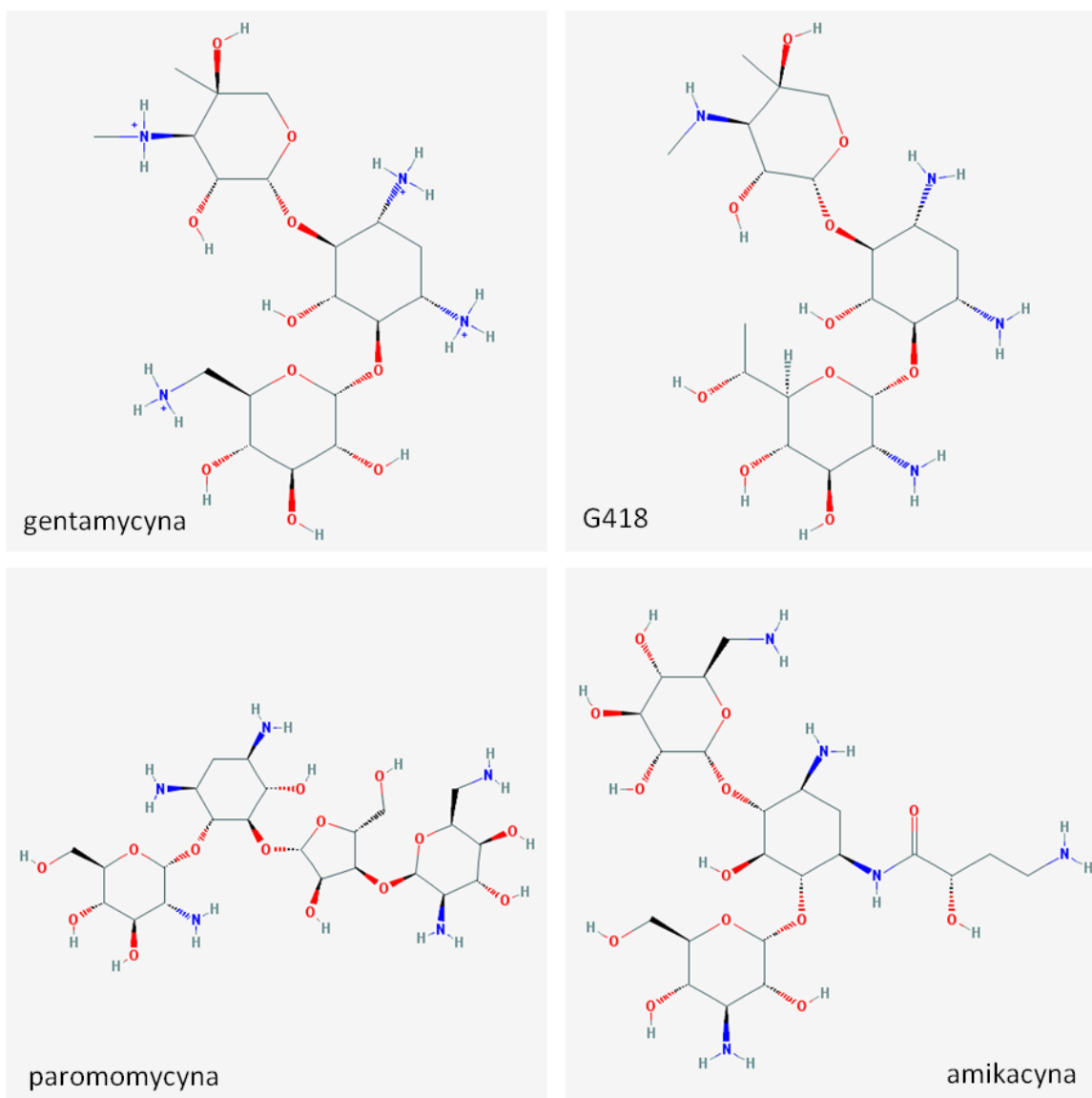
1.7. Związki aminoglikozydowe wykazujące zdolność stymulacji

PTC *readthrough*

1.7.1. Budowa i mechanizm działania

Aminoglikozydy (AAGs) (m.in. gentamycyna, paromomycyna, amikacyna, tobramycyna, negamycyna i G418) są antybiotykami, powszechnie wykorzystywanymi w zwalczaniu infekcji wywołanych bakteriami Gram-ujemnymi. Pod względem budowy, AAGs to oligosacharydy o rdzeniu w postaci streptydyny lub 2-deoksystreptydyny, zawierające różną liczbę pierścieni cukrowych i grup aminowych⁸⁹ (Ryc.6).

Zdolność AAGs do stymulacji translacyjnego odczytu kodonów STOP znana jest od lat 60-tych XX wieku, kiedy opublikowano pierwsze doniesienia o występowaniu tego procesu u bakterii traktowanych niskimi stężeniami AAGs^{90,91}. W komórkach bakteryjnych, AAGs łączą się z siedmio-nukleotydową strukturą pętli w centrum aktywnym rybosomu (rybosomalne miejsce A), co powoduje zmianę konformacji rRNA i obniżenie wierności rozpoznania kodonów STOP przez rybosomy⁹². Efektem jest masowe rozpoznawanie kodonów STOP przez nc-tRNA, co powoduje powstanie wydłużonych, нефunkcjonalnych białek, a w dalszym etapie prowadzi do całkowitego zahamowania translacji białek bakteryjnych. U eukariontów, mała zmiana w sekwencji nukleotydowej rRNA powoduje, że wydajność wiązania się AAGs z rybosomem jest znacznie obniżona^{92,93}. Jednakże, oddziaływanie AAGs z eukariotycznym rRNA nadal powoduje łatwiejsze rozpoznawanie kodonu STOP przez nc-tRNA, tym samym stymulując supresję terminacji translacji.



Rycina 6. Schematy budowy aminoglikozydów najczęściej używanych do stymulacji translacyjnego odczytu kodonów STOP (gentamycyny, paromomycyny, amikacyny i G418). Źródło: PubChem.

1.7.2. Terapeutyczny potencjał PTC *readthrough* stymulowanego AAGs

Pierwsze wykorzystanie AAGs (gentamycyny i G418) do stymulacji PTC *readthrough* w komórkach eukariotycznych (linia HeLa) z patogenną mutacją wprowadzającą PTC w genie *CFTR* miało miejsce w 1996 roku⁹⁴. Badania te potwierdziły potencjał AAGs do stymulacji supresji przedwczesnych kodonów STOP i umożliwiły ekspresję funkcjonalnego białka CFTR pełnej długości. Kilka lat później, miało miejsce pierwsze zastosowanie AAGs do stymulacji procesu PTC *readthrough* w terapii chorób genetycznych w warunkach *in vivo*, w mysim modelu dystrofii mięśniowej Duchenne’a

(ang. *Duchenne muscular dystrophy*; DMD; mysz *dmx*). W badaniach tych wykazano, że poziom prawidłowego białka dystrofiny w mięśniach szkieletowych chorych myszy traktowanych gentamycyną był o 10-20% wyższy niż u myszy niepoddanych stymulacji⁹⁵. Od tego czasu, przetestowano szereg AAGs (m.in. gentamycynę, amikacynę, paromomycynę, tobramycynę, G418) w różnych modelach chorób związanych z występowaniem PTC: począwszy od eksperymentów w warunkach *in vitro* z użyciem sztucznego systemu transkrypcji i translacji^{34,43,96-98}, przez systemy dwu-reporterowe (ang. *dual-reporter*) w liniach komórkowych^{35,99,100}, eksperymenty na komórkach pierwotnych wyprowadzonych od osób chorych¹⁰¹⁻¹⁰³, do modeli zwierzęcych^{95,104-106} oraz prób klinicznych na pacjentach¹⁰⁷⁻¹¹¹.

Zebrane dane podsumowujące wydajność stymulacyjną poszczególnych AAGs zaprezentowali Lee i Dougherty w obszernej pracy przeglądowej⁴⁸. Z przeprowadzonej przez nich analizy wyników kilkudziesięciu różnych badań eksperymentalnych wynika, że tobramycyna najslabiej stymuluje PTC *readthrough* i mimo pojedynczych pozytywnych wyników, w wielu eksperymentach nie udało się za jej pomocą wywołać supresji kodonów STOP. Paromomycyna, gentamycyna i amikacyna były znacznie skuteczniejszymi stymulatorami, przy czym ostatni związek wymagał wyższych stężeń niż dwa pozostałe, by osiągnąć podobny poziom supresji. Najskuteczniejszym związkiem był G418, który promował ten sam poziom stymulacji co gentamycyna, ale przy zastosowaniu znacznie niższych stężeń. Niemniej, ze względu na działanie toksyczne, związek ten nie został do tej pory przetestowany w warunkach klinicznych. Jedynym AAGs dopuszczonym do prób klinicznych w stymulacji PTC *readthrough* była gentamycyna.

Mimo obiecujących efektów badań pilotażowych, wyniki prób klinicznych wykorzystania gentamycyny w leczeniu DMD i mukowiscydozy nie przyniosły spodziewanych efektów terapeutycznych: obserwowane zwiększenie ilości brakującego białka, odpowiednio dystrofiny lub CFTR nie przekładało się bowiem na istotną poprawę stanu klinicznego pacjentów^{110,111}. Sukcesem zakończyły się natomiast pilotowe próby kliniczne (NCT02698735) z wykorzystaniem gentamycyny w leczeniu recesywnego dystroficznego pęcherzowego oddzielania się naskórka. U pacjentów z nonsensowną mutacją w genie kodującym kolagen typu VII, po podaniu miejscowym lub po wstrzyknięciu podskórnym gentamycyny, ilość białka pełnej długości osiągnęła od 20% do aż 165% ilości tego białka u osób zdrowych; efekt ten utrzymywał się

przez 3 miesiące. Co więcej, zaobserwowano również znaczną redukcję symptomów choroby – polepszenie powiązania pomiędzy warstwą epidermalną i dermalną skóry, zmniejszone pojawianie się pęcherzy oraz szybsze leczenie i zasklepienie się ran¹¹².

1.7.3. Toksyczność AAGs

Mimo, że antybiotyki aminoglikozydowe są od lat powszechnie wykorzystywane w różnych zastosowaniach klinicznych, ich przyjmowanie – zwłaszcza długotrwałe i w wysokich dawkach – wiąże się z efektem nefro- i ototoksycznym.

Akumulacja AAGs w nerkowych komórkach epitelialnych może prowadzić do ich apoptozy lub nekrozy. Jednakże, po przerwaniu przyjmowania AAGs efekt ten ulega samoistnemu odwróceniu¹¹³. Negatywny wpływ AAGs na komórki nerkowe u pacjentów może być również zminimalizowany poprzez właściwe nawadnianie organizmu oraz zastosowanie dializ¹¹⁴.

Znacznie poważniejsze konsekwencje wiążą się z ototoksycznym działaniem AAGs. Związki te mogą doprowadzić do nieodwracalnej, obustronnej, odbiorczej utraty słuchu. Z powodu powolnego usuwania AAGs z płynów wypełniających ucho środkowe, utrata słuchu może wystąpić wiele dni, a nawet tygodni po zaprzestaniu przyjmowania AAGs¹¹⁵. AAGs mogą powodować uszkodzenia wewnątrz komórek słuchowych (rzęsatych) znajdujących się w ślimaku, zarówno w sposób bezpośredni, przez zaburzenie organizacji włosków słuchowych odbierających bodźce słuchowe, lub pośrednio, uruchamiając proces apoptozy tych komórek¹¹⁶.

Do tej pory nie zaobserwowano związku pomiędzy budową AAGs a ich toksycznością, choć wiadomo, że niektóre antybiotyki aminoglikozydowe wykazują silniejsze działanie ototoksyczne od innych np. amikacyna i neomycyna są bardziej toksyczne niż gentamycyna i tobramycyna¹¹⁷.

Mechanizm toksyczności AAGs

Wybiórcza toksyczność AAGs w stosunku do komórek nabłonka nerki oraz ucha środkowego związana jest z obecnością w tych komórkach receptora megaliny, znanej również jako białko LRP2 (ang. *low density lipoprotein-related protein 2*)¹¹⁸. Receptor megaliny zlokalizowany jest w apikalnej części komórek nabłonka wyściełającego nerki i ucho, co umożliwia bezpośrednie wnikanie AAGs do komórek^{119,120}. Mechanizm, przez który AAGs wywołują apoptozę, nie został do tej pory jednoznacznie określony. Wiadomo, że pozytywnie naładowane AAGs oddziałują

z różnymi strukturami komórkowymi obdarzonymi ładunkiem ujemnym, jak np. fosfolipidami, fosfolipazami czy różnymi jonami metali. Kompleksy AAGs związanych z fosfolipazami agregują w wewnętrznej błonie lizosomalnej, powodując fosfolipidozę, zjawisko powszechnie kojarzone z nefro- i ototoksycznością^{121,122}. Ponadto, interakcje fosfolipidów z AAGs mogą prowadzić do nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*; ROS), które wpływając na płynność i przepuszczalność błon komórkowych, zaburzają tym samym aktywność wielu enzymów, kanałów jonowych i receptorów, w efekcie prowadząc komórkę na drogę apoptozy¹²³. Dodatkowo wykazano, że AAGs i generowane przez nie ROS mogą powodować uszkodzenia mitochondrialnego enzymu – akonitazy, co przyczynia się do dalszej, zwiększonej produkcji ROS i również prowadzi do śmierci komórek¹²⁴. Inne wytłumaczenie apoptozy związanej z podawaniem AAGs wynika z podobieństwa eukariotycznego rybosomalnego miejsca A do bakteryjnego. Prowadzi to do wiązania się AAGs do miejsca A eukariotycznej podjednostki 12S rRNA, podobnie jak ma to miejsce u bakterii, prowadząc do zaburzenia i zahamowania procesu translacji, a w efekcie do śmierci komórek¹²⁵.

Opisane powyżej negatywne efekty długotrwałego stosowania AAGs można jednak do pewnego stopnia niwelować. Opublikowano na przykład wyniki badań, w których podawanie gentamycyny pacjentom z DMD przez sześć miesięcy nie powodowało szkodliwych dla zdrowia skutków¹¹¹; toksyczność AAGs udało się zredukować poprzez skrupulatny dobór kohorty pacjentów poddanych badaniu oraz monitorowanie funkcji nerek i słuchu w czasie trwania całego eksperymentu¹¹¹.

Metody łagodzenia toksyczności AAGs

Istnieją różnorodne podejścia, prowadzące do zmniejszenia nefro- i ototoksyczności AAGs; mimo wielu obiecujących badań wstępnych, żadne z nich nie zostały przetestowane w trakcie szerokich prób klinicznych.

Podawanie AAGs ze związkami kompleksującymi

Jedna z metod zakłada równoczesne podawanie AAGs z negatywnie naładowanymi związkami kompleksującymi, co ma na celu zredukowanie zdolności aminoglikozydów do wiązania się z różnymi strukturami komórek, np. fosfolipidami¹¹⁵. Przykładem takich związków może być antybiotyk peptydowy – daptomycyna, która poprzez oddziaływania

elektrostatyczne uniemożliwia wiązanie się AAGs do innych elementów strukturalnych komórki¹²¹.

Podobny efekt udało się uzyskać po zastosowaniu negatywnie naładowanego kwasu poli-L-asparaginowego (ang. *poly-L-aspartic acid*; PAA). PAA, podobnie jak daptomycyna, wiąże się z AAGs i zapobiega fosfolipidozie, prowadzącej m.in. do nefrotoksyczności¹²⁶. Co więcej, po podaniu z gentamycyną, PAA zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie tego aminoglikozydu, co przekłada się na zwiększenie efektywności stymulacji procesu PTC *readthrough*. Wykazano także, że PAA spowalnia eliminację AAGs z cytoplazmy, tym samym wydłużając czas, w którym może zachodzić stymulacja procesu PTC *readthrough*^{127,128}.

Podawanie AAGs z antyoksydantami

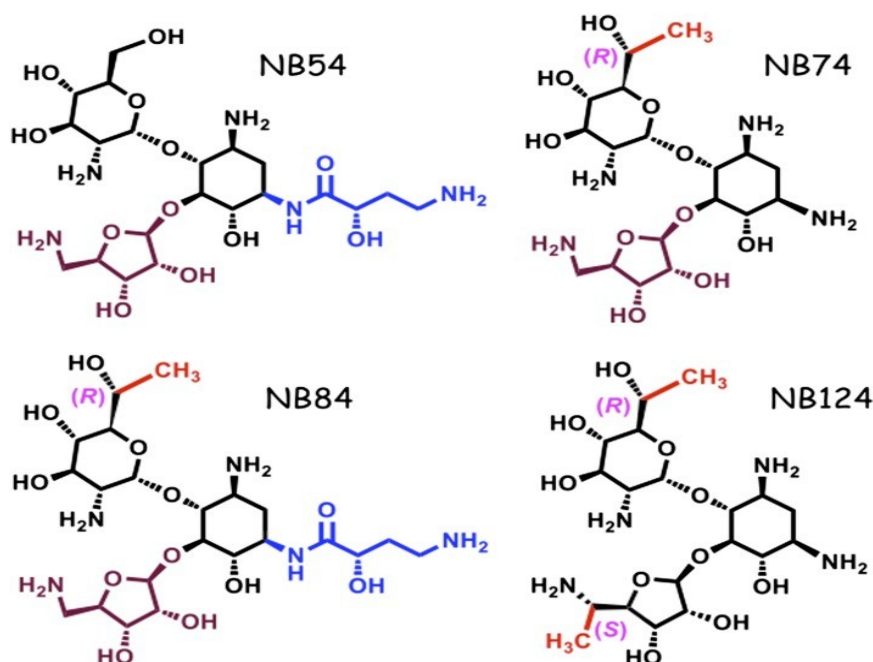
Kolejnym podejściem obniżającym negatywne efekty stosowania AAG jest równoczesne podawanie AAGs z antyoksydantami, np. D-metioniną lub melatoniną^{129,130}. Związki te mają za zadanie niwelowanie ROS powstałych na skutek oddziaływania AAGs z elementami strukturalnymi komórki. Szczególnie efektywna okazała się melatonina, była około 150 razy bardziej skuteczna w redukcji ototoksyczności wywołanej długotrwałym przyjmowaniem gentamycyny lub tobramycyny, w porównaniu do innych testowanych antyoksydantów¹³⁰.

Kapsułkowanie AAGs

W celu „zamaskowania” pozytywnego ładunku AAGs, stosuje się także metodę kapsułkowania AAGs w liposomach¹³¹. Liposomy zawierające gentamycynę, stosowane do stymulacji procesu PTC *readthrough* w mysim modelu DMD, były bardziej efektywne, a także około 10 razy mniej ototoksyczne w porównaniu do tradycyjnie podawanej gentamycyny. Co więcej, wykazano również brak zmian w stężeniu kreatyniny (markera prawidłowej funkcji nerek), co sugeruje, że kapsułkowane AAGs może znacznie zredukować neurotoksyczność tych związków^{132,133}.

Pochodne AAGs

Innym podejściem umożliwiającym długotrwałe przyjmowanie dużych dawek związków stymulujących PTC *readthrough*, jest chemiczna modyfikacja AAGs obniżająca toksyczność tych związków. Przykładem są tutaj pochodne paromomycyny, aminoglikozydu znanego z efektywnej stymulacji procesu PTC *readthrough*, stworzone przez grupę Timora Baasova z Izraela (seria związków z grupy NB; Ryc. 7)¹³⁴. Pochodne paromomycyny, NB30 i NB54, wykazały znacznie niższą toksyczność, przy zachowaniu tego samego potencjału stymulacyjnego^{135,136}. Modyfikacje innego aminoglikozydu, G418, umożliwiły stworzenie kolejnej grupy związków: NB74, NB84 czy NB124¹³⁷. Związki te posiadają zarówno obniżoną oto- i nefrotoksyczność, jak i zwiększoną wydajność supresji PTC, w porównaniu do NB30 i NB54^{136,138}.



Rycina 7. Związki z grupy NB. Źródło: Xue i wsp.¹³⁷

1.8. Związki nie-aminoglikozydowe stymulujące PTC *readthrough*

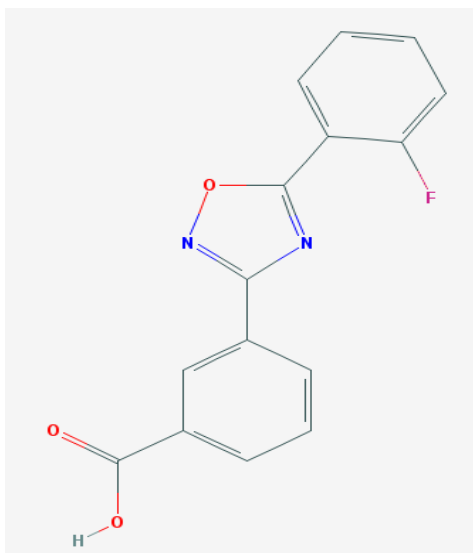
W związku z toksycznością AAGs dużo uwagi poświęca się w ostatnich latach wykorzystaniu mimetyków AAGs – syntetycznych związków o zupełnie innej budowie niż AAGs, lecz wpływających w podobny sposób na stymulację procesu PTC *readthrough*. W dalszej części pracy zarówno pochodne aminoglikozydów jak i ich mimetyki będą nazywane zbiorczą nazwą „związki nie-aminoglikozydowe” – NAGs (ang. *non-aminoglycosides*). NAGs często wykazują niższą niż AAGs toksyczność

i porównywalny potencjał stymulacyjny, a ich wstępne badania na modelach i badania przedkliniczne są wysoce obiecujące. Szczegółowe omówienie tego zagadnienia zostało przedstawione w pracy przeglądowej (Dąbrowski i wsp.; *Molecular Medicine*, 2018, w druku); w niniejszej pracy zostały przedstawione jedynie wybrane przykłady związków NAGs, testowanych w ramach grantu Etiuda i stanowiących przedmiot badań w realizowanym obecnie grancie Preludium.

1.8.1. Mimetyki AAGs

Ataluren (PTC124)

Najbardziej znanym przykładem związków z tej grupy jest ataluren, znany również jako PTC124 lub Translarna (Ryc. 8).



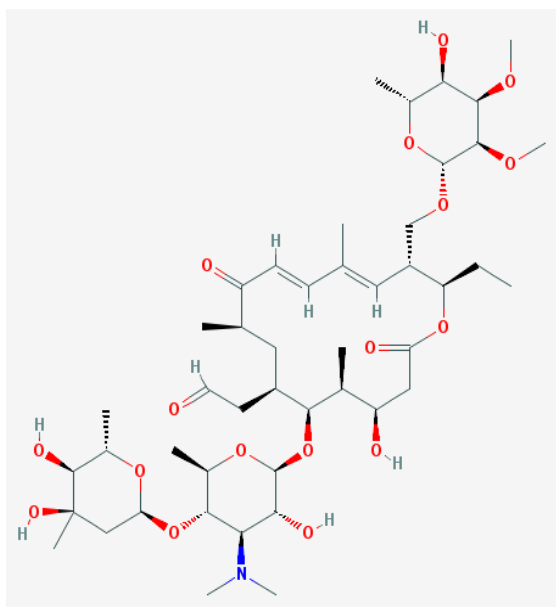
Rycina 8. Schemat budowy atalurenu. Źródło: *PubChem*.

Dlatego też, uznano ten związek za bezpieczny do zastosowań terapeutycznych u człowieka¹⁴⁴. Niestety, mimo pozytywnych wyników otrzymanych w różnych systemach eksperymentalnych i w modelach różnych chorób, wśród których najczęściej badanymi były mukowiscydoza i dystrofia mięśniowa Duchenne’a, wnioski na temat skuteczności atalurenu płynące z badań klinicznych są niejednoznaczne^{143,145–148}.

Mimo wielu intensywnie prowadzonych badań, dokładny mechanizm działania atalurenu pozostaje nieznan. Eksperymenty z użyciem metody „*chemical footprinting*” wskazują na wiązanie się atalurenu do centrum peptydylo-transferazowego w dużej podjednostce rybosomu¹⁴⁹. Z drugiej strony, modelowanie komputerowe sugeruje, że mRNA zawierające PTC tworzą stabilne kompleksy z atalurenem, co może w dalszym

etapie wpływać na rozpoznawanie PTC przez czynnik eRF1 i tym samym powodować supresję terminacji translacji. Ostatnie badania wskazują, że ataluren ma selektywne powinowactwo do rybosomalnego miejsca A, dzięki czemu ułatwia wbudowywanie się nc-tRNA w miejscu PTC²⁴. Tobramycyna, inny związek ze znanym powinowactwem do rybosomalnego miejsca A, jest silnym inhibitorem atalurenu (prawdopodobnie konkurując z nim o miejsce wiązania), co potwierdza przewidywaną interakcję atalurenu z rybosomem^{24,150}. Wskazuje na to także analiza *post-hoc* niedawno zakończonych prób klinicznych u pacjentów z mukowiscydozą, która wykazała, że u pacjentów otrzymujących równocześnie ataluren i tobramycynę nie obserwowano istotnego poziomu stymulowanego PTC *readthrough*¹⁴⁶.

Makrolidy



Rycina 9. Schemat budowy tylozyny.
Źródło: PubChem.

Makrolidy, antybiotyki wykorzystywane w leczeniu infekcji bakteriami Gram-dodatnimi, są kolejną grupą związków nie-aminoglikozydowych wykazujących potencjał stymulacji translacyjnego odczytu PTC.

W modelach raka jelita grubego oraz na myszach (mutacje w genie *APC*) wykazano indukcję procesu PTC *readthrough* przez tylozynę (Ryc. 9), josamycynę oraz spiromycynę¹⁵¹. Szerszy zakres makrolidów (wzbogacony o erytromycynę i jej pochodną, azytromycynę) był analizowany

w badaniach z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i linii komórkowych od pacjentów z różnymi chorobami genetycznymi związanymi z obecnością PTC w sekwencji genów (m.in. ataksja-telengiektazja, rdzeniowy zanik mięśni czy syndrom Rett'a). We wszystkich tych analizach, makrolidy stymulowały PTC *readthrough*, przy czym azytromycyna działała w stężeniach 100 razy niższych niż pozostałe badane związki¹⁵². Skuteczność azytromycyny została również potwierdzona *in vivo* w modelu mysim rdzeniowego zaniku mięśni¹⁵³.

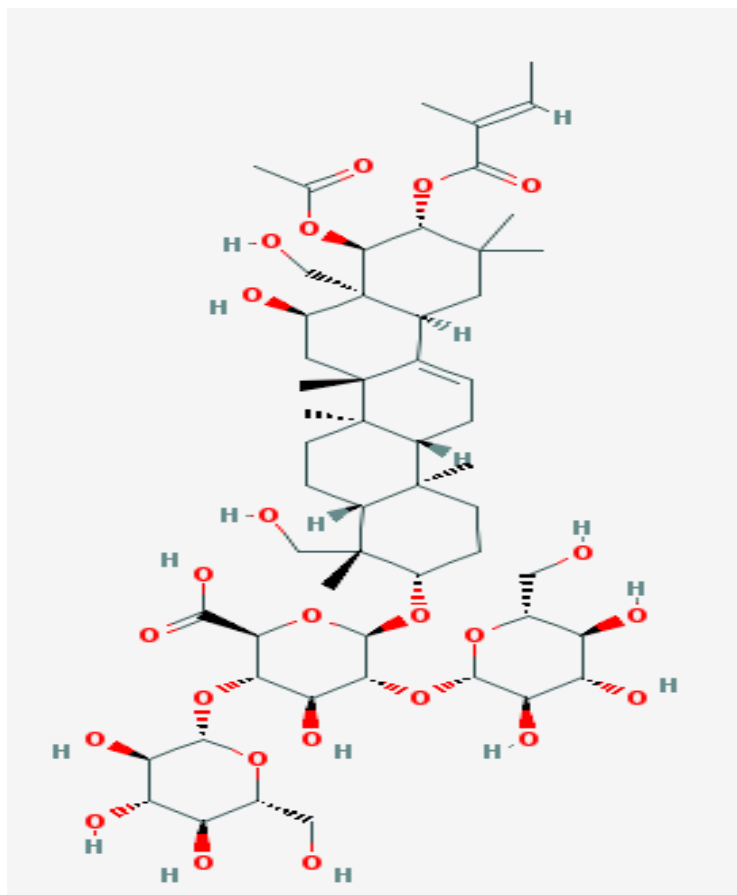
Mechanizm działania makrolidów na aparat translacyjny nie został do tej pory w pełni wyjaśniony. Wiadomo, że makrolidy działają w inny sposób niż AAGs,

prawdopodobnie wpływając na terminację translacji poprzez zmniejszenie zdolności wiązania się eRF1 do rybosomalnego miejsca A, lub poprzez zahamowanie uwolnienia nowopowstałego polipeptydu, już po związaniu się eRF1 z kompleksem rybosomalnym¹⁵⁴.

Escyna

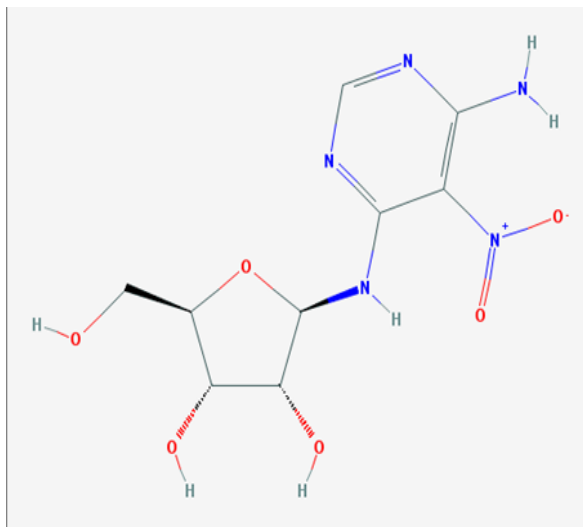
Odkrycie zdolności do stymulacji procesu PTC *readthrough* przez związki niebędące aminoglikozydami, zainspirowało badaczy do poszukiwania substancji o działaniu stymulującym PTC *readthrough* wśród substancji o znanych profilach bezpieczeństwa i zaaprobowanych do zastosowań klinicznych. Po przetestowaniu około 1600 znanych leków, najbardziej obiecującym okazała się escyna – ziołowy lek przeciwzapalny¹⁵⁵ (Ryc. 10). Escyna stymulowała translacyjny odczyt PTC zarówno w testach *in vitro*, jak i *ex vivo* w liniach komórkowych od pacjentów z mukowiscydozą. Co więcej, wpływała również na stabilizację transkryptu poprzez inhibicję procesu NMD, co skutkowało dodatkowym wzrostem ilości funkcjonalnego białka pełnej długości¹⁵⁵. Do tej pory nie stwierdzono żadnych efektów ubocznych, choć przyszłe kliniczne zastosowanie tego związku wymaga jeszcze wielu badań, które pozwolą przybliżyć mechanizm działania escyny i jej wpływ na organizm przy długotrwałej terapii.

Rycina 10. Schemat budowy escyny. Źródło: PubChem.



Klitocyna

Zupełnie inny mechanizm stymulacji PTC *readthrough* prezentuje klitocyna (ang. *clitocine*; 6-amino-5-nitro-4-(β -D-rybofuranozylamino)pirymidyna)¹⁵⁶, substancja wyizolowana z grzyba *Clitocybe inverse*¹⁵⁷.



Rycina 11. Schemat budowy klitocyny.

Źródło: PubChem.

co prowadzi do spadku efektywności terminacji translacji i tym samym ułatwia wbudowywanie nc tRNA, zwiększając wydajność PTC *readthrough*. W przypadku prawidłowych kodonów STOP, obecność klitocyny nie wpływa na wydajność terminacji translacji, gdyż proces ten jest w ich przypadku znacznie bardziej efektywny. Badania wykazały, że obecność klitocyny w transkrypcie nie ma wpływu na funkcjonalność tworzonego białka: zarówno w liniach komórkowych wyprowadzonych od chorych na nowotwór jak i w myszach, białko p53 otrzymane po stymulacji klitocyną, było w pełni funkcjonalne¹⁵⁸.

W przeciwieństwie do znanych innych związków stymulujących proces PTC *readthrough*, klitocyna nie oddziałuje z poszczególnymi elementami komórkowego aparatu translacyjnego, ale wpływa na odczyt PTC poprzez samą swoją obecność w transkrypcie¹⁵⁸, gdyż jako analog adenozyiny, w czasie transkrypcji wbudowuje się do mRNA. Przedwczesne kodony STOP z wbudowanym analogiem adenozyiny są słabo rozpoznawane przez eRF1,

1.9. Stymulacja PTC *readthrough* poprzez inhibicję procesu NMD

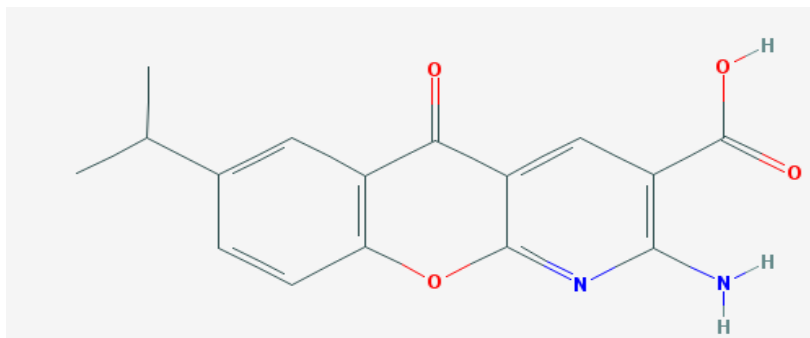
Niezależnie od środków stymulujących proces supresji PTC, wydajność translacyjnego odczytu PTC zależy bezpośrednio od ilości transkryptu zawierającego mutacje. Jeśli proces NMD, powodujący degradację transkryptów z mutacją PTC, jest aktywny, to poziom takich transkryptów w komórce ulega zredukowaniu i nawet przy efektywnej stymulacji PTC *readthrough*, ilość otrzymanego funkcjonalnego białka będzie bardzo niska. Istnieją badania wskazujące, że to właśnie proces NMD jest głównym czynnikiem limitującym wydajność PTC *readthrough*⁵⁵. Jednakże, inne badania wskazują,

iż nawet niewielka stymulacja PTC *readthrough* może częściowo stabilizować transkrypt i zwrótnie hamować proces NMD^{72,100,101}.

W świetle obecnej wiedzy, uznaje się, że za rozpoznanie transkryptu kierowanego do degradacji odpowiadają białka Upf1 i EJC obecne na 3'UTR końcu^{72,74,159}. W przypadku prawidłowych transkryptów niezawierających PTC, w czasie pionierskiej rundy translacji rybosom, przesuwając się wzdłuż nici mRNA, usuwa z niej kompleksy białek Upf1 i EJC, tym samym stabilizując transkrypt. Jednak, gdy w czasie translacji rybosom natrafi na PTC, pionierska runda translacji zostaje zatrzymana, a obecność białek Upf1 i EJC na 3' końcu transkryptu uruchamia degradację transkryptu na drodze NMD⁷². Translacyjny odczyt PTC umożliwia rybosomowi przejście przez PTC, a co za tym idzie, kontynuację transkrypcji i usunięcie kompleksów białek znajdujących się na nici mRNA poniżej PTC, związanych z uruchomieniem procesu NMD, co stabilizuje transkrypt. Dowiedziono, że nawet niewielka stymulacja procesu PTC *readthrough* (1-2%), może znacząco zmniejszyć efektywność degradacji na drodze NMD i wydłużyć czas półtrwania transkryptów¹⁶⁰. Dotyczy to nawet naturalnego procesu PTC *readthrough*, bez stymulacji związkami chemicznymi. Tym niemniej, skuteczna inhibicja szlaku NMD za pomocą substancji farmaceutycznych była przedmiotem wielu badań a najważniejsze z nich zostały przedstawione poniżej.

1.9.1. Inhibitory NMD

Przedstawicielami inhibitorów kinazy hSMG-1, kluczowej dla regulacji procesu NMD są wortmanina i kofeina. Związki te zostały wykorzystane w eksperymentach z użyciem fibroblastów pochodzących od pacjentów z chorobą Ullricha, wywołaną obecnością PTC w genie kodującym kolagen typu VI. Wortmanina i kofeina umożliwiły translację tego białka, które okazało się funkcjonalne, mimo częściowo skróconego C-końca. Przy braku inhibicji szlaku NMD, takie transkrypty zostałyby zdegradowane¹⁶¹.



Rycina 12. Schemat budowy amleksanoksu. Źródło: PubChem.

Obiecującym inhibitorem procesu NMD jest amleksanoks (Ryc. 12), znany lek o działaniu antyalergicznym i przeciwzapalnym, który nie tylko stymuluje proces PTC *readthrough* ale i hamuje degradację transkryptów na drodze NMD¹⁶². W niedawno zakończonych badaniach w komórkach od pacjentów z mukowiscydozą wykazano, że amleksanoks skutecznie wpływa na biosyntezę białek z transkryptów zawierających PTC, nie wpływając jednocześnie na ogólny poziom translacji białek¹⁶². Jego skuteczność została potwierdzona w kolejnych badaniach w komórkach od pacjentów z pęcherzowym oddzielaniem się naskórka, gdzie po podaniu amleksanoksu zaobserwowano wzrost białka pełnej długości o 8-80% w porównaniu do komórek od zdrowych dawców a otrzymane białko było stabilne i funkcjonalne¹⁶³.

1.10. Zastosowanie stymulowanego PTC *readthrough* w odniesieniu do genów zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek

Efektywność każdej substancji stymulującej PTC *readthrough* zależy od rodzaju tej substancji, a także od charakteru przedwczesnego kodonu STOP oraz sekwencji go otaczającej. W konsekwencji, w badaniach zmierzających do opracowania przyszłych zastosowań terapeutycznych, każda mutacja prowadząca do powstania patogennego PTC wymaga osobnego przetestowania efektywności związków stymulujących supresję PTC. Ponadto, zastosowanie stymulatorów PTC *readthrough* wymaga określenia ich toksyczności w kontekście komórek czy tkanek, w których związki te miałyby stymulować proces supresji PTC.

Dotyczy to także pierwotnej dyskinezy rzęsek, choroby będącej od lat przedmiotem zainteresowań badawczych Zakładu Genetyki Molekularnej i Klinicznej, w którym realizowana była niniejsza praca doktorska.

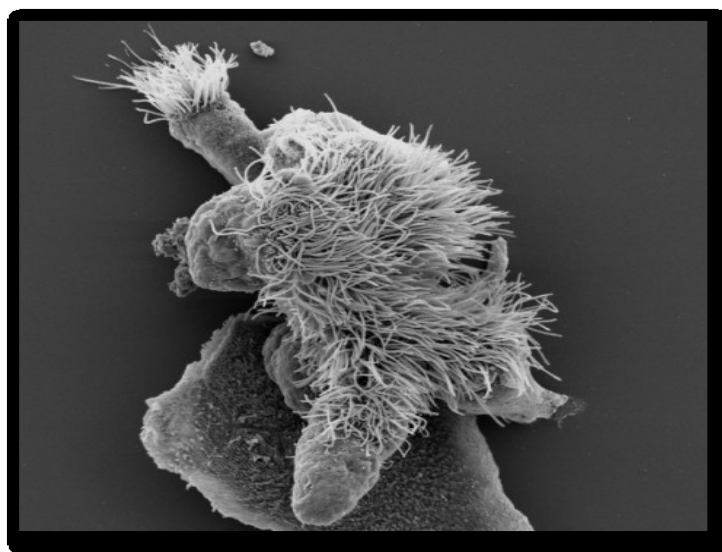
1.10.1. Pierwotna dyskineza rzęsek

Pierwotna dyskineza rzęsek (ang. *primary ciliary dyskinesia*; PCD; numer OMIM: 242650) jest rzadką, recesywną chorobą genetyczną należącą do klasy ciliopatii. Ciliopatie to szeroka grupa chorób związanych z dysfunkcją rzęsek, wysoce zakonserwowanych organelli komórkowych obecnych na powierzchni różnych typów komórek¹⁶⁴. PCD jest jedyną chorobą, u której podłoża leżą zaburzenia funkcji

rzęsek ruchomych – pozostałe ciliopatie są spowodowane zaburzeniami innej klasy rzęsek, tzw. rzęsek pierwotnych, które nie posiadają zdolności ruchu.

Główne objawy kliniczne PCD odzwierciedlają dysfunkcję rzęsek występujących w różnych tkankach/komórkach (Ryc. 13).

Dysfunkcja rzęsek zlokalizowanych na apikalnej części komórek nabłonka wyściełającego górne i dolne drogi oddechowe, powoduje zaburzenia oczyszczania śluzowo-rzęskowego, nawracające, przewlekłe zapalenia dróg oddechowych, w tym oskrzeli i płuc¹⁶⁵.



Rycina 13. Fragment orzęsionego nabłonka oddechowego. Zdjęcie wykonane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Powiększenie 5000x. Źródło: wyniki własne.

Brak ruchomości witek plemników powoduje niepłodność męską; u kobiet, nieruchomość rzęsek w komórkach nabłonka wyściełających jajowody może znacznie obniżyć płodność.

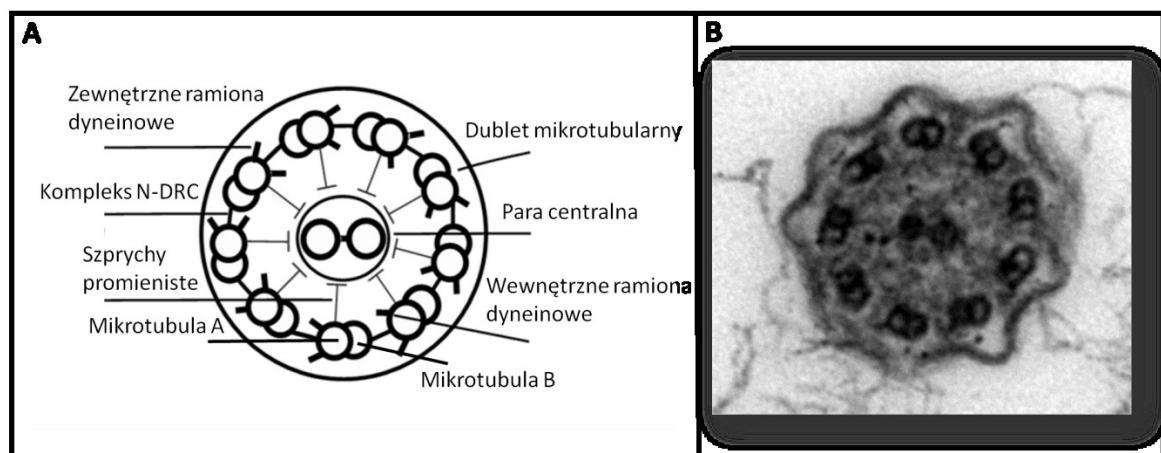
Defekt ruchu rzęsek w węźle zarodkowym (odpowiedzialnych za wytworzenie w zarodku gradientu morfogenów) prowadzi do losowego ułożenia trzewi; w efekcie u połowy pacjentów obserwuje się przełożenie trzewi (łac. *situs inversus*); ten podtyp PCD jest znany jako zespół Kartagenera¹⁶⁶.

W PCD, objawy kliniczne choroby oraz ich intensywność mogą się mocno różnić u poszczególnych pacjentów, w zależności wpływu powodujących je mutacji na zaburzenia strukturalnych lub funkcjonalne rzęsek.

1.10.2. Budowa rzęsek

Rola rzęsek ruchomych zależy od poziomu ewolucyjnego rozwoju organizmu. U prostych eukariontów odpowiadają one za przemieszczanie się organizmów; u wyższych eukariontów – za ruch płynów ustrojowych w organizmie, ale także za ruch plemników (wić plemnika jest rodzajem rzęski).

Głównym elementem strukturalnym rzęsek (Ryc.14) jest aksonema, łącząca się z ciałkiem podstawowym, zakotwiczonym w błonie komórkowej^{167,168}. Aksonema jest zbudowana z 9 dubletów mikrotubul A i B, które zbudowane są z protofilamentów, złożonych z podjednostek α - i β -tubuliny. Dublety mikrotubul znajdują się na obwodzie aksonemy i otaczają parę centralną (ang. *central pair*; CP), element charakterystyczny tylko dla rzęsek ruchomych. Taka orientacja nazywana jest ułożeniem 9+2. Wzdłuż mikrotubul rozmieszczone są cyklicznie kompleksy białek mających różne funkcje. Dublety mikrotubul są połączone z CP za pomocą szprych promienistych (ang. *radial spokes*; RS), natomiast sąsiadujące ze sobą dublety łączą się ze sobą za pomocą neksynowo-dyneinowych kompleksów regulatorowych (ang. *nexin-dynein regulatory complex*; N-DRC). Na mikrotubulach A występują zewnętrzne oraz wewnętrzne ramiona dyneinowe (odpowiednio: ang. *outer dynein arms*; ODA oraz ang. *inner dynein arms*; IDA). ODA pełnią rolę motorów molekularnych, umożliwiających ruch rzęski. RS, IDA, CP i N-DRC są odpowiedzialne za koordynację ruchu rzęski i współdziałanie poszczególnych elementów strukturalnych rzęski ze sobą^{140,14}.



Rycina 14. Budowa rzęski: A) przekrój rzęski (na podstawie Bukowy i wsp.¹⁶⁹). B) zdjęcie przekroju rzęski wykonane transmisyjnym mikroskopem elektronowym. Powiększenie: 50 000x. Źródło: wyniki własne..

1.10.3. Genetyczne podłoże PCD

Częstość PCD wynosi, w zależności od populacji, od 1/16.000 do 1/20.000 żywych urodzeń¹⁷⁰. PCD jest chorobą wysoce heterogenną genetycznie; do tej pory poznano około 40 genów związanych z jej patogenezą¹⁶⁵. Heterogenność ta odzwierciedla duży stopień złożoności budowy i funkcjonowania rzęsek.

Ponad połowa genów związanych z patogenezą PCD koduje białka stanowiące elementy ultrastruktury rzęski (m.in. *DNAH5*, *DNA2* – ODA, *RSPH4A* – RS, *CCDC40* – kompleks N-DRC. Pozostałe geny (m.in. *SPAG1*) kodują białka cytoplazmatyczne, zaangażowane w proces składania elementów struktury rzęski i ich transport z cytoplazmy do aksonemy.

Wśród ponad 500 poznanych do tej pory mutacji leżących u podstaw PCD, około 1/3 jest powodowana obecnością PTC w sekwencji kodującej genów. Dlatego też, PCD wydaje się być atrakcyjnym przedmiotem badań zmierzających do terapeutycznego zastosowania stymulowanego związkami chemicznymi translacyjnego odczytu PTC.

2. CEL PRACY

Wydatność procesu PTC *readthrough* zależy od wielu czynników, m.in. typu danej mutacji (tożsamość kodonu STOP), jej umiejscowienia w transkrypcie oraz otoczenia nukleotydowego. W związku z powyższym, przed ewentualnym zastosowaniem klinicznym tego podejścia w leczeniu danej choroby genetycznej, należy eksperymentalnie sprawdzić podatność każdej mutacji na stymulowaną supresję kodonów STOP. Badania dotyczące efektywności AAGs w stymulacji procesu PTC *readthrough* w genach związanych z występowaniem PCD nie były dotąd wykonywane w żadnych innych laboratoriach; w literaturze brak także doniesień na temat wpływu tych związków na przeżywalność i funkcjonowanie komórek nabłonka oddechowego.

Niniejszy projekt miał na celu analizę efektywności stymulacji PTC *readthrough* w kilkunastu różnych mutacjach wprowadzających PTC w kilku genach zaangażowanych w patogenezę PCD (*DNAH5*, *RSPH4A*, *DNAH11*, *CCDC40*, *SPAG1*). Do stymulacji wykorzystano cztery najczęściej opisywane w literaturze antybiotyki aminoglikozydowe (AAGs): gentamycynę, paromomycynę, amikacynę i G418. Selekcjonowanie związków o najwyższym potencjale stymulującym przeprowadzono w dwóch systemach eksperymentalnych: *in vitro* i *ex vivo*.

Równoległym celem pracy była analiza toksyczności badanych związków wobec komórek nabłonka oddechowego (cytotoksyczność) oraz ocena ich wpływu na funkcję i rozwój rzęsek (ciliotoksyczność).

3. MATERIAŁY

3.1. Materiał biologiczny

Komórki pierwotne nabłonka oddechowego były izolowane od zdrowych dawców z rutynowo usuwanych polipów nosowych (współpraca z dr hab J. Szydłowskim, Katedra Otolaryngologii, Chirurgii Głowy, Szyi oraz Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu). Badania posiadały wymagane zgody etyczne od lokalnej Komisji Bioetycznej oraz pozwolenie na pracę z GMO/GMM.

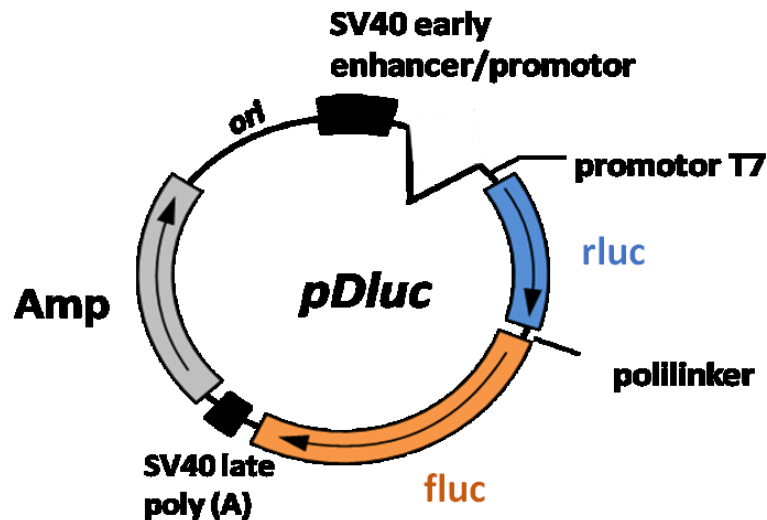
Genomowy DNA pochodzący od zdrowych osób oraz od chorych z mutacjami PTC pochodził z kolekcji znajdującej się w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka PAN.

3.2. Wektor reporterowy pDluc

Wektor pDluc, klasyczny wektor reporterowy do badań procesu PTC *readthrough*, był darem pioniera w tych badaniach, dr Johna Atkinsa (*University of Utah, USA*)¹⁷¹. Poza możliwością namnażania i ekspresji w komórkach bakteryjnych, wektor ten może ulegać ekspresji także w komórkach ssaczych oraz podczas transkrypcji *in vitro*. pDluc posiada specyficzny układ dwóch genów reporterowych kodujących białka lucyferaz (geny *rluc* i *fluc*), umożliwiające śledzenie *in vitro* oraz *ex vivo* efektywności procesu translacji wstawionej pomiędzy nie badanej sekwencji.

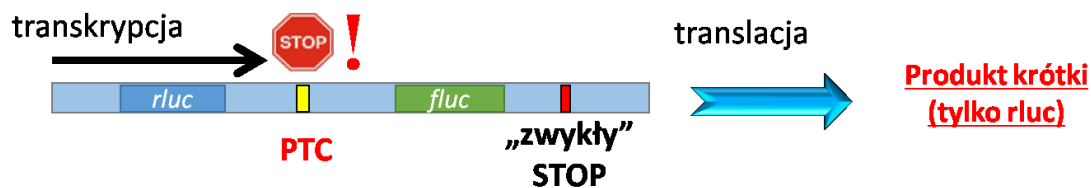
3.2.1 Zasada działania wektora pDluc

Dwuniciową sekwencję DNA zawierającą badany PTC wraz z otaczającą go sekwencją (wstawka) wprowadza się do polilinkera znajdującego się między genami reporterowymi lucyferaz *rluc* i *fluc* (Ryc. 15). Podczas transkrypcji plazmidu i następującej po niej translacji, obecność PTC we wstawce powoduje powstanie oligopeptydu zawierającego jedynie aktywność pierwszej lucyferazy, *rluc*. W przypadku PTC *readthrough* (podobnie jak we wstawce typu dzikiego, bez PTC) dochodzi do powstania dłuższego produktu białkowego o aktywności obydwu lucyferaz. Ze względu na różną długość produktu białkowego oraz różnice w aktywności substratowej obydwu lucyferaz, można ocenić wydajność procesu PTC *readthrough* zarówno techniką analizy długości znakowanego radioaktywnym izotopem siarki (³⁵S) produktu białkowego jak i metodą pomiaru luminescencji białek reporterowych (Ryc. 16).

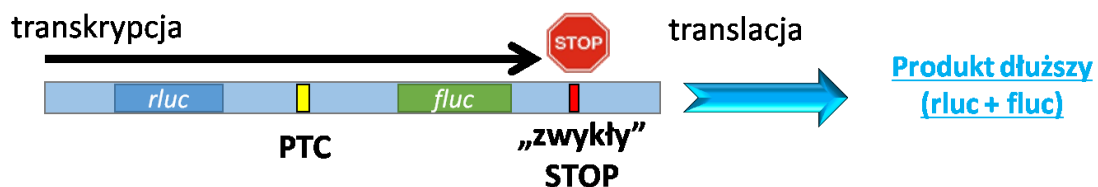


Rycina 16. Budowa plazmidu pDluc. *rluc* – gen lucyferazy renilla; *fluc* – gen lucyferazy firefly; *ori* – miejsce startu replikacji; *Amp* – gen oporności na ampicylinę; polilinker – miejsce wbudowania wstawki zawierającej PTC i otaczającą go specyficzną sekwencję. Na podstawie: Grentzman i wsp.¹⁶⁷

a) Translacja wektora zawierającego PTC



b) Translacja wektora zawierającego PTC w obecności AAGs



Rycina 15. Zasada detekcji PTC *readthrough* w plazmidzie pDluc. PTC – przedwczesny kodon STOP; PTC *readthrough* – translacyjny odczyt PTC; *rluc*, *fluc* – geny reporterowe lucyferaz.

3.3. Spis używanych odczynników i sprzętów

Szczegółowe informacje dotyczące używanych odczynników, sprzętu laboratoryjnego, oprogramowania komputerowego, a także składu stosowanych buforów i pożywek hodowlanych znajdują się w rozdziale 9 (MATERIAŁY DODATKOWE).

4. METODY

4.1. Przygotowanie rekombinowanych wektorów.

Rekombinowane wektory zawierały wbudowaną w plazmid pDluc wstawkę zawierającą fragment specyficznej dla danej mutacji sekwencji genomowej.

Do przygotowania wstawek, które następnie były wbudowywane do plazmidu pDluc, stosowano dwie metody. Początkowo, była to amplifikacja wybranej genomowej sekwencji metodą PCR. Ze względu na niską efektywność, metoda ta została później zamieniona na metodę syntezy chemicznej.

4.1.1. Przygotowanie wstawek metodą amplifikacji PCR

Wymogi dla projektowanych starterów i warunki reakcji

Temperatura topnienia (T_m) fragmentu startera komplementarnego do DNA wynosiła ok. 55-58°C; T_m całego startera (zawierającego poza sekwencją specyficzną dla danej mutacji również miejsca restrykcyjne) wynosiła ok. 65-68° C (minimum 6-8°C wyższa niż fragmentu komplementarnego do DNA).

Korzystając z programu OLIGO 7 (*Molecular Biology Insights, Inc.*), sprawdzano strukturę drugorzędową starterów pod kątem obecności homo- i heterodupleksów w sekwencji DNA oraz obecności spinek w sekwencji DNA. W przypadku występowania powyższych, przeprojektowywano sekwencję startera, aż do otrzymania optymalnej sekwencji. Sekwencje używanych starterów podane są w materiałach dodatkowych w tabeli uzupełniającej 5.

Mieszanina do reakcji PCR (20 µl) zawierała:

1x bufor PCR (*ThermoFisher Scientific*)

1,5 mM MgCl₂ (*ThermoFisher Scientific*)

2.5 mM mieszaniny dNTP

20 µM starterów F + R

0,1 µl Polimerazy Taq (*ThermoFisher Scientific*)

100 ng matrycowego DNA

Program amplifikacji:

1. 95° C – 5 min
2. 95° C – 30 s
3. 55° C – 45 s
4. 72° C – 45 s

krok 2-4 – 15x

5. 95° C – 30 s
6. 64° C – 45 s
7. 72° C – 45 s

krok 5-7 – 20x

8. 72° C – 4 min
9. 4° C

Uzyskanie produktu reakcji PCR o prawidłowej długości ok. 300 pz potwierdzano metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

Oczyszczanie produktów reakcji PCR

Do produktów PCR dodawano 1/10 objętości 3M octanu sodu i 2,5 objętości lodowatego 96% etanolu. Następnie próby przenoszono na 30 minut do -80°C. Próbę wirowano przez 30 minut przy prędkości 10 000 RPM, w temperaturze 4°C. Osad, po dwukrotnym płukaniu w 70% etanolu, pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej, a następnie zawieszano w 20 µl buforu TE. Stężenie mierzono urządzeniem Nanodrop firmy Thermofisher. Próby przechowywano w -20°C.

Trawienie restrykcyjne

Aby pozbyć się fragmentów produktów PCR pochodzących od starterów i stworzyć „lepkie końce”, niezbędne do ligacji z wektorem, produkty reakcji PCR jak i plazmid pDluc poddawano sekwencyjnemu trawieniu enzymami restrykcyjnymi, kolejno XhoI oraz HindIII (w drugiej serii przygotowywanych wstawek, enzymem BglII zamiast HindIII).

Skład mieszaniny do trawienia (20 µl):

- 1x bufor R
- 0,5 µl enzymu XhoI
- DNA (w przypadku plazmidu: 1 µg, w przypadku produktu PCR: 200 ng)

Reakcję prowadzono w 37°C przez 1 godzinę. Enzym XhoI inaktywowano podgrzewając próbkę do 80°C przez 20 min. Następnie materiał trawiono analogicznie drugim enzymem restrykcyjnym (HindIII lub BglII, w zależności od serii wstawek).

Oczyszczanie trawionego plazmidu i wstawek

Produkty trawienia rozdzielano w żelu agarozowym (żel 3% do rozdziału trawionych wstawek; 0,8% do trawionych plazmidów). Prążki o pożądanej długości wycinano z żelu, a następnie oczyszczano za pomocą komercyjnego zestawu *Qiaquick Gel Extraction* według instrukcji producenta. Zlinearyzowany plazmid i wstawki przechowywano w -20°C.

4.1.2. Metoda syntezy chemicznej

Synteza oligonukleotydów

Oligonukleotydy zaprojektowano tak, by zawierały fragment o długości ok. 21 nt komplementarny do genomowego DNA (zawierający mutację PTC wraz z otoczeniem lub sekwencję kontrolną). Na końcach 5' i 3' każdej sekwencji oligonukleotydu projektowano „lepkie końce” umożliwiające ligację z plazmidem trawionym enzymami XhoI oraz HindIII (lub BglII w serii drugiej przygotowywanych wstawek). Projektując oligonukleotyd, zwracano także uwagę na obecność polimorfizmów DNA oraz na strukturę drugorzędową (unikano spinek, homodupleksów i nieprawidłowych heterodupleksów między oligonukleotydami danej wstawki). Starano się także maksymalnie skorelować temperatury topnienia oligonukleotydów tworzących każdą wstawkę, w celu uniknięcia problemów z dupleksowaniem. W przypadku, jeśli po dodaniu miejsca restrykcyjnego długość wstawki była niepodzielna przez trzy (powodowała zmianę ramki odczytu genów reporterowych), między fragmentem „lepkich końców”, a fragmentem komplementarnym do DNA genomowego wprowadzano dodatkowe 1-2 dodatkowe nukleotydy, by wyregulować ramkę odczytu. Po zaprojektowaniu wstawek, synteza chemiczna oligonukleotydów była zlecana firmie *Genomed* (Warszawa).

Fosforylacja oligonukleotydów

Mieszanina oligonukleotydów wymagała fosforylacji końców 5' w celu późniejszej efektywnej ligacji do wektora. Przed reakcją fosforylacji sprawdzano, czy oba oligonukleotydy z pary (kierunek F i R) mają podobne stężenia. Jeśli nie, dostosowywano ilość obu oligonukleotydów do ~75 pmol.

Skład mieszaniny dla każdego oligonukleotydu (20 μ l):

75 pmoli oligonukleotydu

1x bufor PNK A

2 mM ATP

1 μ l kinazy PNK

Reakcja fosforylacji prowadzona była przez 1,15 godziny w 37°C; następnie inaktywowano enzym przez denaturację w 80°C przez 15 min.

Dupleksowanie oligonukleotydów

Bezpośrednio po fosforylacji, oligonukleotydy tworzące daną wstawkę poddawano reakcji dupleksowania.

Skład mieszaniny (100 μ l):

~75 pmol fosforylowanego oligonukleotydu F (nić +)

~75 pmol fosforylowanego oligonukleotydu R (nić -)

1x bufor do dupleksowania

Reakcję dupleksowania oligonukleotydów prowadzona była w bloku grzewczym; próby inkubowano przez 10 min w 80°C, a następnie blok grzewczy wyłączano i zostawiano próby w bloku do powolnego ostygnięcia przez noc.

4.1.3. Ligacja

Wektor i gotową dwuniciową wstawkę ligowano w stosunku molarnym wektor : insert = 1 : 5.

Skład mieszaniny do ligacji (30 μ l):

1x buforu do ligacji

1 μ l ligazy

0,75 pmola zdupleksowanej pary oligonukleotydów lub wstawki PCR

100 ng wektora pDluc.

Reakcję prowadzono w termocyklerze, w temperaturze 4°C, przez noc (przez minimum 12 godzin).

4.2. Namnażanie zrekombinowanego plazmidu w bakteriach

4.2.1. Bakterie elektrokompetentne

Elektrokompetentne bakterie *Escherichia coli* DH5α przygotowywano według poniższego protokołu:

1. Bakterie *E. coli* DH5α wysiewano eżą na szalkach Petriego z pożywką LB bez antybiotyku. Hodowano przez noc w 37°C.
2. Przenoszono po jednej kolonii do dwóch butelek hodowlanych typu falcon z napowietrzaniem i pożywką LB bez ampicyliny. Hodowano przez noc w 37°C, przy wytrząsaniu 220 RPM.
3. 4 ml całonocnej hodowli bakteryjnej przenoszono do 2 litrów świeżej pożywki LB. Hodowano przez noc w 37°C i przy wytrząsaniu 220 RPM do osiągnięcia absorbancji w wysokości od 0,4 do 0,7 OD. Absorbancję analizowano spektrofotometrycznie a jako próbę referencyjną używano czystej pożywki LB.
4. Po osiągnięciu odpowiedniej absorbancji, hodowle wirowano przy 4200 RPM, przez 20 min, w 4°C.
5. Bakterie zawieszano w 10% roztworze glicerolu i wirowano j/w. Procedurę zawieszania powtórzono dwukrotnie.
6. Osad bakteryjny zawieszano w 2 ml 10% glicerolu, porcjowano i zamrażano w ciekłym azocie. Przechowywano w -80°C.

4.2.2. Transformacja i selekcja bakterii

Elektrokompetentne bakterie *E. coli* DH5α transformowano przygotowanymi wcześniej wektorami reporterowymi ze wstawkami.

1. Bakterie przenoszono do kuwety do elektroporacji (*Bio-Rad*, odległość między elektrodami 0,2 cm) zawieszano w 1 ml pożywki SOC i dodawano 3,5 ng wektora.
2. Bakterie transformowano przez elektroporację prądem o napięciu 2,5 kV; 25 mF, 200 Ω. Następnie zawiesinę bakterii przenoszono do próbówki typu eppendorf i inkubowano 45 minut 37°C w cieplarni.
3. Po inkubacji 200 µl zawiesiny bakterii wysiewano przez wcieranie na szalki ze stałą pożywką LB i ampicyliną i hodowano przez noc w 37°C w cieplarni.

4.2.3. Kolonijny PCR

Kontrolę konstruktów w transformantach przeprowadzano wykorzystując metodę kolonijnego PCR (ang. *colony* PCR). Jest to odmiana reakcji PCR, która nie wymaga izolacji materiału genetycznego służącego za matrycę. Ze względu na obecność inhibitorów reakcji, nie jest ona tak wydajna jak standardowa technika PCR, jednak pozwala na przebadanie dużej ilości kolonii bakteryjnych w krótkim czasie.

Z każdej płytki pobierano końcówką pipety po 10 kolonii bakteryjnych. Kolonie przenoszono do probówki z 100 μ l płynnej pożywki LB z ampicyliną i następnie pobierano z niej 5 μ l, które rozcieńczano w 45 μ l wody. Tak przygotowane bakterie stanowiły matrycę do reakcji PCR.

Skład mieszaniny do kolonijnego PCR (mieszanina na jedną reakcję 20 μ l):

1x bufor PCR

25 mM MgCl₂

2,5 mM dNTP

20 μ M startery pDluc (F+R) zlokalizowane w obrębie sekwencji plazmidu

0,1 μ l polimeraza Taq

5 μ l roztworu wodnego pojedynczej kolonii bakteryjnej (jako matrycowe DNA)

Reakcję amplifikacji PCR prowadzono używając programu:

1. 94°C – 10 min

2. 94°C – 15 min

3. 56°C – 15 min

4. 72°C – 30 min

Krok 2-4 – 24x

5. 72°C – 5 min

6. 4°C

Produkty kolonijnego PCR rozdzielano w 2,5% żelu agarozowym przy napięciu 100 V. Zawieszone w pożywce LB kolonie, w których PCR wykazał obecność dłuższego produktu reakcji PCR (powyżej ~130 nt), przenoszono do 1,9 ml pożywki LB z ampicyliną i prowadzono całonocną hodowlę w 37°C z wytrząsaniem 250 RPM. Następnego dnia dany plazmid izolowano metodą lizy alkalicznej i sekwencjonowano.

4.2.4. Izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej

1. Pojedynczą kolonię zaszczepiano w 2 ml pożywki LB z ampicyliną. Hodowano przez noc w 4°C.
2. Hodowlę wirowano przy 10 000 RPM i zawieszano w wodzie.
3. Do osadu dodawano 100 µl zimnego Roztworu I (50 mM glukoza, 25 mM TRIS pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0) i mieszano przez odwracanie próbówki.
4. Następnie kolejno dodawano po 200 µl Roztworu II (0,2M NaOH i 1% SDS) i Roztworu III (mieszanina 5M octanu potasu i kwasu octowego o pH 4,8)
5. Po wymieszaniu, próbkę inkubowano na lodzie przez 3 min.
6. Próbkę wirowano dwukrotnie, każdorazowo usuwając supernatant.
7. DNA plazmidowe wytrącano 96% alkoholem, wirowano i usuwano supernatant.
8. Oczyszczone DNA suszono w RT przez 45 minut i rozpuszczano w 35 µl buforu TE.

Po zakończeniu izolacji, ilość i czystość oczyszczonego DNA plazmidowego mierzono urządzeniem Nanodrop.

4.2.5. Sekwencjonowanie plazmidowego DNA

Plazmidy wyizolowane za pomocą lizy alkalicznej sekwencjonowano metodą Sangera (dideoxy), jako usługę zleconą (Wydziałowa Pracownia Sekwencjonowania na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu).

4.2.6. Stocki glicerolowe

Po potwierdzeniu sekwencji wstawki, kolonie bakteryjne zawierające plazmidy z określoną wstawką, namnażano w całonocnej hodowli w pożywce LB z ampicyliną i zamrażano w -80°C w mieszaninie zawierającej 25% glicerolu i 75% pożywki LB.

4.2.7. Izolacja plazmidowego DNA za pomocą zestawu *MaxiPrep*

Zrekombinowane plazmidy wykorzystywane jako matryce do badania procesu PTC *readthrough* izolowano za pomocą komercyjnego zestawu *MaxiPrep* firmy Qiagen według instrukcji producenta. Po zakończeniu izolacji, ilość i czystość oczyszczonego DNA plazmidowego mierzono urządzeniem Nanodrop.

4.3. Trankrypcja i translacja *in vitro* (TnT)

4.3.1. Reakcja TnT

1. Do probówek reakcyjnych dodawano odpowiednią ilość AAGs i wody, aby w objętości 5 μ l uzyskać odpowiednie stężenia końcowe jednego z czterech testowanych AAGs (dla paromomycyny, gentamycyny i amikacyny: 0, 5 ng/ μ l, 10 ng/ μ l, 15 ng/ μ l; dla G418: 0, 0,5 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 1,5 ng/ μ l). Dla każdej wstawki z PTC przygotowywano równolegle identyczne reakcje z AAGs zawierające wstawkę kontrolną typu dzikiego (bez PTC).

2. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną na odpowiednią ilość reakcji TnT (odczynniki są częścią zestawu *TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System* firmy Promega):

0,5 μ l mieszaniny aminokwasów bez metioniny

1 μ l znakowanej radioaktywnie metioniny

0,5 μ l *RNAsin* (inhibitor RNaz)

0,5 μ l polimerazy T7

12,5 μ l lizatu retikulocytów króliczych

Objętość końcowa 1 reakcji: 20 μ l.

3. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano plazmid ze wstawką (dalej nazywany konstruktem),

4. Próbkę inkubowano przez 90 minut w 30°C, a po zakończeniu inkubacji mieszano z obciążaczem *SDS Loading Buffer* firmy Bio-Rad według instrukcji producenta i zamrażano w -20°C.

Ze względu na promieniowanie radioaktywne, eksperymenty TnT przeprowadzano w pracowni izotopowej IGCz PAN, z zachowaniem wszystkich zasad i środków bezpieczeństwa. Dla każdej pary wstawek (wstawka z PTC i wstawki typu dzikiego) eksperymenty były wykonywane przynajmniej trzykrotnie, a ich wyniki były uśredniane.

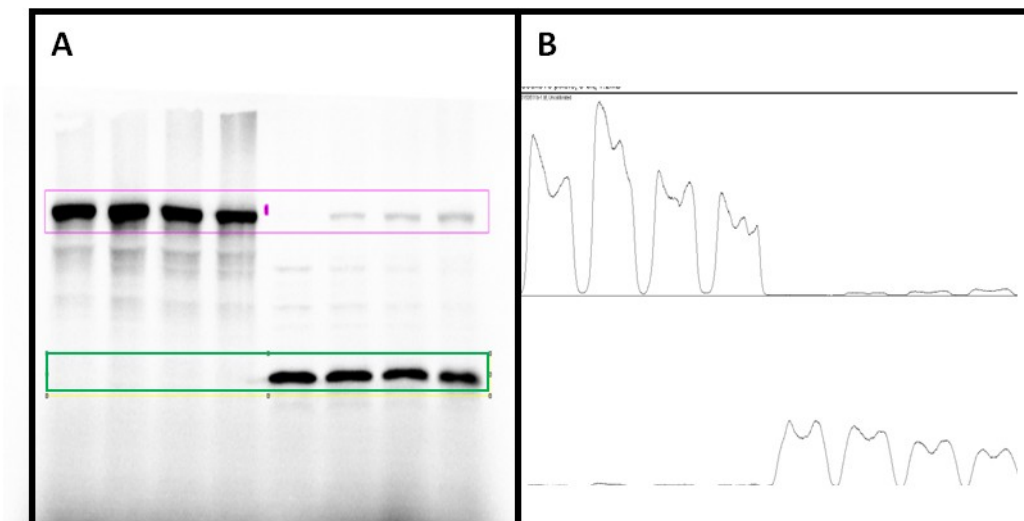
4.3.2. Rozdział białek na żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).

Produkty reakcji TnT zmieszane z obciążaczem rozmrażano w temperaturze pokojowej i denaturowano przez 10 min w 70°C. Po zakończeniu inkubacji, próbki wirowano i nakładano na 12% żel SDS-PAGE. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100-120 V w aparacie *Mini-PROTEAN® Tetra Cell System* firmy Bio-Rad aż do momentu

zetrzeżenia się barwnika z obciążacza z dolną krawędzią żelu. Po zakończeniu elektroforezy, żel suszono w suszarce do żeli przez 45-60 minut w temperaturze 80°C, przenoszono do kasety ekspozycyjnej z ekranem fosforowym i ekspozowano przez 48 godzin. Ekrany fosforowe skanowano na urządzeniu *Fujifilm* FLA-5000 (dzięki uprzejmości Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu) w rozdzielczości 25 μm i eksportowano w bezstratnym formacie zapisu danych .tiff.

4.3.3. Analiza densytometryczna obrazu żeli poliakrylamidowych.

Skany żeli poliakrylamidowych (Ryc. 17A) z produktami reakcji TnT analizowano densytometrycznie za pomocą wtyczki do analizy żeli (funkcja: *Analyse Gels*) w programie ImageJ¹⁷². Program ImageJ pozwalał na przedstawienie intensywności prążków w postaci wykresów (Ryc. 17B), pomiar powierzchni pików na wykresie pozwolił na ocenę ilościową intensywności danego prążka żelu. Dane z programu ImageJ następnie eksportowano i normalizowano intensywność sygnału obydwu oligopeptydów (dłuższego i krótszego), ze względu na liczbę wbudowanych reszt radioaktywnej metioniny. Prążek wyższy na żelu odpowiadał dłuższemu produktowi (rluc-wstawka-fluc), a niższy – produktowi krótszemu (rluc-część wstawki).



Rycina 17. Analiza żeli poliakrylamidowych po reakcji TnT. A) Przykładowy rozdział produktów reakcji TnT na żelu białkowym (obraz z ekranu fosforowego). Zielona ramka wskazuje krótszy produkt reakcji (rluc+wstawka), a różowa ramka, dłuższy produkt (rluc+wstawka+fluc). B) Analiza densytometryczna obrazu przedstawionego w Panelu A w programie ImageJ.

Następnie, obliczano wydajność procesu PTC *readthrough*: znormalizowana intensywność dłuższego produktu białkowego była dzielona przez sumę normalizowanych intensywności obydwu produktów. Intensywność PTC *readthrough* dla konstruktów zawierających wstawki z sekwencją typu dzikiego nietraktowanych AAGs była uznawana za 100% PTC *readthrough* danej wstawki.

4.4. Hodowle komórek nabłonka oddechowego

W niniejszej pracy zastosowano dwie różne metody hodowli nabłonka oddechowego – metodę sekwencyjną (adherentno-zawiesinową) według Jorissena^{173,174} oraz metodę hodowli na styku faz znaną jako metoda ALI (ang. *air-liquid interface*)^{175,176}. Obydwie metody umożliwiają namnożenie wysianych komórek nabłonka oddechowego oraz ich zróżnicowanie w kierunku orzęsionego nabłonka oddechowego.

4.4.1. Wysiewanie komórek nabłonka oddechowego (dla obydwu typów hodowli)

1. W świeżo pobranym materiale (polip nosowy) komórki nabłonkowe odtrawiano od reszty materiału poprzez inkubację w 0,1% roztworu pronazy w WASH MEDIUM przez noc w 4°C, w ciemności i z rotacją.
2. Po zakończeniu trawienia, pojemnik z materiałem wytrząsano energicznie przez 20 sekund, aby oddzielić komórki nabłonkowe od reszty polipa. Pozostałości polipa usuwano, a do zawiesiny komórek dodawano 1 ml surowicy FCS, aby zahamować aktywność pronazy. Zawiesinę wirowano 5 min w 800 RPM w 4°C; osad komórek płukano dwukrotnie WASH MEDIUM.
3. Komórki zawieszano w ADH MEDIUM i przenoszono do czystej butelki T25 do hodowli adherentnej. Fibroblasty zanieczyszczające zawiesinę komórkową usuwano przez inkubację przez 60 min w 37°C, 5% CO₂, wykorzystując różnice w adhezji do podłoża fibroblastów i komórek nabłonkowych.
4. Komórki po inkubacji przenoszono do probówki typu Falcon 50 ml, liczono pod powiększeniem 40x i wysiewano po 25 000 komórek na cm² powierzchni butelek hodowlanych T25.

W metodzie sekwencyjnej hodowli, butelki były wcześniej powleczone żelem kolagenowym z ogonów szczurzych rozpuszczonym w 0,1 M kwasie octowym, a komórki zawieszano w pożywce ADH MEDIUM. W hodowlach ALI, butelki były powlekane

kolagenem ze skóry bydlęcej *PureCol*, a komórki wysiewane były w pożywkę BEGM. Po wysianiu komórki hodowano w inkubatorze (37°C, 5% CO₂).

4.4.2. Metoda sekwencyjna hodowli komórek nabłonka oddechowego

Adherentna hodowla komórek nabłonka oddechowego (hodowla ADH)

W hodowli sekwencyjnej, pożywkę ADH MEDIUM wymieniano trzy razy w tygodniu. Każdorazowo kontrolowano stan hodowli pod mikroskopem. Po około dwóch-trzech tygodniach, kiedy komórki nabłonka zarastały całą powierzchnię dna butelki i zaczynały nadtrawiać kolagen, komórki przenoszono z hodowli adherentnej do zawiesinowej.

Po usunięciu pożywki, warstwę komórek i żelu kolagenowego cięto skrobaczką, po czym warstwę żelu kolagenowego trawiono za pomocą kolagenazy typu IV (37°C, 30 do 90 minut, aż do całkowitego strawienia kolagenu z dna butelki). Pocięte fragmenty warstwy komórek z każdej butelki przenoszono delikatnie do próbówki typu falcon 15 ml, płukano trzykrotnie w WASH MEDIUM i wirowano. Po trzecim płukaniu, komórki zawieszano w ADH MEDIUM i przenoszono do butelki T25 do hodowli zawiesinowej, komórki przenoszono do wytrząsarki rotacyjnej o temperaturze 37°C (prędkość wytrząsania 80 RPM). Po 24 godzinach inkubacji w ADH MEDIUM, zmieniano pożywkę na SUSP MEDIUM.

Zawiesinowa hodowla komórek nabłonka oddechowego (hodowla SUSP)

Przez cały okres hodowli zawiesinowej, komórki przechowywano w inkubatorze z wytrząsaniem, a pożywkę SUSP MEDIUM wymieniano co 2 dni. W ciągu następnych 7-10 dni, inkubowane w zawieszynie fragmenty warstwy komórek tworzyły stabilne trójwymiarowe agregaty (sferoidy). W komórkach zorganizowanych w sferoidy rozpoczynał się proces ciliogenezy: krótkie rzęski były widoczne po około 2 tygodniach hodowli, optymalną długość osiągając po ok. 21 dniach.

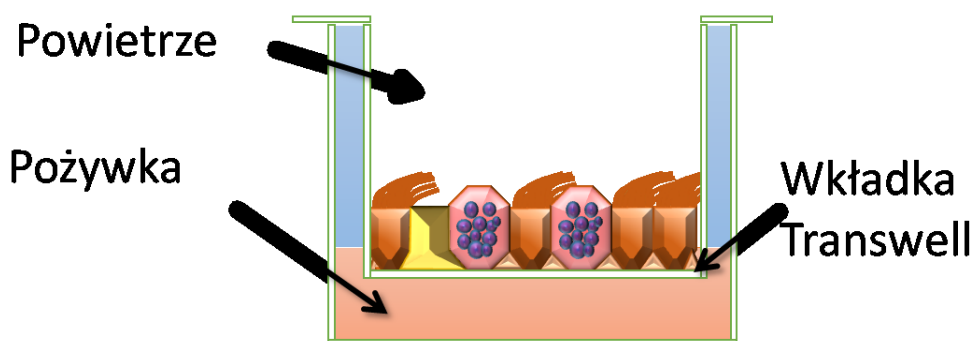
Traktowanie komórek AAGs

Pomiędzy dniami 16 a 19 hodowli ADH, komórki nabłonka oddechowego hodowane w hodowli sekwencyjnej były traktowane przez 96 godzin różnymi stężeniami AAGs (1000 µg/ml i 2000 µg/ml w przypadku paromomycyny, amikacyny i gentamycyny oraz 200 µg/ml i 400 µg/ml w przypadku G418). Następnie komórki inkubowano przez

kolejne 24 godziny w standardowym medium hodowlanym ADH, po czym przenoszono do hodowli zawieszinowej.

4.4.3. Hodowla komórek nabłonka oddechowego na styku fazy ciekłej i powietrza (ang. *air-liquid interface*; ALI)

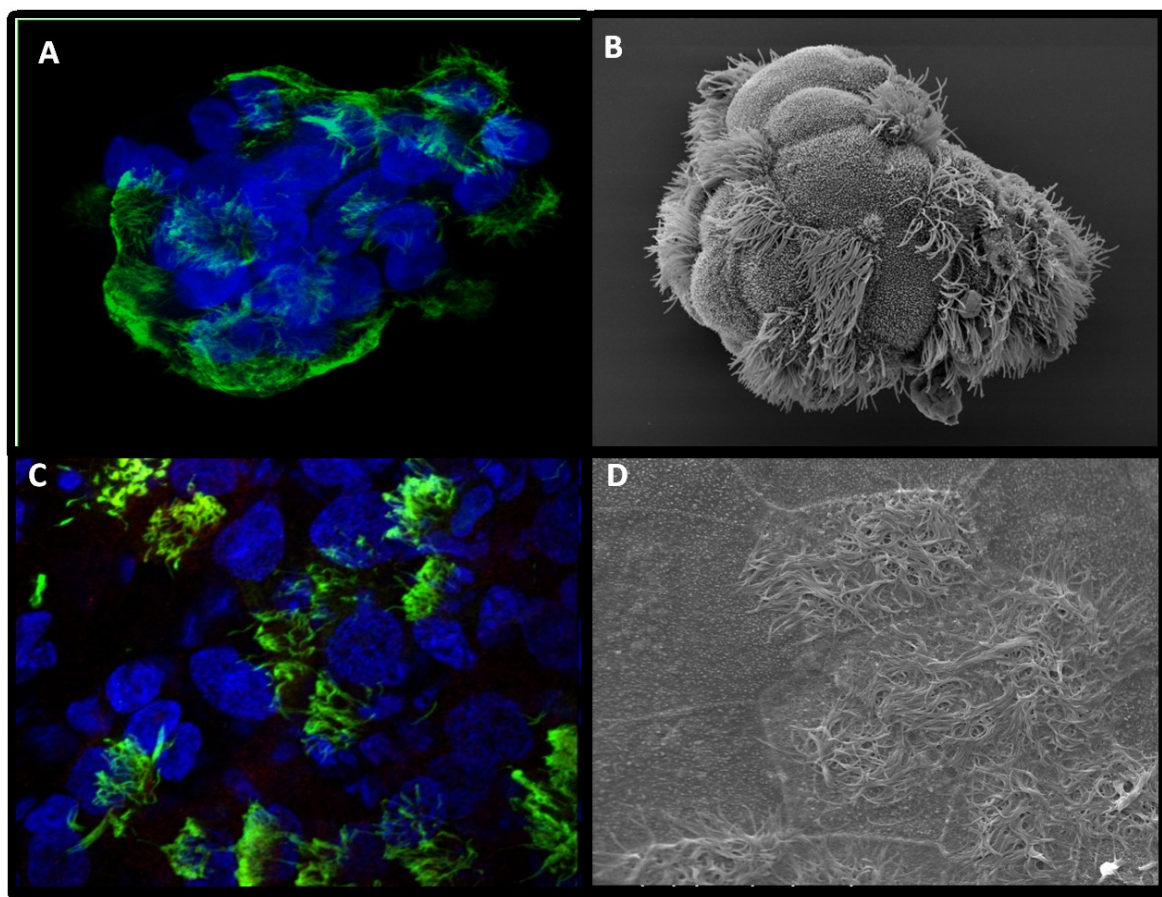
W początkowym etapie hodowli ALI (hodowla zanurzona w pożywce BEGM), wymieniano pożywkę BEGM co dwa dni, każdorazowo monitorując stan hodowli pod mikroskopem. Kiedy komórki wysiane na butelki T25 osiągnęły ok. 75-80% konfluencji, pasażowano je do większej butelki hodowlanej o powierzchni T75. Po osiągnięciu ok. 80% konfluencji na butelkach T75, komórki przenoszono na wkładki typu Transwell (Ryc. 18) z membraną poliestrową (ok. 250 000 komórek na wkładkę Transwell o średnicy 12 mm) w pożywce ALI MEDIUM; pożywka znajdowała się zarówno pod spodem jak i we wnętrzu wkładki. Po osiągnięciu konfluencji komórek we wkładce (ok. 2-3 dni), do pożywki ALI MEDIUM dodawano dodatkowo retinol (stężenie końcowe 100 mM), a pożywkę podawano jedynie od strony bazalnej komórek (pod membraną). W czasie hodowli ALI, pożywkę wymieniano co dwa dni.



Rycina 18. Zasada hodowli komórek nabłonka oddechowego metodą ALI.

4.4.4. Potwierdzenie obecności rzęsek na zróżnicowanych komórkach nabłonka oddechowego.

Obecność rzęsek na komórkach nabłonka oddechowego potwierdzano po 21 dniach hodowli w zawieszinie SUSP lub po 28 dniach hodowli ALI. W tym celu korzystano z barwień immunofluorescencyjnych z użyciem markera rzęsek - przeciwciała przeciw acetylowanej α -tubulinie (Ryc. 19A i 19C), a także za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *scanning electron microscopy*; SEM) (Ryc. 19B i 19D).



Rycina 19. Potwierdzenie obecności rzęsek na zróżnicowanych komórkach nabłonka oddechowego. Orzęsiony sferoid z hodowli sekwencyjnej: A) obraz z mikroskopii fluorescencyjnej, B) obraz z mikroskopii SEM. Powierzchnia hodowli ALI: C) obraz z mikroskopii fluorescencyjnej D) obraz z mikroskopii SEM. (A i C) kolor zielony - marker rzęsek (acetylowana α -tubulina), kolor niebieski: marker jąder komórkowych (DAPI). Obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym prowadzono pod obiektywem 63x, natomiast w SEM stosowano powiększenie 5000x.

4.5. Barwienia immunofluorescencyjne

4.5.1. Przygotowanie preparatów do immunofluorescencji

Komórki nabłonka oddechowego z hodowli sekwencyjnej (etap hodowli zawiesinowej SUSP) wirowano w temperaturze pokojowej przy prędkości 900 RPM. Komórki były następnie dwukrotnie płukane PBS i wirowane, po czym utrwalane za pomocą 4% roztworu paraformaldehydu (PF) w PBS przez 15 min, w temperaturze pokojowej. Po utrwalaniu, komórki dwukrotnie płukano PBS, zawieszano w PBS i nakładano na mikroskopowe szkiełko podstawowe typu *Super frost*.

Po około 12 godzinach w temperaturze pokojowej, szkiełka przenoszono do -80°C, gdzie przechowywano je aż do momentu barwienia.

4.5.2. Protokół barwienia immunofluorescencyjnego

1. Na szkiełkach mikroskopowych zaznaczono pole z komórkami pisakiem woskowym i suszono.
2. Preparaty płukano PBS, utrwalono w roztworze 4% PF, pH 7,4 przez 15 min i ponownie płukano dwukrotnie w PBS przez 20 min.
3. Preparaty płukano w 50 mM NH₄Cl przez 15 min i następnie dwukrotnie w PBS przez 5 min.
4. Szkiełka inkubowano na rozgrzonym do 80°C bloku grzejnym z 10 mM cytrynianem pH 8,5 przez 10 minut. Potem płukano 2 x PBS przez 5 min.
5. Inkubowano w 0,2% roztworze Triton X-100/PBS przez 15 min i dwukrotnie płukano PBS przez 20 min.
6. Blokowano przez minimum 1 godzinę z roztworem 10% koziej surowicy lub 5% BSA/PBS w RT i następnie inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym (królicza acetylowaną α -tubulina). Płukano trzy razy przez 20 min w PBST (PBS + 0,1% Tween-20).
7. Inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym Alexa 488 (*goat anti-rabbit, Life Technologies*), stężenie 1:1000, inkubacja 25 min, w RT i w ciemności. Następnie, płukano trzy razy przez 20 min w PBST.
8. Jądra komórkowe barwiono roztworem DAPI o stężeniu 1:2000 przez 20 min w RT i dwukrotnie płukano w PBS przez 10 min.
9. Preparaty nakrywano szkiełkiem nakrywkowym 24 x 60 z medium zamykającym DAKO. Następnie przechowywano przez kilka dni w 4°C, w ciemności, aż do wyschnięcia medium.

4.6. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

4.6.1. Przygotowanie preparatów z hodowli sekwencyjnej do skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM)

Sferoidy pobrane bezpośrednio z hodowli zawiesinowej SUSP płukano dwukrotnie w PBS i nakładano na szkiełka nakrywkowe. Po wyschnięciu, preparaty utrwalano

3% roztworem glutaraldehydu w 0,1 M buforze kakodylanowym w 4°C przez 2 godziny. Preparat płukano trzy razy przez 20 min 4°C w zimnym buforze kakodylanowym. Następnie preparat odwadniano w szeregu rozcieńczeń etanolu (10, 30, 50 i 70%), dwa razy po 10 min w każdym rozcieńczeniu. Po odwodnieniu preparaty wysłano do Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w celu wysuszenia w stanie krytycznym i wykonania zdjęć w skaningowym mikroskopie elektronowym.

4.6.2. Przygotowanie preparatów z hodowli ALI do skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM)

Wkładki typu Transwell z hodowlą ALI wycinano z plastikowej ramki i umieszczano w płytce 12 dołkowej. Płukano dwukrotnie w PBS, traktowano 5% roztworem N-acetylo-cysteiny i płukano kolejne trzy razy buforem PBS. Preparaty były utrwalane 3% roztworem glutaraldehydu w 0,1 M buforze kakodylanowym w 4°C przez dwie godziny. Następnie preparaty traktowano analogicznie jak w przypadku przygotowania preparatów z hodowli sekwencyjnej (opisane w poprzednim rozdziale).

4.7. Wideomikroskopia

Jakościowe zmiany w żywotności komórek i w formowaniu się rzęsek były monitorowane poprzez bezpośrednią obserwację hodowli SUSP w butelkach w temperaturze pokojowej i pod powiększeniem 40x, za pomocą wideomikroskopii szybkoklatkowej (ang. *high speed videomicroscopy*; HSVM) za pomocą kamery *Basler* o szybkości nagrywania 120 klatek na sekundę oraz oprogramowania komputerowego SAVA¹⁷⁷.

4.8. Hodowla komórek HEK293

Komórki HEK293 wysiewano w butelkach hodowlanych T75 z odpowiednią ilością pożywki HEK MEDIUM z antybiotykiem. Pożywkę zmieniano na świeżą po 48 godzinach inkubacji w 37°C. Po osiągnięciu 85-90% konfluencji komórki pasażowano do nowej butelki hodowlanej z taką samą pożywką w stosunku objętościowym 1:6. Komórki były poddawane transfekcji po 5-12 pasażach od rozmrożenia.

4.8.1. Transfekcja komórek HEK293

Komórki HEK293 o konfluencji 70-90% płukano jałowym PBS i przenoszono do próbówki typu falcon 50 ml. Pobierano 50 μ l zawiesiny komórek do policzenia w komorze *Neubauera*, a resztę komórek wirowano przy prędkości 2000 RPM, 5 min w temperaturze pokojowej. Supernatant usuwano i zawieszano komórki w pożywce RPMI, do końcowego stężenia 10 mln/ml. Następnie przenoszono po 10 000 komórek do próbówek typu eppendorf zawierających 1,5 μ l plazmidowego DNA.

Transfekcja była przeprowadzana metodą elektroporacji w urządzeniu *Neon* (1100 V; 20 ms; 2 pulsy). Po zakończeniu transfekcji komórki zawieszano w 0,5 ml pożywki HEK MEDIUM bez antybiotyku i hodowano w inkubatorze CO₂ w 37°C.

4.8.2. Analiza *Dual-Luciferase*

Po 24 godzinach od transfekcji, komórkom HEK293 zmieniano pożywkę na HEK MEDIUM bez antybiotyku wraz z odpowiednimi stężeniami AAGs (1000 μ g/ml i 2000 μ l/ml w przypadku paromomycyny, amikacyny i gentamycyny oraz 200 μ g/ml i 400 μ g/ml w przypadku G418). Każde stężenie antybiotyku testowano w trzech powtórzeniach (3 dołki w każdym eksperymencie). Komórki inkubowano przez 48 godzin w inkubatorze CO₂ w 37°C. Po tym czasie przeprowadzano lizę komórek (inkubacja z buforem 1x *Passive Lysis Buffer* (Promega) przez 1 godzinę).

Lizat przenoszono do białej płytki 96 dołkowej (po 20 μ l lizatu/dołek, trzy dołki na każdy lizat), pomiar aktywności obu lucyferaz (rluc i fluc) prowadzono w urządzeniu *GloMax Multi* (Promega) z iniektorami i zestawem odczynników *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega). Do pomiaru używano po 20 μ l lizatu z komórek HEK293 i 50 μ l odczynników *Dual-Luciferase®*. Dane były automatycznie eksportowane do programu *Excel*, w celu dalszej analizy statystycznej.

Analizę efektywności procesu PTC *readthrough* prowadzono w dwóch krokach. W pierwszym, obliczano stosunek luminescencji białka rluc do białka fluc w próbach transfekowanych wektorem zawierającym wstawkę z PTC i traktowanych AAGs. W drugim wynik normalizowano względem stosunku rluc do fluc w komórkach nietraktowanych, transfekowanych wektorem ze wstawką typu dzikiego niezawierającą PTC (wartość tę przyjmowano za 100%). Z 9 pomiarów luminescencji (3 powtórzenia eksperymentu, w każdym trzy powtórzenia techniczne danej próbki) dla każdej kombinacji

AAGs-wstawka w danym eksperymencie, odrzucano maksymalnie dwa pomiary najbardziej odbiegające od pozostałych.

4.9. Analizy dodatkowe

4.9.1. Pomiar zmiany wartości oporu elektrycznego w hodowli ALI

Zmianę wartości oporu elektrycznego poprzez warstwę zróżnicowanych komórek nabłonka oddechowego (ang. *Transepithelial Electrical Resistance*; TEER) analizowano woltomierzem *EVOM2* firmy *World Precision Instruments* w komórkach pierwotnych nabłonka oddechowego w dniu 28 hodowli ALI (około 45 dzień od wysiania komórek). Komórki traktowano przez 4 dni odpowiednimi stężeniami AAGs i NAGs, podając związki wraz z pożywką od strony bazalnej komórek. Pomiary TEER były wykonywane przez cały okres inkubacji z AAGs i NAGs, dwukrotnie w ciągu dnia (o godzinie 10.00 i 17.00).

4.9.2. Przesiewowe badanie toksyczności szerokiego zakresu stężeń związków NAGs

Zakres stężeń analizowanych związków NAGs (amleksanoks, azytromycyna, escyna, ataluren i tylozyna) został wstępnie określony na podstawie literatury i następnie zweryfikowany poprzez traktowanie nimi linii komórkowej 16HBE (linia komórek nabłonka oddechowego) wysianej na płytce 96 dołkowej (50 000 komórek/dołek) z pożywką MEM (*Sigma*) z 10% FCS. Po upływie 24 godzin komórki były barwione błękitem trypanu i analizowane pod mikroskopem świetlnym. Stężenia związków, które powodowały śmiertelność powyżej 50% komórek zostały odrzucone.

4.9.3. Analiza cytotoksyczności AAGs i NAGs za pomocą zestawu *MultiTox-Fluor*

Wkładki typu Transwell zawierające zróżnicowane komórki pierwotne nabłonka oddechowego (dzień 28 hodowli ALI, tzn. 45 dzień od wysiania komórek) wycinano z plastikowej ramki i dzielono na cztery równe fragmenty. Fragmenty membrany przenoszono do płytki 48-dołkowej i dodawano 300 µl pożywki BEGM wraz z rozcieńczeniami analizowanych AAGs lub NAGs. Równolegle przygotowano fragmenty membran hodowli ALI nietraktowane lub traktowane odpowiednimi rozpuszczalnikami związków (DMSO lub metanol). Po upływie 24 godzin inkubacji,

jedną z hodowli nietraktowanych inkubowano z digitoniną w stężeniu 100 µg/ml przez 30 min (śmierć 100% komórek, kontrola pozytywna cytotoksyczności). Następnie z każdej próby pobierano 100 µl pożywki znad komórek i przenoszono na płytkę 96-dołkową, w trzech powtórzeniach, pożywkę mieszano ze 100 µl odczynnika *MultiTox* 2X. Po dwóch godzinach inkubacji w inkubatorze wykonywano pomiar fluorescencji płytki w czytniku fluorescencyjnym. Fluorescencję żywych komórek mierzono za pomocą ekscytacji falami o długości 400 nm i emisji 505 nm, z kolei fluorescencję komórek martwych za pomocą ekscytacji falami o długości 485 nm i emisji 520 nm.

W dalszej analizie obliczano stosunek fluorescencji żywych komórek do fluorescencji martwych komórek; wyniki normalizowano względem wartości uzyskiwanych w nietraktowanej kontroli. Eksperymenty powtórzono trzykrotnie.

4.9.4. Szybkoklatkowa wideomikroskopia *Time-lapse*

Komórki nabłonka oddechowego z wymazów nabłonka nosa pobranych od kilku zdrowych dawców wysiewano na płycie 96-dołkowej (50 000 komórek/dołek; po trzy dołki dla każdego stężenia związku). Po 24 godzinach od wysiania, komórki były traktowane wybranymi stężeniami AAGs i NAGs rozpuszczonymi w pożywce hodowlanej BEGM. Równolegle przygotowano komórki nietraktowane lub traktowane odpowiednimi rozpuszczalnikami związków (DMSO lub metanol). Częstotliwość bicia rzęsek oraz procent rzęsek poruszających się w polu widzenia były rejestrowane w godzinowych odstępach przez 6 godzin, przy użyciu zautomatyzowanego mikroskopu z kamerą szybkoklatkową i komorą inkubacyjną (*Olympus* IX81 z oprogramowaniem *xCellence*). Następnie, analizowano zarówno częstotliwość bicia rzęsek jak i procent poruszających się rzęsek w polu widzenia kamery programem ImageJ z autorskim plug-in'em do analizy ruchu (własność Uniwersytetu w Southampton w Anglii).

5. WYNIKI

5.1. Selekcja mutacji wprowadzających PTC w genach związanych z patogenezą PCD

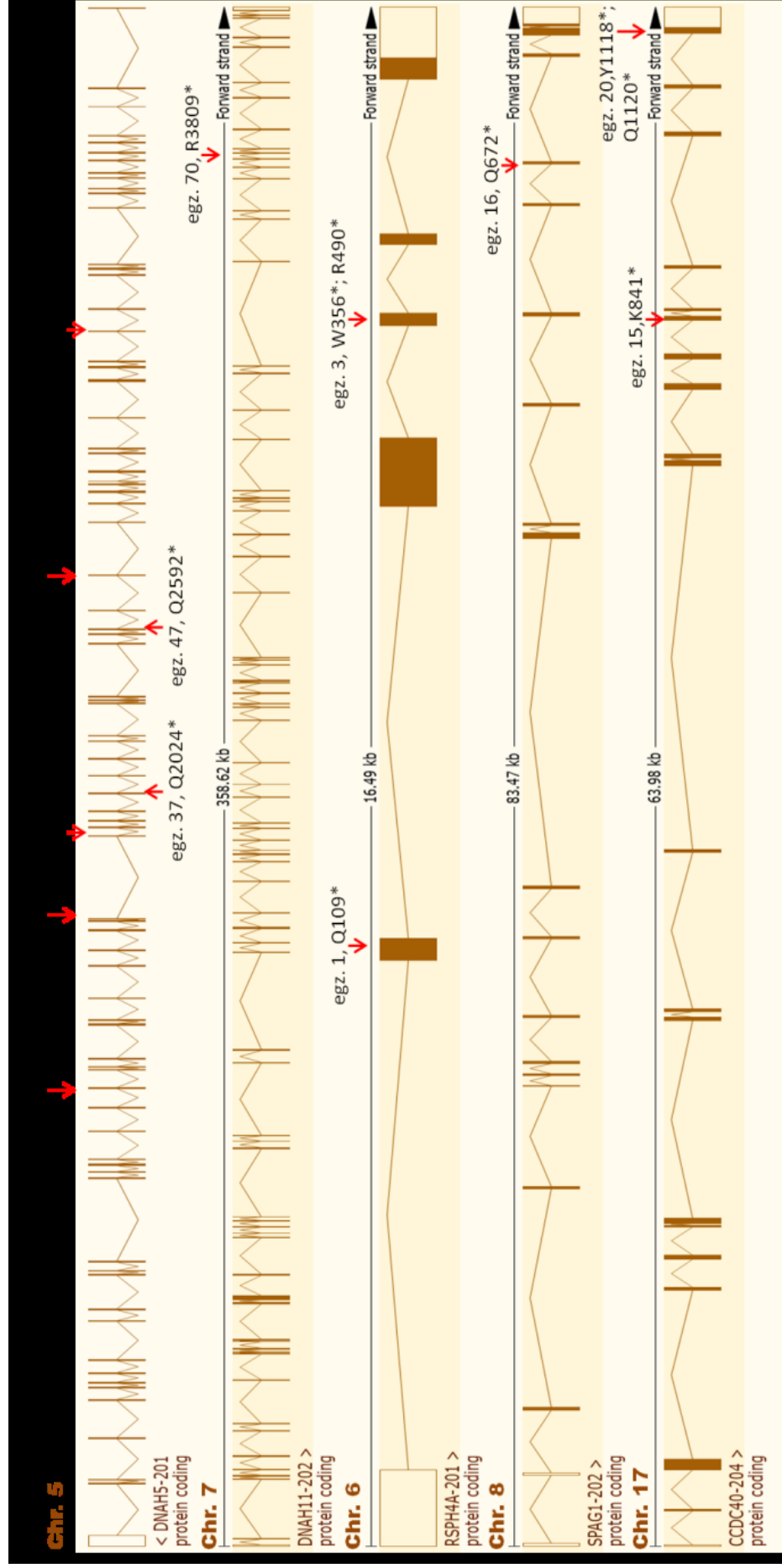
Wybór analizowanych mutacji oparty był na wynikach badań genetycznego podłoża PCD w polskiej populacji, prowadzonych od lat w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej IGCz PAN. Do badań wybrano jedynie te mutacje, które jak dotąd zostały wykryte w więcej niż jednej polskiej rodzinie. Przy wyborze kierowano się też tożsamością mutacji (tak, aby reprezentowane były wszystkie trzy kodony STOP) oraz otoczeniem sekwencyjnym PTC (preferowany nukleotyd w pozycji +4). Do badań wybrano 17 mutacji nonsensownych, zlokalizowanych w pięciu genach związanych z patogenezą PCD (Tab.1 i Ryc. 21).

Na podstawie wyselekcjonowanych sekwencji, przygotowano wstawki – krótkie sekwencje oligonukleotydów obejmujące daną mutację PTC z właściwą jej sekwencją genomową (od 8-10 nt w każdym kierunku), które po odpowiednim przygotowaniu wklonowywano do wektora pDluc.

Na rycinie 20 przedstawiono przykładową sekwencję dwuniciową wstawki. Wszystkie zaprojektowane sekwencje wstawek znajdują się w rozdziale 9 (MATERIAŁY DODATKOWE), na rycinach uzupełniających 1 i 2.



Rycina 20. Przykładowy schemat struktury wstawki gotowej do wklonowania do plazmidu pDluc (tu wstawka DNAH5_32, schemat dotyczy obydwu metod przygotowania wstawek). Na czerwono zaznaczono PTC; dużymi literami oznaczono sekwencję genomową; małymi literami oznaczono miejsca restrykcyjne dla enzymów (tu: HindIII i BglII). Niebieskimi strzałkami oznaczono „lepkie końce”, które są wymagane do ligacji wstawki ze zlinearyzowanym plazmidem. „Lepkie końce” powstały poprzez cięcie odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi (wstawki otrzymane metodą amplifikacji PCR) lub zostały zaprojektowane *de novo* (wstawki otrzymane metodą syntezy chemicznej).



Rycina 21. Lokalizacja wybranych mutacji PTC w genach *DNAH5*, *DNAH11*, *RSPH4A*, *SPAG1* i *CCDC40* oraz na chromosomach. Na podstawie: baza Ensembl Genome Browser; ensembl.org.

Tabela 1. Charakterystyka badanych mutacji wprowadzających PTC w genach zaangażowanych w patogenezę PCD.

Kolumna „częstość” opisuje % występowania mutacji wśród niespokrewnionych, polskich pacjentów z PCD (dane oparto na 295 rodzinach chorych na PCD, uwzględniając zarówno homozygoty jak i złożone heterozygoty).

Gen	Ekson	Mutacja	Częstość %	Substytucja nukleotydowa	Kodon STOP	Nazwa wstawki
DNAH5	20	Q1031*	0.7	C/T	UAG	DNAH5_20
	32	R1711*	0.7	C/T	UGA	DNAH5_32
	34	E1843*	0.3	G/T	UAA	DNAH5_34a
	34	R1883*	0.3	C/T	UGA	DNAH5_34b
	37	Q2024*	0.3	C/T	UAG	DNAH5_37
	47	Q2592*	0.3	C/T	UAA	DNAH5_47
	49	R2677*	1.4	C/T	UGA	DNAH5_49
	62	R3481*	0.3	C/T	UGA	DNAH5_62
DNAH11	70	R3809*	1.0	C/T	UGA	DNAH11_70
SPAG1	16	Q672*	12.5	C/T	UAG	SPAG1_16
RSPH4A	1	Q109*	1.0	C/T	UAG	RSPH4A_1
	3	W356*	0.3	G/A	UGA	RSPH4A_3a
	3	R490*	0.7	C/T	UGA	RSPH4A_3b
CCDC40	15	K841*	0.3	A/T	UAG	CCDC40_15
	20	Y1118*	3.1	C/A	UAA	CCDC40_20a
	20	Q1120*	0.3	C/T	UAG	CCDC40_20b

5.2. Optymalizacja metody przygotowywania konstruktów zawierających badane sekwencje z PTC

5.2.1. Wektory reporterowe ze wstawkami otrzymanymi metodą amplifikacji PCR

Pierwszą testowaną metodą uzyskiwania konstruktów ze wstawkami z mutacjami PTC była amplifikacja PCR na matrycy DNA pacjentów z homozygotycznymi mutacjami (lub osób zdrowych w przypadku wstawek typu dzikiego). Metoda ta została przetestowana na trzech wstawkach (DNAH5_32, DNAH5_47 i DNAH5_49). Startery do tych reakcji zawierały w okolicy końca 5' miejsce restrykcyjne dla enzymów HindIII (starter F) i BglII (starter R).

Uzyskane amplikony o długości 70 pz trawiono enzymami HindIII i BglII, oczyszczano oraz klonowano metodą ligacji „lepkich końców” do wektora pDluc, zlinearyzowanego za pomocą tych samych enzymów restrykcyjnych. Tak przygotowanym konstruktem transformowano bakterie *E. coli* DH5 α , które następnie poddawano selekcji ampicyliną. Poprawność transformacji analizowano metodą kolonijnego PCR. Poszukiwano klonów, w których kolonijny PCR amplifikował produkty produktów PCR o długości 182 pz; wektor bez wstawki generował produkt PCR o długości około 160 pz. Pierwsze eksperymenty przy użyciu enzymów restrykcyjnych HindIII i BglII wykazały, że efektywność ligacji w tej procedurze wynosi poniżej 5%.

W celu optymalizacji efektywności procesu przygotowywania konstruktów, zaprojektowano zmodyfikowaną wersję wstawek, zawierające miejsce restrykcyjne dla enzymu XhoI, zamiast wcześniej stosowanego miejsca trawienia dla enzymu HindIII. Wprowadzono także trawienie sekwencyjne pojedynczymi enzymami zamiast trawienia obydwoma enzymami jednocześnie (najpierw XhoI, po jego inaktywacji, BglII); zoptymalizowano także warunki trawienia. Po zastosowaniu tych modyfikacji, efektywność ligacji wzrosła jedynie do ok. 15%.

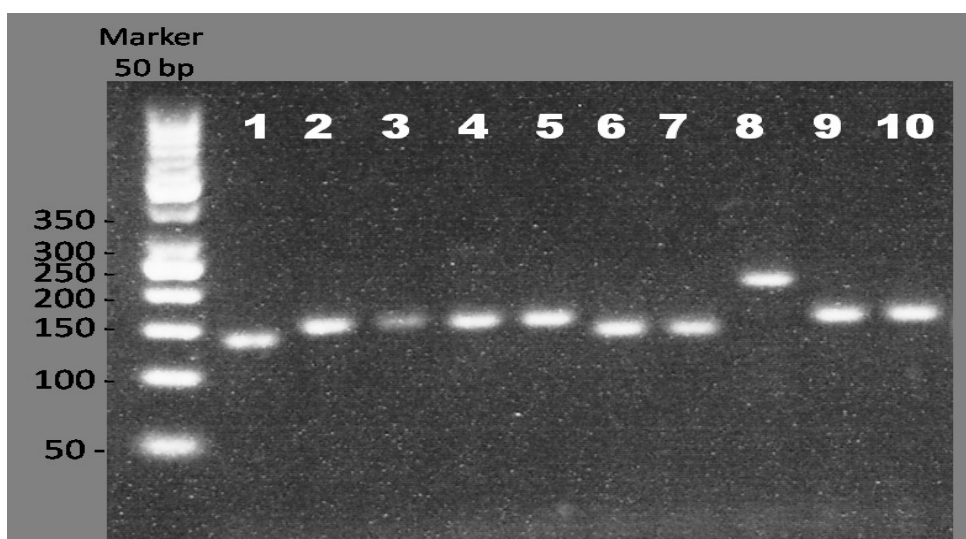
Analiza sekwencji zrekombinowanych plazmidów wykazała obecność prawidłowych sekwencji jedynie dla wstawek DNAH5_32 i DNAH5_47; sekwencja wstawki DNAH5_49 posiadała liczne mutacje punktowe. Ze względu na niską efektywność

oraz podatność na akumulację losowych mutacji punktowych lub delecji całych fragmentów sekwencji uzyskiwanych metodą amplifikacji PCR, zdecydowano się na kontynuację badań z wykorzystaniem konstruktów ze wstawkami uzyskanymi drogą syntezy chemicznej oligonukleotydów.

5.2.2. Wektory reporterowe ze wstawkami otrzymanymi metodą syntezy chemicznej oligonukleotydów.

Równolegle do metody tworzenia wstawek za pomocą amplifikacji PCR testowano metodę tworzenia wstawek za pomocą syntezy chemicznej. Podejście to przetestowano początkowo dla trzech PTC, tych samych co w metodzie amplifikacji PCR: DNAH5_32, DNAH5_47 i DNAH5_49. Każdy z dwóch zsyntetyzowanych chemicznie oligonukleotydów zawierał PTC wraz z otoczeniem (po 8-10 nt w każdą stronę od PTC), a końce 5' i 3' każdego z oligonukleotydów zawierały także lepkie końce odpowiednich miejsc restrykcyjnych. Dwuniciowa wставка dla danego PTC była tworzona przez zdupleksowanie ufosforylowanych oligonukleotydów.

W przypadku sekwencji zawierających lepkie końce dla miejsc restrykcyjnych HindIII i BglII stwierdzono niską wydajność ligacji wstawki z plazmidem pDluc (poniżej 5%). Podobnie jak w przypadku wstawek uzyskanych metodą PCR, dokonano optymalizacji metody poprzez modyfikację sekwencji wstawek polegającą na zamianie miejsca trawienia enzymem HindIII na XhoI. Po tej zmianie oraz po optymalizacji procesu przygotowania oligonukleotydów do ligacji, wydajność ligacji wzrosła do ok. 60-75% (Ryc. 22).

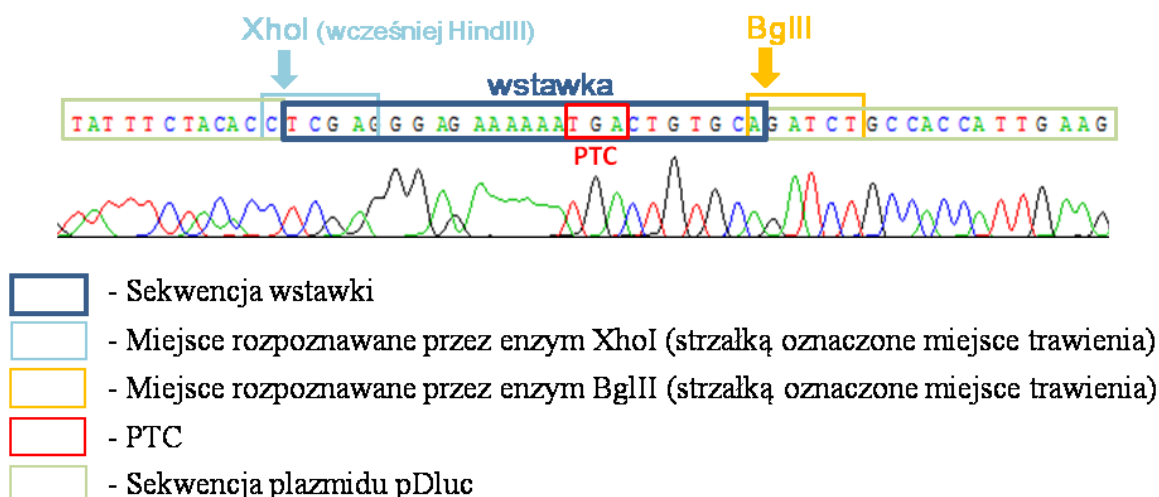


Rycina 22. Przykładowy wynik reakcji kolonijnego PCR (tu: dla konstruktów DNAH5_32). W ścieżce 1, kontrola z pustym plazmidem pDluc (produkt o dłg. 160 pz). Na 9 analizowanych kolonii, w 6 zaobserwowano produkt oczekiwanej długości (efektywność 67%). W ścieżce 8, prążek na wysokości ~250 pz wskazuje kilkukrotne wklonowanie wstawki do jednego plazmidu. Prążki w ścieżkach 6 i 7 świadczą o braku wstawki, prążki w pozostałych ścieżkach odpowiadają konstruktom zawierającym pojedynczą wstawkę.

Tak zoptymalizowaną procedurę zastosowano do przygotowania wszystkich pozostałych konstruków. Łącznie przygotowano 17 konstruków z wstawkami z PTC i 17 konstruków z wstawkami kontrolnymi z sekwencją typu dzikiego. Ze względu na potencjalnie dużą liczbę możliwych struktur drugorzędowych jak i oddziaływań z innymi oligonukleotydami (hetero- i homodupleksy), zrezygnowano z testowania wstawki DNAH5_55.

W celu potwierdzenia poprawności miejsca ligacji i poprawności wklonowanej sekwencji oraz wykrycia ewentualnych mutacji, wstawki i otaczające ją fragmenty plazmidu sekwencjonowano metodą Sangera w obu kierunkach (3' i 5') (Ryc. 23; wyniki dla wszystkich testowanych wstawek przedstawiono na rycinie uzupełniającej 2. w rozdziale 9 (MATERIAŁY DODATKOWE).

Konstrukty zawierające prawidłowe sekwencje wstawek namnażano w bakteriiach *E.coli* DH5α i oczyszczano, w celu wykorzystania do badań *in vitro* i *ex vivo*.

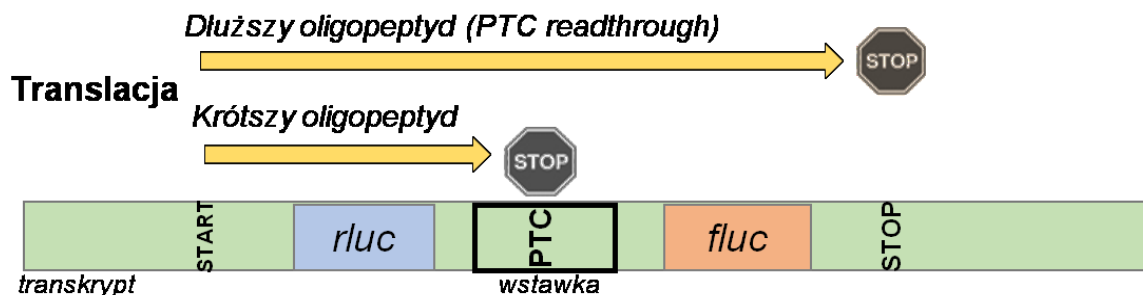


Rycina 23. Przykładowy chromatogram dla konstruktów zawierających wstawkę DNAH5_32.

5.3. Analiza efektywności procesu PTC *readthrough* stymulowanego AAGs w systemie transkrypcji/ translacji (TnT) *in vitro*

5.3.1. Wybór stężeń AAGs do eksperymentów TnT *in vitro*.

Przygotowane konstrukty (plazmid pDluc zawierające wstawki z różnymi PTC) testowano w systemie translacji/transkrypcji *in vitro* (TnT® Coupled Transcription/ Translation System, Promega), wykorzystującym naturalny ssaczy aparat translacyjny (retikulocyty królicze). Dzięki zastosowaniu znakowanej radioaktywnie metioniny, możliwe było porównanie ilości i długości oligopeptydów powstałych w reakcji w obecności/nieobecności AAGs, umożliwiając ocenę wpływu tych związków na proces PTC *readthrough*. Transkrypcja i translacja danego konstruktu (plazmidu pDluc zawierającego wstawkę z PTC) może prowadzić do powstania dwóch oligopeptydów o różnej długości (Ryc. 24). W przypadku przedwczesnej terminacji translacji w miejscu PTC powstaje produkt krótszy, natomiast translacyjny odczyt PTC we wstawce powoduje powstanie produktu dłuższego.

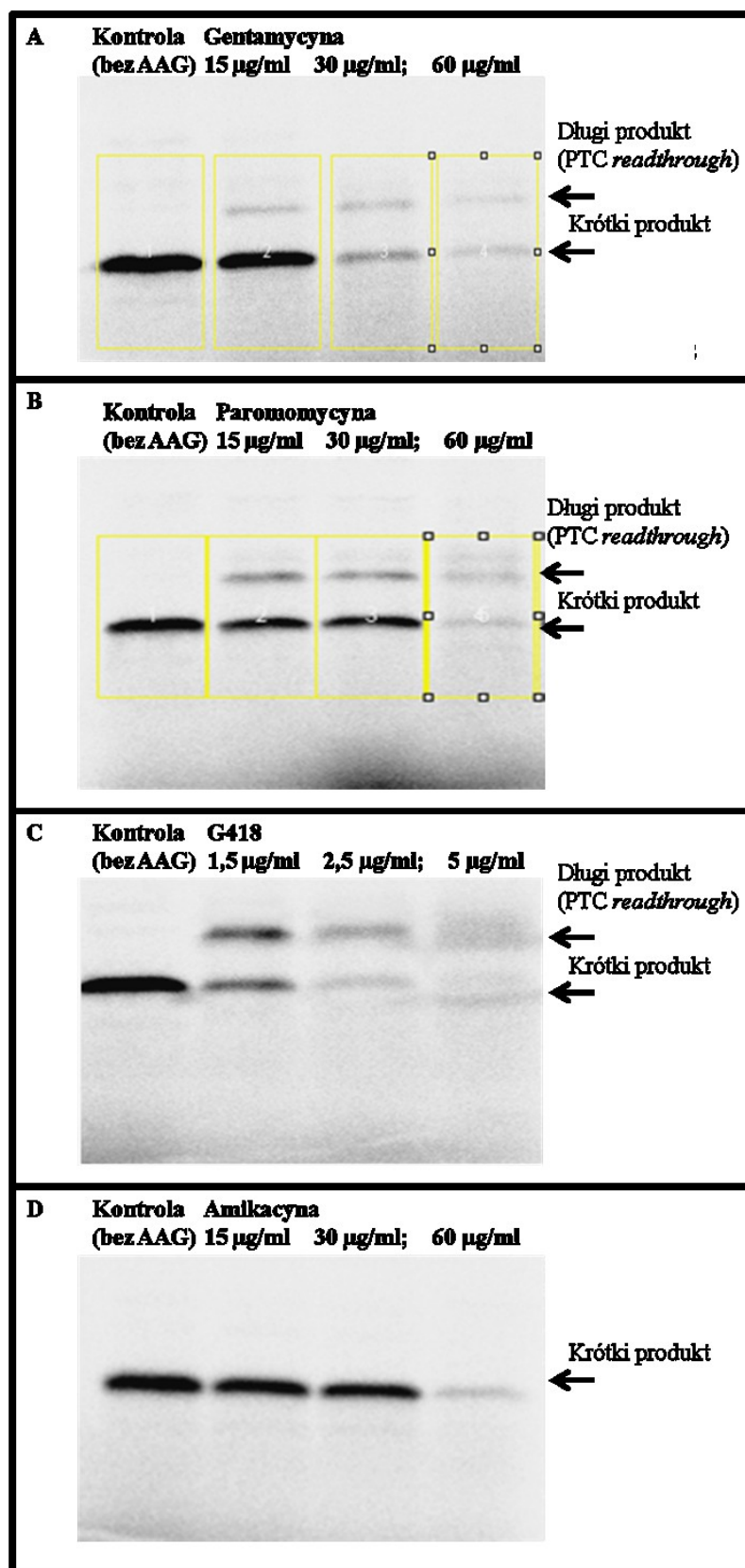


Rycina 24. Powstawanie produktów białkowych (oligopeptydów) na skutek transkrypcji i translacji plazmidu pDluc.

W badaniach przetestowano cztery AAGs: gentamycynę, amikacynę, paromomycynę i G418. Każdy AAG był badany w szerokim zakresie stężeń; wybór stężeń został dokonany na podstawie danych literaturowych^{34,105,134}. Stężenia używane w eksperymentach wstępnych wynosiły odpowiednio: dla gentamycyny, amikacyny, paromomycyny: 60 µg/ml, 30 µg/ml i 15 µg/ml; dla G418: 5 µg/ml, 2,5 µg/ml i 1,25 µg/ml.

Wstępne wyniki (Ryc. 25) wykazały, że AAGs wpływają znacząco na wydajność procesu translacji – wraz ze wzrostem stężeń, sumaryczna ilość obydwu produktów białkowych wyraźnie spadała. Największy negatywny efekt AAGs obserwowano dla G418, gdzie dwa najwyższe testowane stężenia (odpowiednio 2,5 i 5 µg/ml) powodowały spadek translacji obydwu oligopeptydów o więcej niż 80% w stosunku do reakcji bez G418. Z kolei amikacyna i paromomycyna charakteryzowały się najmniejszym wpływem na wydajność translacji – jedynie najwyższe stosowane stężenie 60 µg/ml doprowadziło do wyraźnego spadku translacji (o około 80% ilości produktu wyjściowego).

Na podstawie powyższych obserwacji ustalono arbitralnie, że maksymalne stężenia AAGs, używane dalej w eksperymentach *in vitro*, nie powinny powodować spadku translacji o więcej niż 30% w stosunku do reakcji bez AAGs. Dlatego też, w dalszych eksperymentach najwyższe stosowane stężenie gentamycyny i paromomycyny wynosiło 15 µg/ml a dla G418, 1,5 µg/ml. Amikacyna, mimo stosunkowo niewielkiego wpływu na efektywności translacji, została na tym etapie wykluczona z dalszych badań, gdyż przy żadnym z analizowanych stężeń nie zaobserwowano obecności dłuższego oligopeptydu, oznaczającego indukcję PTC *readthrough* przez ten AAG (Ryc. 25D).



Rycina 25. Wpływ AAGs na wydajność translacji (na przykładzie konstruktu DNAH5_32). Reakcje prowadzono dla szerokiego zakresu stężeń A) gentamycyny; B) paromomycyny; C) gentamycyny; D) amikacyny.

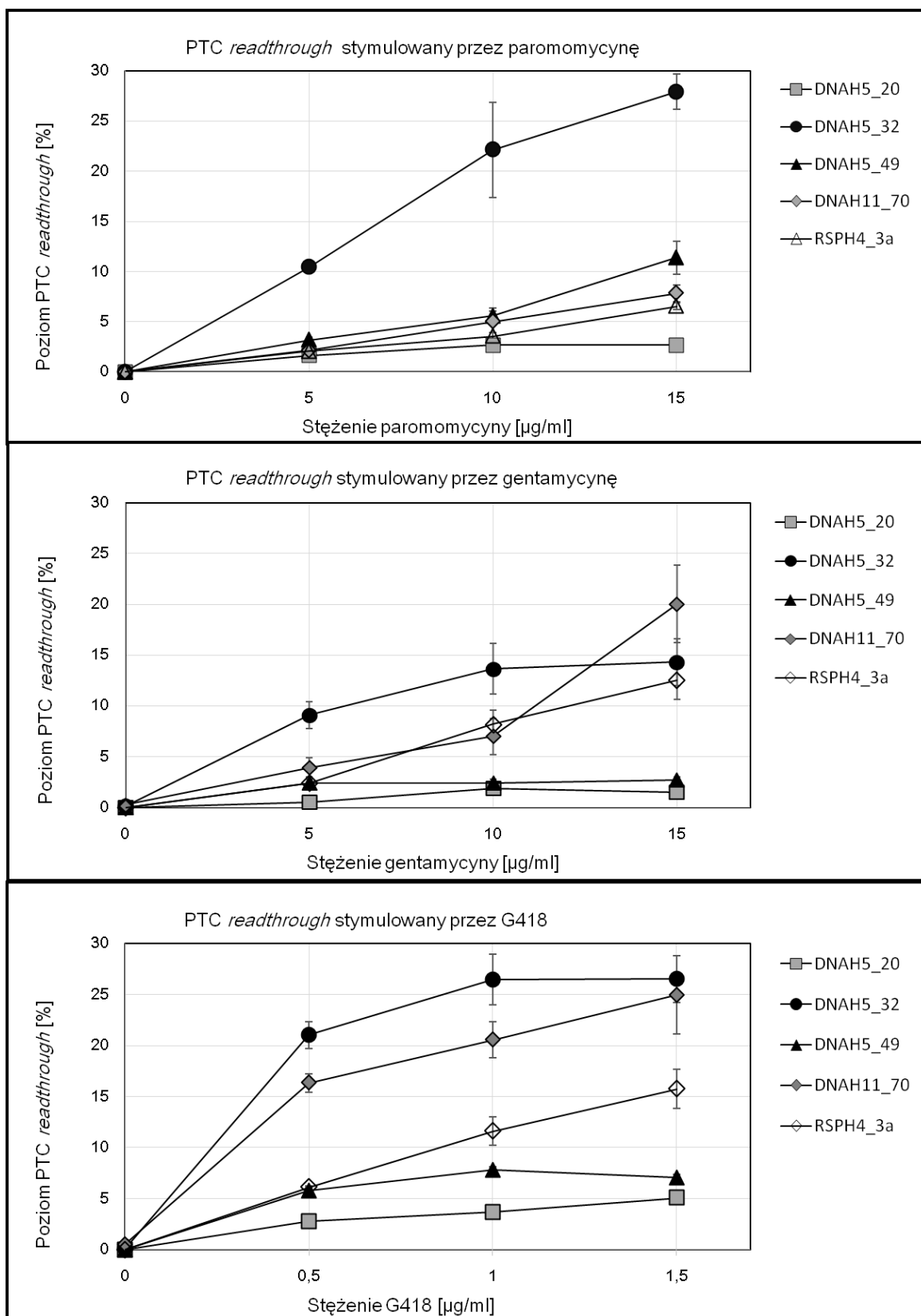
5.3.2. Pomiar wydajności procesu PTC *readthrough* stymulowanego AAGs w systemie TnT *in vitro*

W systemie transkrypcji/translacji *in vitro* (TnT), badano wpływ AAGs na wydajność procesu PTC *readthrough* dla szeregu stężeń gentamycyny, paromomycyny i G418 (paromomycyna i gentamycyna: 0; 5; 10; 15 $\mu\text{g/ml}$; G418: 0; 0,5; 1; 1,5 $\mu\text{g/ml}$). Dla każdego konstruktu i każdego stężenia AAGs obliczano stosunek ilości długiego produktu do sumy obydwu produktów reakcji i wyrażano tą wartość w procentach względem odpowiedniej wstawki kontrolnej, nie zawierającej PTC (uznawana za 100%).

Z 16 testowanych konstruktów, tylko pięć (DNAH5_20; DNAH5_32; DNAH5_49; DNAH11_70; RSPH4A_3a) konsekwentnie wykazywało mierzalny poziom PTC *readthrough*. Konstrukty te wykazywały podatność na stymulację supresji PTC w pełnym zakresie analizowanych stężeń AAGs (opisane w rozdziale 5.3.1), przy czym wydajność PTC *readthrough* wzrastała wraz ze stężeniem stosowanego AAGs.

Dla konstruktu SPAG1_16, niewielki poziom PTC *readthrough*, pod wpływem najwyższego stężenia G418 (1,5 μg), zaobserwowano w jednym powtórzeniu eksperymentu. Ponieważ kolejne powtórzenia eksperymentu nie potwierdziły tej obserwacji, uznano SPAG1_16 za mutację PTC nieodpowiadającą na traktowanie badanymi AAGs.

Podsumowanie wyników reakcji TnT przedstawiono w tabeli 2, a wykresy wydajność PTC *readthrough* dla wstawek odpowiadających na traktowanie AAGs zostały przedstawione na rycinie 26.



Rycina 26. Poziom PTC *readthrough* obserwowany w warunkach *in vitro* (system TnT) w zależności od stężenia AAGs. Wykres dla 5 mutacji, które odpowiadały na stymulację AAGs (wstawki DNAH5_20, DNAH5_32, DNAH5_49, DNAH11_70 oraz RSPH4A_3a).

Tabela 2. Wydajność PTC *readthrough* w eksperymentach prowadzonych w warunkach *in vitro* (system TnT) dla 5 najbardziej responsywnych konstruktów (przedstawiono wyniki jedynie dla najwyższych stężeń AAGs).

Konstrukt	Wydajność PTC <i>readthrough</i> (%)		
	Paromomycyna 15 µg/ml	Gentamycyna 15 µg/ml	G418 1,5 µg/ml
DNAH5_32	27,9 ± 1,7	14,3 ± 2,3	26,5 ± 7,4
DNAH5_49	11,4 ± 1,6	2,7 ± 0,3	7,1 ± 0,6
DNAH11_70	7,8 ± 0,8	20,0 ± 3,8	24,9 ± 3,8
RSPH4A_3a	6,6 ± 0,3	12,5 ± 1,9	15,7 ± 0,4
DNAH5_20	2,7 ± 0,6	1,5 ± 0,0	5,1 ± 0,2
SPAG1_16	n/a	n/a	n/a

Wydajność PTC *readthrough* w reakcji TnT różniła się w zależności od analizowanego PTC. Najwyższa odpowiedź na stymulację była obserwowana w konstrukcjach DNAH5_32, DNAH11_70 oraz RSPH4A_3a, gdzie obserwowana wydajność PTC *readthrough* w obecności najwyższych stężeń AAGs wahała się od 7,8±0,8 do 27,9±1,7% w porównaniu do nietraktowanej kontroli. Konstrukty DNAH5_49 lub DNAH5_20 były mniej podatne na stymulację AAGs: obserwowany poziom PTC *readthrough* był kilkukrotnie niższy niż dla trzech najlepiej odpowiadających konstruktów (od 2,7±0,6 do 11,4±1,6% przy najwyższych stosowanych stężeniach).

Obserwowana w reakcji TnT wydajność PTC *readthrough* różniła się również w zależności od użytego AAGs: najwyższe stężenia G418 i paromomycyny zawsze bardziej skutecznie indukowały PTC *readthrough* niż gentamycyna.

Najwyższa stymulacja supresji PTC była obserwowana dla kombinacji DNAH5_32 z 15 µg/ml paromomycyny lub 1,5 µg/ml G418 (PTC *readthrough* na poziomie odpowiednio 27,9±1,7% i 26,5±7,4%, w stosunku do nietraktowanej kontroli). Kolejna, najbardziej responsywna kombinacja konstrukt-AAGs to DNAH11_70

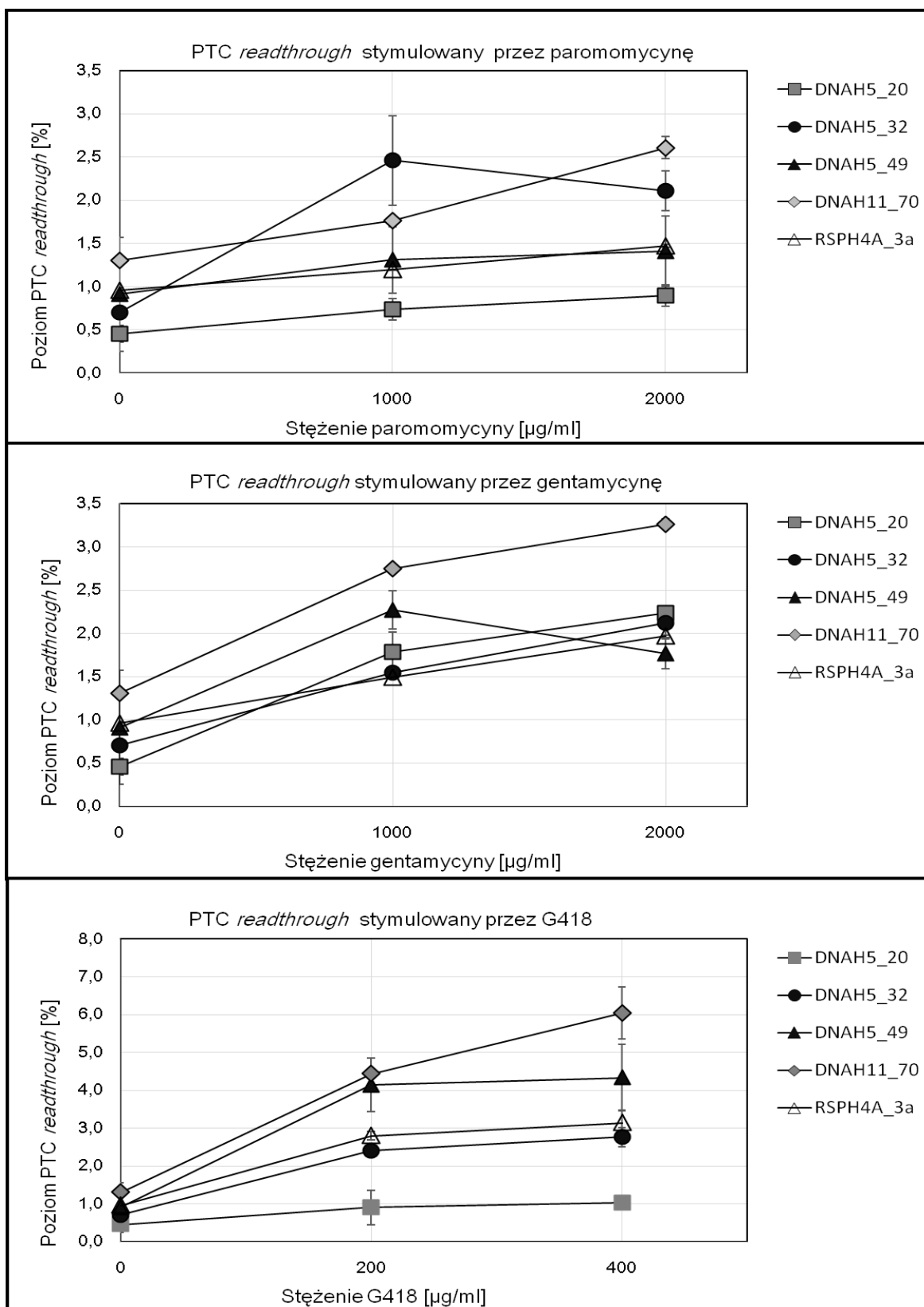
w obecności 1,5 µg/ml G418 lub 15 µg/ml gentamycyny (PTC *readthrough* odpowiednio na poziomie 24,9±3,9% lub 20,0±3,8% w stosunku do nietraktowanej kontroli).

5.4. Pomiar wydajności procesu PTC *readthrough* stymulowanego AAGs w systemie *ex vivo*

W celu określenia wydajności supresji PTC stymulowanej AAGs w żywych komórkach, przeprowadzono transfekcję komórek nabłonkowych HEK293 za pomocą pięciu konstruktów ze wstawkami z PTC, które najlepiej odpowiadały na stymulację AAGs w eksperymentach TnT *in vitro*: DNAH5_20, DNAH5_32, DNAH5_49, DNAH11_70, RSPH4A_3a. Jako przykład słabo responsywnej mutacji, użyto także wstawkę SPAG1_16. Komórki HEK293 były transfekowane wcześniej przygotowanymi konstruktami ze wstawkami z PTC lub odpowiednimi konstruktami kontrolnymi z sekwencją typu dzikiego. Tak przygotowane komórki traktowano różnymi dawkami AAGs: paromomycyna i gentamycyna: 1000 i 2000 µg/ml, G418: 200 i 400 µg/ml. Użyte dawki AAGs nie przekraczały dawek LD₅₀ znanych z literatury dla tego typu komórek^{23,31}.

Wydajność supresji PTC analizowano w lizatach komórek traktowanych AAGs, za pomocą pomiaru luminescencji białek reporterowych (fluc i rluc) eksprymowanych z plazmidów pDluc ze wstawkami. Poziom PTC *readthrough* był oceniany na podstawie stosunku sygnału lucyferazy fluc do lucyferazy rluc.

Podsumowanie wyników zostało pokazane w tabeli 3 oraz na rycinie 27. Podobnie jak w warunkach *in vitro*, najskuteczniejszą stymulację PTC *readthrough* uzyskano w obecności G418 (maksymalny poziom PTC *readthrough* osiągał 6,1±1,0%). W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w systemie TnT, w badaniach *ex vivo*, maksymalny PTC *readthrough* w obecności gentamycyny (3,2±0,1%) był jedynie niewiele wyższy niż maksymalny PTC *readthrough* w obecności paromomycyny (2,6±0,2%).



Rycina 27. Poziom PTC *readthrough* obserwowany w warunkach *ex vivo* (transfekowane linie komórek HEK293) w zależności od stężenia AAGs. Wykres dla 5 najbardziej responsywnych kontryktów w badaniach *in vitro* (DNAH5_20, DNAH5_32, DNAH5_49, DNAH11_70 oraz RSPH4A_3a). Jako kontrola negatywna użyta została mutacja SPAG1_16.

Tabela 3. Wydajność PTC *readthrough* w eksperymentach prowadzonych w warunkach *ex vivo* (transfekowane linie komórek HEK293) dla 5 najbardziej responsywnych konstruktów (tu przedstawiono wyniki jedynie dla najwyższych stężeń AAGs).

Wstawka	Wydajność PTC <i>readthrough</i> (%)		
	Paromomycyna 2000 µg/ml	Gentamycyna 2000 µg/ml	G418 400 µg/ml
DNAH5_32	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2,5 ± 0,5
DNAH5_49	1,9 ± 0,6	1,9 ± 0,3	4,4 ± 1,1
DNAH11_70	2,6 ± 0,2	3,2 ± 0,1	6,1 ± 1,0
RSPH4A_3a	1,5 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,2 ± 0,5
DNAH5_20	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,3	2,3 ± 0,1
SPAG1_16	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,3 ± 0,0

Najwyższe wartości PTC *readthrough* w transfekowanych liniach komórek HEK293 uzyskane w obecności paromomycyny, gentamycyny i G418 nie przekraczały, odpowiednio: 2,6%, 3,3% i 6,1% (porównując do wartości dla komórek transfekowanych konstruktami kontrolnymi z sekwencją typu dzikiego). Najbardziej podatną na stymulację parą PTC-AAG były konstrukty z DNAH11_70 oraz DNAH5_49 traktowane 400 µg/ml G418 - PTC *readthrough* wynosił dla nich odpowiednio: 6,1±1,0% i 4,4±1,1%.

5.5. Porównanie podatności na supresję sygnału terminacji analizowanych PTC w obu systemach eksperymentalnych

Porównanie wyników otrzymanych w eksperymentach *in vitro* oraz *ex vivo* pozwoliło na ustalenie rankingu podatności testowanych PTC na supresję w obecności AAGs (Tab. 4 i Tab. 5). Niezależnie od stosowanego AAG, najbardziej podatne na PTC *readthrough* były konstrukty DNAH11_70, DNAH5_32 i DNAH_49. Z pięciu najbardziej responsywnych PTC analizowanych w badaniach, konstrukt DNAH5_20 wykazywał konsekwentnie najniższą podatność na supresję (bez względu na zastosowany AAG).

Tabela 4. Podatności badanych konstruktów na stymulowany PTC *readthrough*

Tabela 5. Porównanie poziomu stymulowanego PTC *readthrough* względem sekwencji kodonu STOP oraz nukleotydu w pozycji +4. Legenda: + – potwierdzono występowanie PTC *readthrough*; ilość + oznacza wydajność stymulacji PTC *readthrough*; – brak PTC *readthrough*; +/- – wyniki niejednoznaczne; n/a – nie analizowano ze względu na zbyt niską efektywność PTC *readthrough* w testach *in vitro*.

PTC	Tożsamość PTC	Nukleotyd w pozycji +4	PTC <i>readthrough</i> (<i>in vitro</i>)	PTC <i>readthrough</i> (<i>ex vivo</i>)
DNAH5_32	UGA	C	+++	+++
DNAH5_49	UGA	C	+	+
RSPH4A_3a	UGA	G	++	++
DNAH5_34b	UGA	G	-	n/a
RSPH4A_3b	UGA	A	-	n/a
DNAH11_70	UGA	T	+++	+++
DNAH5_62	UGA	T	-	n/a
SPAG1_16	UAG	T	+-	-
RSPH4A_1	UAG	T	-	n/a
DNAH5_37	UAG	T	-	n/a
CCDC40_20b	UAG	T	-	n/a
DNAH5_20	UAG	C	+	+
CCDC40_15	UAG	A	-	n/a
CCDC40_20a	UAA	C	-	n/a
DNAH5_47	UAA	G	-	n/a
DNAH5_34a	UAA	G	-	n/a

5.6. Wpływ AAGs na komórki pierwotne nabłonka oddechowego

Badanie wpływu AAGs (gentamycyny, amikacyny i paromomycyny w stężeniu 1000 µg/ml i 2000 µg/ml oraz G418, 200 µg/ml i 400 µg/ml) na komórki pierwotne nabłonka oddechowego prowadzono przy użyciu sekwencyjnej metody hodowli komórek. Traktowanie za pomocą AAGs było przeprowadzane pod koniec hodowli adherentnej na żelu kolagenowym, kiedy rozpoczynają się pierwsze, bardzo wstępne, etapy różnicowania komórek nabłonka. Wpływ AAGs na żywotność komórek i zdolność do tworzenia rząsek był analizowany w trakcie następującego po hodowli adherentnej etapu, hodowli zawiesinowej, podczas której wielokomórkowe sferoidy w zawiesinie wykształcają na swojej powierzchni ruchome rząski (Ryc. 17A-B).

Efekt cytotoksyczny AAGs na komórki pierwotne nabłonka oddechowego manifestował się przede wszystkim przez wzrost liczby martwych komórek pływających w pożywce. Bezpośrednia analiza ilościowa tego efektu nie była możliwa, ponieważ wraz z każdą zmianą pożywki w hodowli zawiesinowej martwe komórki były usuwane. Dlatego też, pomiar cytotoksyczności został przeprowadzony pośrednio, przez analizę liczby i wielkości sferoidów w 21 dniu hodowli SUSP, a także przez obserwację wpływu AAGs na stopień orzęsienia sferoidów.

5.6.1. Ocena wielkości sferoidów

Ocenę wielkości sferoidów w butelce hodowlanej przeprowadzano w mikroskopie świetlnym. Przyjęto arbitralnie, że do analizy cytotoksycznego wpływu AAGs, liczba obserwowanych sferoidów w butelce powinna wynosić minimum 15. Dla większości testowanych AAGs, liczba zaobserwowanych w hodowli sferoidów znacznie przekraczała wartość minimalną i zbliżona była do kontroli. Jedynie w przypadku wyższego stężenia G418 (400 µg/ml), zaobserwowano mniej niż 15 sferoidów, stąd to stężenie G418 nie zostało uwzględnione w analizie.

Dla potrzeb oceny wpływu AAG na sferoidy nabłonka oddechowego, przyjęto następujące definicje wielkości sferoidów:

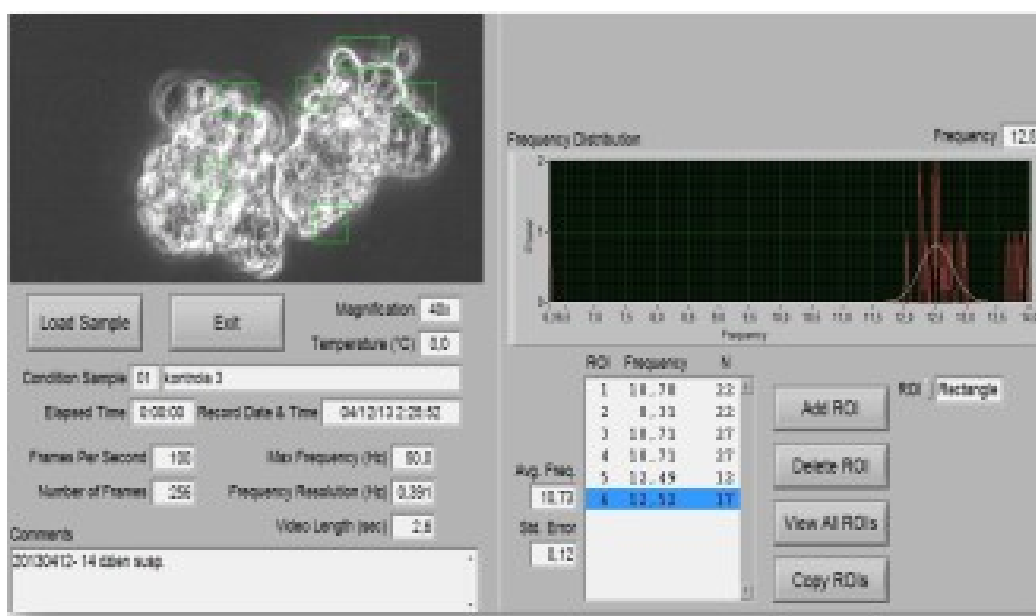
- a) sferoidy małe: zajmujące mniej niż połowę pola widzenia przy powiększeniu 40x.
- b) sferoidy średnie: zajmujące między 50 a 100% pola widzenia mikroskopu przy powiększeniu 40x.
- c) sferoidy duże: przekraczające pole widzenia mikroskopu przy powiększeniu 40x.

Analiza wyników wykazała, że pod wpływem AAGs zmieniała się przede wszystkim ilość małych sferoidów w butelkach hodowlanych. W hodowlach kontrolnych (nietraktowanych AAGs), średnio około 45% wszystkich sferoidów stanowiły sferoidy małe. Podobną ilość małych sferoidów (między 37% a 60%) zaobserwowano w hodowlach traktowanych obydwoma stężeniami paromomycyny (1000 i 2000 µg/ml) oraz gentamycyną i amikacyną w stężeniu 1000 µg/ml. W hodowlach traktowanych wyższymi stężeniami AAGs (gentamycyną lub amikacyną w stężeniu 2000 µg/ml oraz G418 w stężeniu 200 µg/ml), zaobserwowano znaczny wzrost proporcji małych sferoidów w polu widzenia (średnia wartość około 68% wszystkich sferoidów lub więcej). Wzrost ilości małych sferoidów był związany z częstszą fragmentacją sferoidów większych, na skutek „wypadania” ze sferoidów martwych komórek nabłonka. Martwe komórki nabłonka były później obserwowane w pożywce i usuwane podczas zmiany medium. Zmniejszanie się rozmiarów sferoidów świadczy więc pośrednio o cytotoksyczności badanych związków wobec komórek nabłonka.

5.6.2. Ocena stopnia orzęsienia sferoidów

Wpływ badanych związków na rozwój rzęsek nabłonka oddechowego (ciliogenezę) analizowano poprzez ocenę stopnia orzęsienia sferoidów przy użyciu mikroskopii szybkoklatkowej (ang. *high speed videomicroscopy*; HSVM, powiększenie 40x) oraz barwień immunofluorescencyjnych.

Analiza z użyciem wideomikroskopii szybkoklatkowej



Rycina 28. Analiza wideomikroskopowa orzęsionego sferoidu w programie SAV4.

Wyniki analiz wideomikroskopowych potwierdziły dane literaturowe^{178,179}, że wykształcanie rzęsek przez komórki budujące sferoidy w hodowli sekwencyjnej następuje losowo i w sposób niesynchronizowany. Dlatego też, na niektórych etapach różnicowania można było zauważyć pod mikroskopem sferoidy o różnym stopniu wykształcenia rzęsek.

Na potrzeby analizy, etapy różnicowania rzęsek w sferoidach podzielono na następujące klasy:

- I) sferoidy nagie (bez widocznych rzęsek) i nieruchome,
- II) sferoidy bez widocznych rzęsek, wykazujące oznaki ruchu (spowodowane ruchem bardzo krótkich rzęsek, niewidocznych w mikroskopie świetlnym),
- III) sferoidy ruchome z widocznymi, ruchomymi rzęskami.

Wpływ AAGs na ciliogenezę badano w 16 dniu hodowli zawieszinowej. W tym dniu, w hodowli nietraktowanej, około 85% sferoidów posiadało cechy charakterystyczne dla klasy II lub III (sferoidy ruchome, z widocznymi lub niewidocznymi rzęskami). Hodowle traktowane AAGs (gentamycyną, paromomycyną, G418 i amikacyną; stężenia jak wyżej) były bardzo podobne do hodowli nietraktowanej, reprezentując mieszankę sferoidów klasy II i III. Jedynie w hodowli traktowanej najwyższym stężeniem gentamycyny (2000 µg/ml), obserwowano niewielki (>10%) spadek w proporcji sferoidów klasy II lub III, na rzecz sferoidów klasy I, wskazujący na umiarkowanie negatywny wpływ tej dawki gentamycyny na ciliogenezę.

W przeciwieństwie do innych AAGs, G418 wykazywało bardzo wyraźny negatywny wpływ na ciliogenezę. W hodowli traktowanej 200 µg/ml G418, ponad 85% sferoidów reprezentowało klasę I (nie były ani pokryte rzęskami ani się nie ruszały). W hodowli traktowanej G418 w stężeniu dwukrotnie wyższym (400 µg/ml), 90% komórek było martwych, co wskazuje, że niższe dawki G418 mają negatywny wpływ na ciliogenezę, natomiast wyższe dawki G418 mają negatywny wpływ na żywotność komórek.

Analiza immunofluorescencyjna

Po przeprowadzeniu analiz HSVM z hodowli komórkowych, obecność rzęsek w hodowlach potwierdzano dodatkowo za pomocą barwień immunofluorescencyjnych. W tym celu, rzęski zostały wyznakowane przeciwciałem przeciwko acetylowanej

α -tubulinie, białku markerowym rzęsek, a jądra komórkowe były barwione markerem DNA, DAPI.

Za wyjątkiem najwyższego stężenia G418, barwienia immunofluorescencyjne potwierdziły obecność rzęsek na wszystkich hodowlach, zarówno kontrolnych, jak i tych traktowanych testowanymi AAGs. W przypadku G418 w stężeniu 400 μ g/ml, ze względu na brak wystarczającej liczby sferoidów na szkiełkach (działanie cytotoksyczne G418), potwierdzenie obecności rzęsek było niemożliwe.

5.7. Podsumowanie

Badania przedstawione w pierwszej części pracy wykazały, że dla niektórych mutacji, w układzie *ex vivo* (w transfekowanych liniach komórkowych), możliwe jest osiągnięcie poziomu PTC *readthrough* maksymalnie na poziomie 6% ekspresji transkryptu typu dzikiego. Ten stosunkowo niewielki poziom PTC *readthrough* jest prawdopodobnie związany z ograniczoną przenikalnością AAGs przez błonę komórkową. Ponadto, dla części testowanych mutacji (m.in. konstrukt SPAG1_16), nie zaobserwowano znaczącego poziomu PTC *readthrough* przy użyciu badanych AAGs. Użycie wyższych stężeń AAGs było niemożliwe ze względu na ich cytotoksyczność. Najbardziej efektywny związek, G418, był również najbardziej cytotoksyczny (więcej w rozdziale 6. DYSKUSJA i w publikacji Bukowy-Bieryłło i wsp.; *RNA Biology*, 2016⁹⁶).

Dotychczasowe wyniki badań nad możliwością zastosowania AAGs jako związków chemicznych stymulujących translacyjny odczyt PTC w PCD wskazały zatem na potrzebę zastosowania związków o mniejszej toksyczności, wyższej zdolności przenikania przez błonę komórkową i/lub większym potencjale stymulacji procesu PTC *readthrough*. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę grantu NCN Etiuda, otrzymanego w 2017 roku, który umożliwił przeprowadzenie badań wstępnych dotyczących zastosowania związków nie-aminoglikozydowych (ang. *non-aminoglycosides*; NAGs) do stymulacji procesu PTC *readthrough*. W czasie pobytu zagranicznego na Uniwersytecie w Southampton w Anglii, przeprowadzone zostały wstępne badania cyto- i ciliotoksyczności pięciu związków NAGs oraz ich wpływu na integralność nabłonka oddechowego (wyniki przedstawione w następnym rozdziale 5.8. Wyniki dodatkowe). Badania te będą kontynuowane w ramach przyznanego również w roku 2017 grantu NCN Preludium (kierownik: mgr Dąbrowski).

5.8. Wyniki dodatkowe

5.8.1. Przesiewowe badanie toksyczności NAGs

Do badań wybrano pięć związków o znanych właściwościach stymulujących PTC *readthrough*: ataluren (ATAL), amlexanox (AMLX) i escynę (ESC), oraz makrolidy: tylozynę (TYL) i azytromycynę (AZTM).

W pierwszym etapie, z użyciem linii komórkowej nabłonka oddechowego 16HBE¹⁸⁰ i błękitu trypanu, przeprowadzono przesiewowe badanie toksyczności szerokiego zakresu stężeń badanych związków na nabłonek oddechowy. Ze względu na znany profil toksyczności (przeprowadzone badania kliniczne), w tym etapie badań nie testowano atalurenu (oznaczany na rycinach skrótem ATAL).

Komórki 16HBE były traktowane przez 48 godzin jednym z 4 badanych związków (azytromycyna, amlexanox, escyna, tylozyna), według szerokiego zakresu stężeń opisanych w literaturze^{151,162,163,152,155}. Stężenia NAGs powodujące śmierć więcej niż 50% komórek względem komórek nietraktowanych odrzucano z dalszych etapów badań. Do dalszych testów zakwalifikowano następujące stężenia związków- AMLX: 125, 25, 10 μ M; AZTM: 10, 5, 1 μ g/ml; ESC: 10, 5, 1 μ M oraz TYL: 100, 50, 10 μ g/ml.

5.8.2. Analiza cytotoksyczności AAGs i NAGs za pomocą zestawu

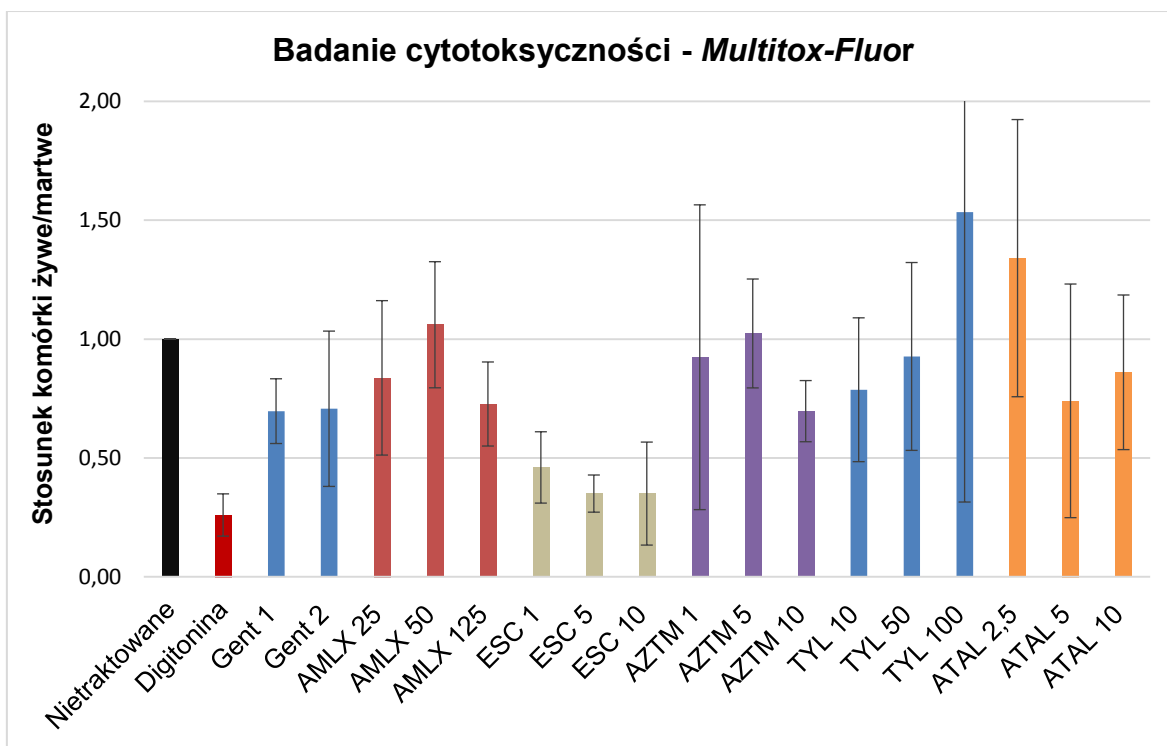
MultiTox-Fluor

W drugim etapie badań, toksyczność NAGs na nabłonek oddechowy analizowano w komórkach pierwotnych nabłonka oddechowego (wymazy nabłonka nosa pobrane od zdrowych dawców) zróżnicowanych w hodowli *in vitro* metodą ALI. Około 28. dnia hodowli ALI (moment pełnego zróżnicowania nabłonka w hodowli), komórki były traktowane przez 48 godzin wybranymi stężeniami badanych NAGs.

Działanie cytotoksyczne związków oceniano za pomocą fluorescencyjnego testu *MultiTox-Fluor* (Promega), który umożliwia jednoczesny pomiar ilości komórek żywych (proteaza komórek żywych) i ilości komórek martwych (proteaza komórek martwych).

W badaniach tych (Ryc. 29) najniższy negatywny wpływ na żywotność komórek zaobserwowano dla TYL i ATAL): żadne z testowanych stężeń tych związków nie powodowało znaczącego spadku żywotności po 48 godzinach inkubacji. Wyższe stężenia AMLX (125 μ M) oraz AZTM (10 μ M), a także obydwa testowane stężenia GENT (1 i 2 mg/ml), powodowały w tym czasie do 30% spadku żywotności

komórek. Najwyższą śmiertelność zaobserwowano dla ESC – wszystkie badane stężenia tego związku (1; 5 i 10 μ M) po 48 godzinach inkubacji powodowały spadek żywotności komórek o ponad 50%, co przeczy doniesieniom literaturowym¹⁵⁵.



Rycina 29. Wyniki analizy cytotoksyczności z wykorzystaniem zestawu *MultiTox-Fluor*. Eksperyment przeprowadzono z użyciem komórek nabłonka oddechowego hodowanych metodą ALI. Wszystkie pomiary powtórzono trzykrotnie. Gent – gentamycyna, AMLX – amlexanox, ESC – escyna, AZTM – azytromycyna, TYL – tylozyna, ATAL – ataluren.

5.8.3. Wpływ związków na integralność i przepuszczalność warstwy komórek nabłonka w hodowli ALI.

Oprócz badań żywotności komórek nabłonka, dla najwyższych stężeń sześciu badanych związków (Gent, AZTM, AMLX, TYL, ATAL, ESC) oraz ich rozpuszczalników (metanol, DMSO, woda), przeprowadzono pomiar oporności elektrycznej warstwy komórek nabłonka metodą TEER. Metoda ta jest szeroko stosowana w badaniach wpływu leków i związków chemicznych na funkcjonowanie złączy ścisłych nabłonka. Poprzez ocenę oporności elektrycznej warstwy komórek nabłonka, metoda TEER umożliwia ocenę integralności oraz przepuszczalności nabłonka po traktowaniu związkami chemicznymi, a także ocenę tego procesu w czasie.

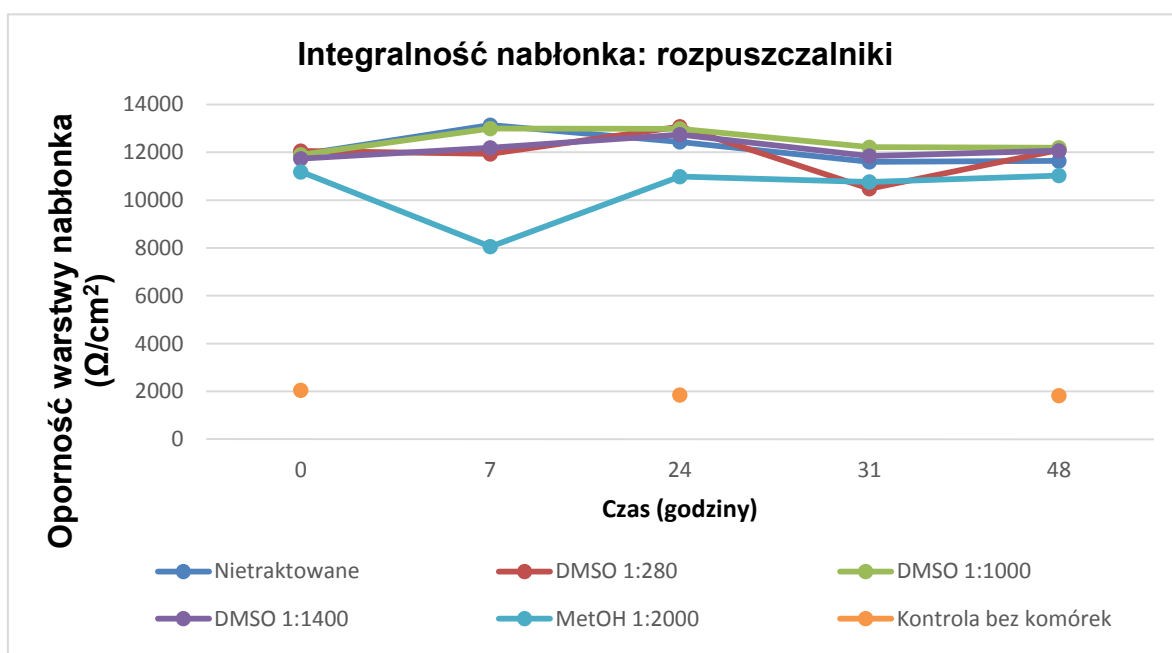
Ze względu na użycie różnych cieczy do rozpuszczenia badanych związków NAGs, analizę TEER rozpoczęto od pomiaru wpływu różnych stężeń rozpuszczalników na nabłonek oddechowy (w DMSO rozpuszczono: ATAL, AZTM i AMLX; w wodzie: TYL i gentamycynę; w 0,05% metanolu ESC) (Ryc. 30).

Jedynie metanol (MetOH) po 7 godzinach inkubacji wykazał niewielki spadek (o około 20%) oporności warstwy komórek nabłonka; wartość ta przy kolejnym pomiarze (po 18 godzinach) wróciła do poziomu nietraktowanej kontroli, świadcząc o tylko tymczasowym, słabym wpływie metanolu na oporność warstwy.

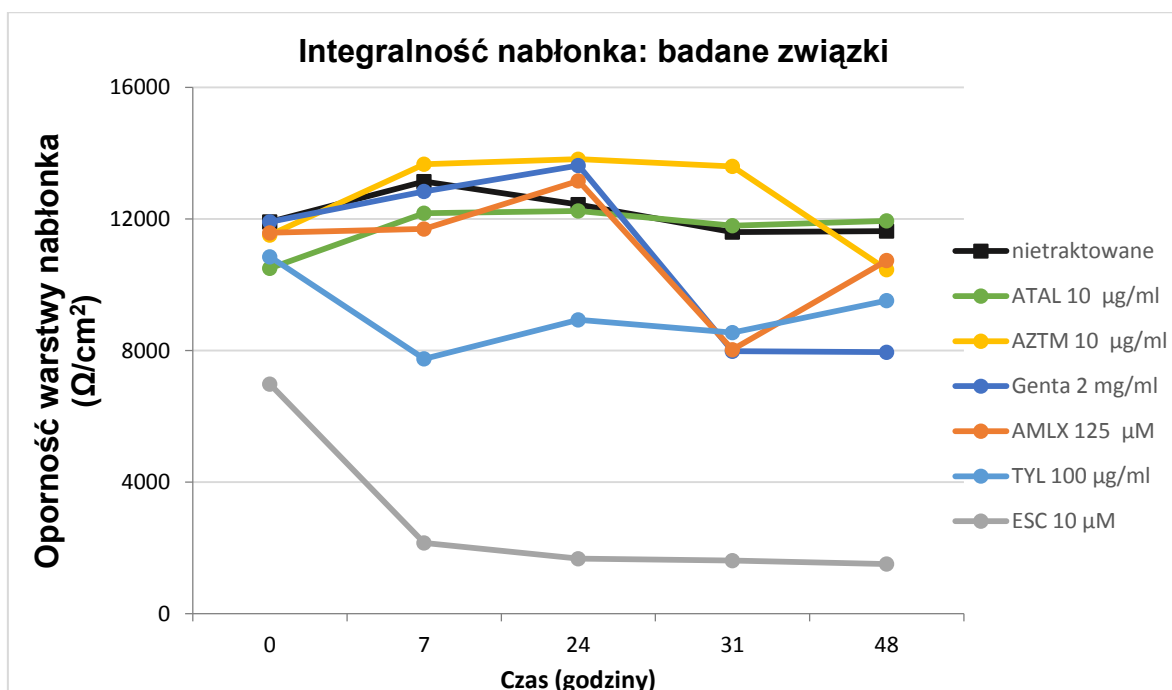
Badanie TEER (Ryc. 31) z użyciem badanych związków ponownie wykazało niewielki wpływ ATAL (10 µg/ml) oraz AZTM (10 µg/ml) na nabłonek: po 48 godzinach traktowania tymi związkami, wartości TEER dla komórek spadły jedynie o 15% względem wartości wyjściowej. Inkubacja komórek z TYL w stężeniu 100 µg/ml powodowała nagły spadek oporności warstwy o ok. 30% w ciągu pierwszych 7 godzin inkubacji. Spadek ten utrzymywał się następnie przez cały pozostały czas badania, co świadczy o umiarkowanej toksyczności tego związku dla komórek nabłonka zróżnicowanych w hodowli ALI. Dla Gent (2 mg/ml) i AMLX (125 µM) zmiany w oporności warstwy zależały od czasu inkubacji komórek z badanym związkiem. Po początkowym wzroście oporności warstwy o ok. 15%, po 31 godzinach inkubacji oporność warstwy gwałtownie spadała do ok. 65% wartości wyjściowej.

Dla ESC, badanie TEER (Ryc. 31) ponownie wykazało wysoką toksyczność tego związku dla komórek nabłonka oddechowego. Już po 7 godzinach traktowania, ESC w dawce 10 µM powodowała spadek oporności warstwy komórek nabłonka aż o 70%. Po 48 godzinach inkubacji, oporność warstwy komórek obniżyła się do 20% wartości wyjściowej, co wskazuje na wysoką toksyczność tego związku dla komórek nabłonka.

Ze względu na ograniczony czas stażu i czas wymagany do zróżnicowania nabłonka w hodowli ALI (minimum 45 dni), niemożliwe było przeanalizowanie pełnego zakresu stężeń badanych wszystkich związków. Dlatego też, uzyskane wyniki pomiaru TEER należy traktować jako wyniki wstępne i powtórzyć pomiary z pełnym zakresem stężeń wszystkich badanych związków.



Rycina 30. Analiza wpływu użytych rozpuszczalników na integralność nabłonka oddechowego. Pomiar TEER na komórkach pierwotnych nabłonka oddechowego zróżnicowanych metodą ALI.



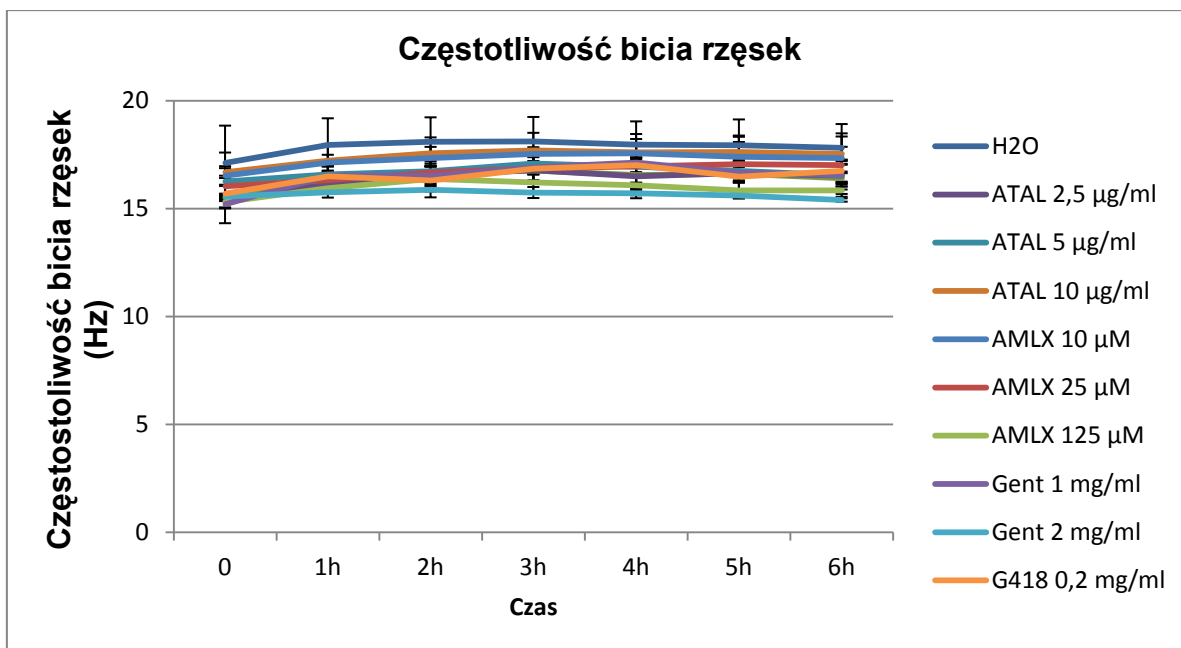
Rycina 31. Analiza wpływu NAGs na integralność nabłonka oddechowego. Pomiar TEER na komórkach pierwotnych nabłonka oddechowego zróżnicowanych metodą ALI.

5.8.4. Wpływ AAGs i NAGs na ruchliwość rzęsek (mikroskopia *Time-lapse*).

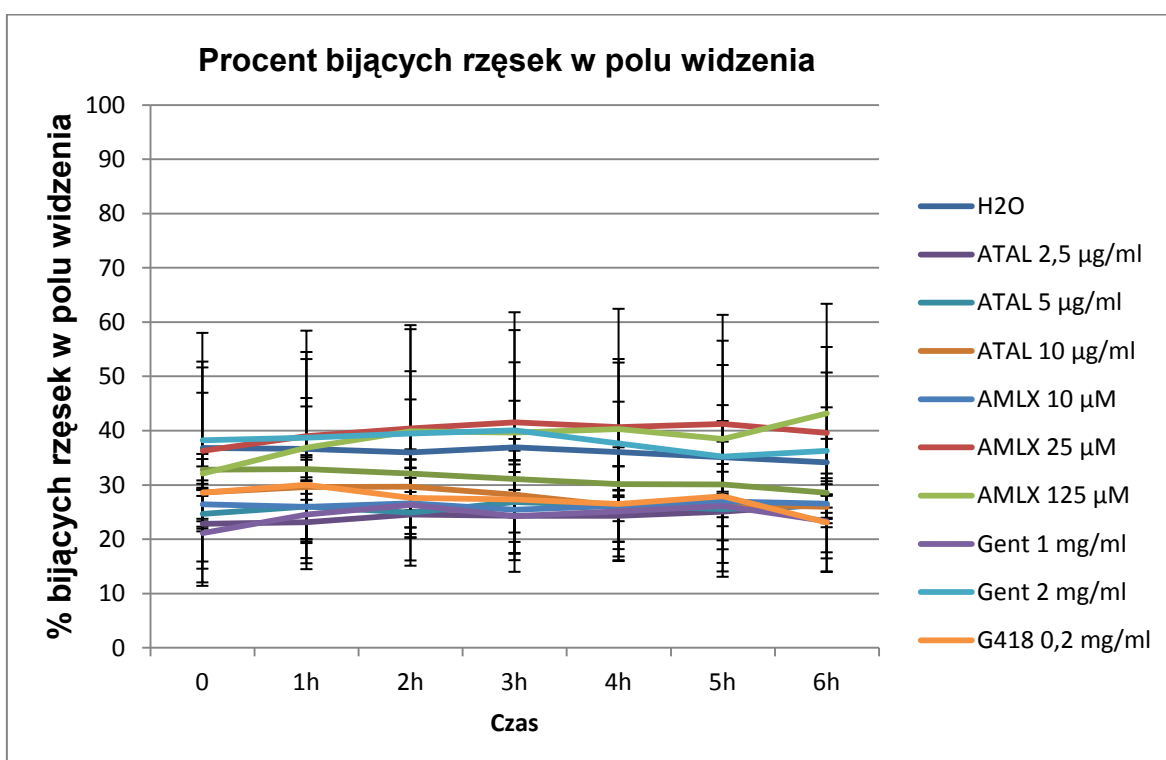
Dzięki pobytowi w ośrodku w Southampton, możliwe było także przeprowadzenie badania długofalowego wpływu związków stymulujących PTC *readthrough* na funkcjonowanie rzęsek ruchomych (monitorowanie częstotliwości bicia rzęsek i procentu poruszających się rzęsek w polu widzenia kamery w trakcie inkubacji ze związkami). Badania te zostały wykonane przy użyciu specjalistycznego sprzętu i oprogramowania (zautomatyzowany mikroskop Olympus z kamerą szybkoklatkową oraz komorą inkubacyjną), dostępnych tylko w tym ośrodku zagranicznym.

W ramach badań, przetestowano 4 związki: AMLX (10 μ M, 25 μ M i 125 μ M); ATAL (2,5 μ g/ml, 5 μ g/ml i 10 μ g/ml), Gent (1 mg/ml i 2 mg/ml) oraz G418 (0,2 mg/ml, Ryc. 32 i Ryc. 33). Wstępne wyniki wykazały, że po 6 godzinach inkubacji, zarówno częstotliwość bicia rzęsek, jak i procent poruszających się rzęsek w polu widzenia kamery nie uległy istotnej zmianie w stosunku do wartości wyjściowej (maksymalna zmiana ok. 8%). Powyższe dane sugerują, że przetestowane związki nie wpływają na ruch rzęsek.

Ograniczenia w dostępie do sprzętu i materiału pozwoliły na przeprowadzenie jedynie badania pilotażowego (1 eksperyment, 4 związki i ich rozpuszczalniki, 6 godzin inkubacji). W najbliższym czasie planowane jest powtórzenie tego badania w trakcie dłuższej inkubacji ze związkami (48 godzin) oraz ze zwiększoną ilością związków i ich stężeń (dodatkowo: ESC, TYL, AZTM).



Rycina 32. Wpływ związków stymulujących PTC *readthrough* lub ich rozpuszczalników na częstotliwość bicia rzęsek nabłonka oddechowego. Mikroskopia *Time-lapse*, 6 godzin monitorowania. Normalny zakres częstotliwości bicia rzęsek w temperaturze 37°C wynosi 10-20 Hz.



Rycina 33. Wpływ związków stymulujących PTC *readthrough* lub ich rozpuszczalników na procent bijących rzęsek w polu widzenia. Mikroskopia *Time-lapse*, 6 godzin monitorowania. Normalny zakres wartości: od 20 do 40%.

6. DYSKUSJA

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań dotyczących zastosowania stymulowanego translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP (PTC *readthrough*) w mutacjach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek (PCD).

Przygotowano konstrukty oparte o wektor pDluc, zawierające fragmenty sekwencji z PTC wraz z ich bliskim otoczeniem nukleotydowym. Podatność mutacji na stymulowany antybiotykami aminoglikozydowymi (AAGs) translacyjny odczyt (supresję) PTC testowano w dwóch systemach eksperymentalnych: *in vitro* (system transkrypcji/translacji TnT) i *ex vivo* (w transfekowanych liniach komórkowych). Ponadto, przebadano cytotoksyczność najbardziej efektywnych stężeń AAGs w hodowlach komórek nabłonka oddechowego a także ich wpływ na kondycję komórek i wytwarzanie rzęsek ruchomych.

6.1. Wybór jednostki chorobowej

W Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej od lat prowadzone są badania podłoża genetycznego PCD w polskiej populacji chorych. W przypadku tej choroby, nie istnieje obecnie żadna metoda leczenia przyczynowego, możliwe jest jedynie łagodzenie objawów. Nawracające infekcje dróg oddechowych są najpoważniejszym objawem PCD – nawet w przypadku wczesnej diagnozy, pacjenci cierpią na stopniowe pogorszenie funkcji płuc, wymagają intensywnej opieki lekarskiej i fizjoterapeutycznej, a w wielu przypadkach zabiegów operacyjnych, takich jak usunięcie niefunkcjonalnych płatów płuc (lobektomia), aż do transplantacji płuc włącznie. Z czasem zdolność pacjentów do pracy oraz jakość ich życia drastycznie spadają, przez co PCD staje się istotnym problemem, zarówno medycznym, jak i społecznym.

Z badań nad podłożem genetycznym PCD (¹⁶⁵oraz własne dane Zespołu) wynika, że 1/3 mutacji zaangażowanych w patogenezę tej choroby wprowadza PTC w sekwencji genów. W związku z powyższym, dostępny jest szeroki wybór sekwencji do badania stymulacji procesu PTC *readthrough*. Co prawda, wiele z mutacji w genach związanych z patogenezą PCD to mutacje prywatne (występujące tylko w jednej rodzinie), niemniej nadal szereg różnych PTC to mutacje powtarzające się w kilku rodzinach. Ponadto, nawet w przypadku mutacji prywatnych, określenie wydajności translacyjnej

supresji PTC może wnieść dodatkową wiedzę na temat zależności tego procesu od kontekstu sekwencyjnego.

Wybór PCD jako modelu do badań nad stymulacją PTC *readthrough* uwzględnia dodatkowo ważny aspekt praktyczny. Główną przyczyną klinicznych komplikacji w PCD jest dysfunkcja nabłonka orzęsionego wyściełającego drogi oddechowe. W związku z tym, atutem potencjalnej terapii opartej na stosowaniu związków stymulujących translacyjny odczyt PTC byłaby możliwość podania tych związków bezpośrednio do dróg oddechowych (inhalacje), ograniczająca ich toksyczne działanie na resztę organizmu (nerki, wątroba, ucho wewnętrzne).

6.2. Wpływ badanych stężeń AAGs na PTC *readthrough*

Za wyjątkiem amikacyny, zarówno w systemie *in vitro* jak i *ex vivo*, wszystkie testowane AAGs stymulowały PTC *readthrough*. Wydajność stymulowanego AAGs translacyjnego odczytu różnych PTC osiągnięta w niniejszych eksperymentach jest zbliżona do wyników prezentowanych w badaniach innych zespołów badawczych^{34,43,99,181,136,182}, chociaż bezpośrednie porównanie nie jest możliwe ze względu na zastosowane różne systemy reporterowe. Zaskakująca jest natomiast całkowita nieskuteczność amikacyny, gdyż związek ten był wielokrotnie opisywany w literaturze jako stymulator translacyjnego odczytu PTC, choć o wyraźnie mniejszym potencjale niż gentamycyna czy paromomycyna^{97,99,105,183}.

Wydajność PTC *readthrough* zarówno w warunkach *in vitro* i *ex vivo* korelowała pozytywnie ze stężeniem badanych związków stymulujących. Należy jednak podkreślić, że maksymalne stężenia związków używane w obu systemach eksperymentalnych różniły się między sobą.

Ustalone wstępnie w oparciu o dane literaturowe^{34,105,134} maksymalne stężenia AAGs w eksperymentach *in vitro* wynosiły 60 µg/ml dla gentamycyny, amikacyny i paromomycyny oraz 5 µg/ml dla G418. Jednakże, negatywny wpływ AAGs na wydajność procesu translacji stwierdzony we wstępnych eksperymentach *in vitro* spowodował, że w dalszych eksperymentach obniżono maksymalne stężenia AAGs, do arbitralnie ustalonego poziomu niepowodującego spadku translacji o więcej niż 30% w stosunku do reakcji bez AAGs (maksymalne użyte stężenia wynosiły: 15 µg/ml

dla gentamycyny i paromomycyny; 1,5 µg/ml dla G418; amikacyna na tym etapie została już wykluczona z badań).

W eksperymentach *ex vivo* stężenia AAGs stosowane zostały ustalone tak, by nie przekraczały dawek LD₅₀ znanych z literatury dla tego typu komórek^{23,31} (2000 µg/ml dla gentamycyny i paromomycyny; 400 µg/ml dla G418). Stężenia AAGs w układzie *ex vivo* były więc dwa lub trzy rzędy wielkości wyższe, niż te użyte w systemie *in vitro*. Mimo to, wydajność translacyjnego odczytu PTC w eksperymentach *ex vivo* była 2-12 razy niższa niż w eksperymentach *in vitro*. Jednym z wyjaśnień niskiej wydajności stymulacji PTC *readthrough* przez AAGs w układzie *ex vivo* jest ograniczona zdolności przenikania tych związków przez błonę komórkową, a zatem wynika ona z niższego efektywnego stężenia AAGs wewnątrz komórki (biodostępność - zagadnienie opisano dokładniej w rozdziale 6.6.).

6.3. Wpływ kodonu STOP i nukleotydu +4 na PTC *readthrough*

Skuteczność związków stymulujących PTC *readthrough* zależała zarówno od ich rodzaju i stężenia, jak i od tożsamości danego PTC (kodonu STOP). Spośród konstruktów odpowiadających na traktowanie AAGs, najwyższy poziom stymulowanego PTC *readthrough* był obserwowany dla konstruktów zawierających kodon UGA (DNAH5_32, DNAH5_49 oraz DNAH11_70). Nie dotyczyło to jednak wszystkich konstruktów z tym kodonem; w trzech z siedmiu konstruktów z kodonem UGA nie wykazano istotnego poziomu stymulacji translacyjnego odczytu PTC przez żaden z badanych AAGs.

Dla konstruktów zawierających kodon UAG, uzyskano pozytywną odpowiedź na stymulację AAGs tylko w jednym z sześciu badanych konstruktów zawierających ten PTC. W żadnym z konstruktów zawierających kodon UAA, obecność AAGs nie stymulowała PTC *readthrough*, co jest zgodne z danymi literaturowymi^{34,36,43,48}.

Podsumowując, podatność kodonów STOP na supresję sygnału terminacji obserwowaną w naszych badaniach można uszeregować w kolejności: UGA > UAG >> UAA. Kolejność ta jest zgodna z innymi doniesieniami w tej tematyce^{22,34,186,187}.

Możliwym wytłumaczeniem różnic pomiędzy efektywnością translacyjnego odczytu PTC wprowadzających ten sam typ kodonu STOP, może być tożsamość nukleotydu

w pozycji +4. Wiele danych literaturowych wskazuje, że obecność cytozyny w tej pozycji zwiększa supresję kodonów STOP^{27,33,37-40,60,188}. Wyniki naszych eksperymentów nie wskazują jednak na jednoznaczną korelację pomiędzy nukleotydem w pozycji +4, a efektywnością PTC *readthrough*. Na przykład, z dwóch przebadanych konstruktów zawierających kodon UGA z następującą po nim cytozyną (DNAH5_32 i DNAH5_49), drugi wykazywał znacznie niższy poziom PTC *readthrough* niż pierwszy, zaś wstawka najbardziej podatna na stymulację (DNAH11_70) zawierała w pozycji +4 tyminę, a nie cytozynę.

W ostatnim czasie, kilka grup badawczych otrzymało zbliżone wyniki do naszych eksperymentów, co wskazuje że rola cytozyny w pozycji +4 jest nadal dyskusyjna^{103,142}. Prawdopodobnie na wydajność procesu PTC *readthrough* wpływają także inne czynniki, m. in. pozostałe nukleotydy otaczające kodon STOP, czy też tworzenie struktur drugorzędowych, takich jak np. spinki.

6.4. Stabilność transkryptów - wpływ procesu NMD

Intensywność procesu *Nonsense Mediated mRNA Decay* (NMD), wpływająca na ilość dostępnego transkryptu, jest kolejnym czynnikiem określającym wydajność PTC *readthrough*. Stosowany przez nas system eksperymentalny (wektor reporterowy pDluc) nie pozwalał na jednoczesną analizę procesu PTC *readthrough* i NMD, w związku z czym nie było możliwe zebranie danych na temat stabilności transkryptów zawierających PTC podczas reakcji TnT i w komórkach HEK293. Jednakże, biorąc pod uwagę stosunkowo niewielką długość wstawki (około 20 nt), niewielką długość 3'UTR w plazmidzie oraz brak miejsc składania transkryptu (typowych miejsc przyłączania białek EJC potencjalnie zaangażowanych w proces NMD), można przypuszczać, że zarówno testowane w naszych badaniach konstrukty zawierające PTC, jak i te z sekwencją typu dzikiego, nie ulegały wzmożonej degradacji na drodze NMD.

6.5. Wpływ związków stymulujących na komórki nabłonka

Ze względu na tkankowo specyficzną ekspresję niektórych białek, wydajność stymulacji PTC *readthrough* związkami chemicznymi w warunkach *ex vivo* może również zależeć od typu komórek. W naszych eksperymentach, mających na celu określenie

ogólnej efektywności stymulowanego AAGs translacyjnego odczytu badanych PTC, zastosowaliśmy transfekowane linie komórek HEK293. Linie te, wywodzące się z nabłonka nerki, są często wykorzystywane w badaniach nefrotoksyczności leków, stąd znane są dla nich wartości $LD_{50}^{114,189,190}$. Ponadto, komórki HEK293 charakteryzują się łatwością transfekcji i są bardzo często wykorzystywane do wstępnego testowania zależności efektywności PTC *readthrough* od rodzaju mutacji i stosowanego stymulatora tego procesu^{33,63,99,182}.

Ewentualne zastosowanie kliniczne stymulowanego PTC *readthrough* u pacjentów z PCD związane jest jednak z celowanym traktowaniem komórek nabłonka oddechowego, najbardziej dotkniętego objawami choroby (np. poprzez wziewne podanie leku). Dlatego też, istotne było także przetestowanie podatności danych PTC na stymulowany PTC *readthrough* bezpośrednio w tym typie komórek. W ramach niniejszej pracy, komórki nabłonka oddechowego testowano pod kątem oceny cyto- i ciliotoksyczności stosowanych stymulatorów procesu PTC *readthrough*.

Obecnie brak jest dostępnych, łatwych do namnożenia i transfekcji, linii komórek nabłonka oddechowego, które byłyby jednocześnie zdolne do wykształcenia rzęsek (różnicowania); z kolei dostęp do materiału biologicznego od pacjentów z PCD jest bardzo ograniczony. Namnożenie niezróżnicowanych komórek nabłonka w hodowli *in vitro* jest czasochłonne oraz obarczone wieloma trudnościami i ograniczeniami, np. komórki nabłonka oddechowego można pasażować maksymalnie trzy razy w trakcie całej hodowli bez utraty potencjału do różnicowania rzęsek. Dlatego też w badaniach toksyczności AAGs zastosowano model hodowli *in vitro* komórek pierwotnych nabłonka oddechowego z polipów nosowych od zdrowych dawców, które stanowią obfite źródło materiału podobnego do zdrowego nabłonka.

W niniejszej pracy zastosowano wdrożoną wcześniej w Zakładzie hodowlę typu sekwencyjnego wg Jorissena¹⁷³. Ze względu na techniczne właściwości tego typu hodowli (cykliczna wymiana pożywki w hodowli zawieszinowej), niemożliwe było bezpośrednie zbadanie ilości martwych komórek w hodowli zawieszinowej po inkubacji z AAGs. Dlatego też, do określenia wpływu AAGs na żywotność i różnicowanie nabłonka oddechowego wykorzystano metody pośrednie (ocena wielkości, ilości i stopnia orzęsienia sferoidów).

Analiza wpływu AAGs na różnicowany w hodowli *in vitro* nabłonek oddechowy zdrowych dawców wykazała, że większość z testowanych stężeń AAGs nie wpływała w negatywny sposób na żywotność komórek, czy też wykształcanie rzęsek w procesie ciliogenezy. Jedynie najwyższe używane stężenie (400 µg/ml) związku G418 powodowało wyraźny efekt negatywny (śmierć około 90% sferoidów z hodowli).

W kontynuacji niniejszych badań (grant NCN Etiuda), do analiz cytotoksyczności związków NAGs zaplanowano wykorzystanie metody hodowli ALI¹⁷⁵, która jest lepszym modelem do analizy wpływu czynników chemicznych na nabłonek oddechowy^{191,192} i umożliwia wykorzystanie komercyjnie dostępnych zestawów do pomiarów cytotoksyczności, takich jak np. *Multitox-Fluor* (Promega). Wstępne badania wpływu związków NAGs przeprowadzone w takich hodowlach sugerują, że 4 z 5 badanych związków NAGs (AMLX, TYL, AZTM, ATAL), są co najwyżej tak samo toksyczne dla nabłonka, jak dotychczas stosowane AAGs. Wbrew doniesieniom literaturowym^{193,155}, zaobserwowano wysoką cytotoksyczność ESC - wszystkie badane stężenia escyny (1; 5 i 10 µM) powodowały w ciągu 48-godzinnej inkubacji spadek żywotności komórek o minimum 50%. Częściowym wytłumaczeniem obserwowanej wysokiej toksyczności tego związku jest, zastosowany jako rozpuszczalnik 0,05% roztwór metanolu w wodzie. W czasie pomiaru TEER, próba traktowana jedynie tym rozpuszczalnikiem wykazała spadek oporności warstwy nabłonka o 20%. Jednakże, efekt ten ulegał złagodzeniu wraz z upływem czasu i po kolejnych 18 godzinach oporność warstwy nabłonka była zbliżona do nietraktowanej kontroli.

Przeprowadzono również badania pilotażowe dotyczące czasowego wpływu NAGs na funkcjonowanie rzęsek (mikroskopia *Time-lapse*); badania te wykazały, że najwyższe stosowane stężenia czterech badanych związków nie wpływały istotnie ani na częstotliwość bicia rzęsek, ani na procent bijących rzęsek w polu widzenia. Dalsze badania w tym kierunku zostaną przeprowadzone w ramach przyznanego grantu NCN Preludium.

6.6. Biodostępność związków stymulujących PTC *readthrough*

Skuteczność związków stymulujących proces translacyjnego odczytu PTC może być ograniczona poprzez ich słabą biodostępność i przenikalność przez błony komórkowe. Ten fakt jest szczególnie dobrze znany dla badanych od wielu lat, pozytywnie naładowanych AAGs, jednak ciągle brak jest skutecznych rozwiązań tego problemu.

Większość ssaczych komórek pobiera związki AAGs zarówno poprzez błony komórkowe w procesie endocytozy (receptor megaliny)^{120,194,195}, jak i wykorzystując inne mechanizmy np. nioselektywne kanały kationowe (ang. *non-selective cation channels*; NSCCs) albo kanały TRP^{196–198}. W naszych badaniach nie analizowano przepuszczalności błon komórkowych dla związków AAGs metodami bezpośrednimi. Jednakże, porównując różnice pomiędzy efektywnością stymulacji PTC *readthrough* w systemie *in vitro* oraz *ex vivo*, można spróbować pośrednio określić wpływ tego parametru.

Stężenia AAGs użyte w układzie *ex vivo* były dwa lub trzy rzędy wielkości wyższe, niż te użyte w systemie *in vitro*. Mimo to, wydajność translacyjnego odczytu PTC w eksperymentach *ex vivo* była 2-12 razy niższa niż w eksperymentach *in vitro*. Niższa wydajność stymulacji PTC *readthrough* przez AAGs w układzie *ex vivo* może wynikać z ograniczonej zdolności przenikania tych związków przez błonę komórkową a zatem z niższego efektywnego stężenia AAGs wewnątrz komórki. Bazując na otrzymanych wynikach, można szacować, że w zależności od użytego związku, do wnętrza komórek wnikało od 0,1% do 0,5% testowanych AAGs, co jest zgodne z danymi opisywanymi w literaturze^{184,185}.

Tak niska przenikalność AAGs do wnętrza komórek uniemożliwia uzyskanie efektywnej stymulacji translacyjnego odczytu PTC przy użyciu AAGs podawanych pozakomórkowo. Jak wykazano wcześniej (rozdział 5.6.), stężenia AAGs użyte w eksperymentach *ex vivo* były niestety maksymalnymi stosunkowo bezpiecznymi stężeniami, ze względu na znaną z literatury toksycznością wysokich stężeń tych związków. Podwyższenie stosowanych zewnątrzkomórkowych stężeń AAGs nie byłoby więc wskazane. Potwierdzeniem tego faktu jest obserwacja, że najwyższe użyte stężenie G418 (400 µg/ml) wykazywało silną cytotoksyczność w stosunku do komórek pierwotnych nabłonka oddechowego zróżnicowanych w hodowli sekwencyjnej.

Możliwym rozwiązaniem słabej przenikalności AAGs do wnętrza komórek jest zastosowanie związków o zmienionej strukturze chemicznej, takich jak zmodyfikowane AAGs⁴⁸ lub związki NAGs o zwiększonej przenikalności przez błony komórkowe, np. ataluren¹³⁹. Innym rozwiązaniem jest nanokapsułkowanie tych związków lub stosowanie dodatkowych związków/substancji ułatwiających przenikanie przez błony komórkowe¹³¹. Zwiększenie biodostępności związków stymulujących PTC *readthrough* możliwe jest także przez zastosowanie związków stymulujących kanały kationowe typu NSCCs lub TRP, takich jak resinoferatoksyna lub anandamid¹⁹⁴. Związki te, otwierając kanały jonowe, indukują napływ kationów i tym samym zwiększają napływ pozytywnie naładowanych AAGs do komórki¹⁹⁴. Innymi związkami wpływającymi na wnikanie AAGs do wnętrza komórek, są pętlowe leki moczopędne, bumetanid i furasemid, które hiperpolaryzują błonę komórkową¹⁹⁹. Dalsze badania w tym kierunku pozwolą ocenić, które z tych rozwiązań byłoby optymalne dla komórek nabłonka oddechowego.

6.7. Wybrane problemy związane z perspektywą klinicznego zastosowania terapii wykorzystujących podejście PTC *readthrough*

6.7.1. Aminokwas wbudowany na skutek PTC *readthrough*, a funkcjonalność białka

Choć istnieje kilka nc-tRNA mogących rozpoznawać poszczególne kodony STOP (Tabela 6), wydaje się że częstość ich wykorzystywania w procesie PTC *readthrough* nie jest losowa.

Według licznych badań, w przypadku wirusowych i drożdżowych mRNA w naturalnym (nie-stymulowanym) procesie PTC *readthrough*, kodon UGA jest odczytywany jako tryptofan (Trp), cysteina (Cys) lub arginina (Arg)^{200–203}, a kodon UAA jako glutamina (Gln)^{200,201,203}. Kodon UAG jest odczytywany jako tryptofan (Trp) i Gln^{200,201,203}, albo jako Trp, Tyr lub lizyna (Lys)⁴¹. Dokładniejsze badania²³ wykorzystujące spektrometrię masową potwierdziły, że aminokwasami wbudowywanymi w miejscu kodonu UGA są Trp, Cys i Arg. Jednak w przeciwieństwie do wcześniejszych wyników, badania te wykazały, że kodony UAA i UAG najczęściej są odczytywane jako Gln, Tyr i Lys^{14,204}. Ostatnie badania w komórkach drożdży i na ludzkich liniach

komórkowych (HEK293) wykazały, że zarówno w naturalnie występującym jak i stymulowanym translacyjnym odczycie kodonów STOP, tożsamość wbudowywanych aminokwasów jest taka sama, jednak częstotliwość ich włączania zależy od zastosowanego związku stymulującego^{23,24}. Stwierdzono także, że niesparowanie (ang. *mismatch*) w pozycji drugiej kodonu nie skutkuje efektywnym wbudowywaniem aminokwasu w pozycji kodonu STOP. Dodatkowo, dane literaturowe sugerują, że samo otoczenie nukleotydowe wokół kodonu STOP może zmienić tożsamość wbudowywanych nc-tRNA²⁴.

Nierozwiązanym pytaniem pozostaje, czy dana substytucja aminokwasowa wpływa na funkcję białka. W przypadku naszych badań, nie mieliśmy możliwości sprawdzenia metodami eksperymentalnymi (np. spektrometria masowa²³), jakie aminokwasy zostały wbudowane w miejscu PTC. Jednakże, powołując się na przedstawione wyżej dane literaturowe, spróbowaliśmy przewidzieć możliwy wpływ substytucji aminokwasowych na ciężkie łańcuchy dynein aksonemalnych (białka DNAH5 i DNAH11), w których zlokalizowane są trzy PTC najbardziej podatne na dekodowanie w obecności badanych stężeń AAGs (konstrukty DNAH5_32 i DNAH5_49 oraz DNAH11_70). Wszystkie trzy konstrukty posiadają w sekwencji dzikiej kodon kodujący argininę (CGA), który w wyniku substytucji C>T zostaje zamieniony na przedwczesny kodon STOP: UGA. Według danych literaturowych^{22,24,186,23}, na skutek translacyjnego odczytu kodonu UGA, do tworzonego łańcucha białkowego mogą zostać włączone zarówno Arg, jak również Trp lub Cys (Tabela 7). W przypadku włączenia Arg, translacja powoduje odtworzenie sekwencji białka typu dzikiego, gwarantując pełną funkcjonalność białka. Włączenie w tej pozycji Trp lub Cys wprowadza substytucje aminokwasowe, które mogą wpłynąć na funkcje tego białka.

Tabela 6. Bliskoznaczne antykodony dla trzech kodonów STOP.

W kolumnach „kodowany aminokwas” podano aminokwasy odpowiadające nc-tRNA; pogrubieniem lub podkreśleniem zaznaczono aminokwasy, które według badań z wykorzystaniem spektrometrii masowej są odpowiednio, najczęściej lub często wbudowywane w procesie PTC *readthrough*. Na podstawie: Roy i wsp.²³

Kodon STOP 5'>3'	Antykodon w nc-tRNA 3'>5'	Kodowany aminokwas	Niesparowanie w 1-ej pozycji kodonu	Antykodon w nc-tRNA 3'>5'	Kodowany aminokwas	Niesparowanie w 2-ej pozycji kodonu	Antykodon w nc-tRNA 3'>5'	Kodowany aminokwas	Niesparowanie w 3-ej pozycji kodonu
UAA	UUU	<u>Lys</u>	U-U	AGU	Ser	A-G	AUG	<u>Tyr</u>	A-G
	GUU	Gln	U-G	x			x		
	CUU	Glu	U-C	AAU	Leu	A-A	AUA	Tyr	A-A
UAG	UUC	Lys	U-U	AGC	Ser	A-G	x		
	GUC	<u>Gln</u>	U-G	ACC	Trp	A-C	AUG	Tyr	G-G
	CUC	Glu	U-C	AAC	Leu	A-A	AUA	Tyr	G-A
UGA	UCU	Arg	U-U	x			ACG	Cys	A-G
	GCU	Arg	U-G	AGU	Ser	G-G	ACC	<u>Trp</u>	A-C
	CCU	Gly	U-C	AAU	Leu	G-A	ACA	Cys	A-A

Tabela 7. Pozycje PTC prowadzących do potencjalnych substytucji aminokwasowych w białkach DNAH5 i DNAH11.

Nazwa konstruktu gen_ekson	Pozycja PTC w białku, prawidłowy aminokwas	Potencjalna substytucja aminokwasu w przypadku supresji PTC (jeżeli brak wbudowania Arg)
DNAH5_32	1711; Arg	Trp lub Cys
DNAH5_49	2677; Arg	Trp lub Cys
DNAH11_70	3809; Arg	Trp lub Cys

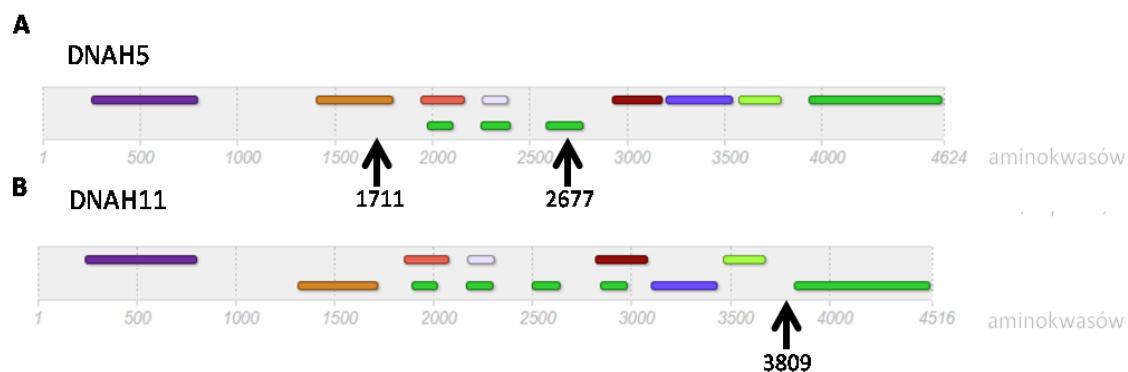
Analiza substytucji aminokwasowych w białkach DNAH5 i DNAH11 wskazuje na szkodliwy efekt prawdopodobnych substytucji (program *PROVEAN*²⁰⁵; provean.jcvi.org; Tabela 8).

Tabela 8. Wpływ substytucji aminokwasowych wprowadzanych przez odczyt badanych PTC odpowiadających na stymulację związkami AAGs. Na podstawie: program *Provean*²⁰⁵ (provean.jcvi.org).

Białko	Wariant	Punktacja PROVEAN	Przewidywany wpływ substytucji (punkt odcięcia = - 2,5)
DNAH5	R2677W	-7,855	Szkodliwy
DNAH5	R2677C	-7,855	Szkodliwy
DNAH5	R1711W	-7,292	Szkodliwy
DNAH5	R1711C	-7,359	Szkodliwy
DNAH11	R3809W	-7,329	Szkodliwy
DNAH11	R3809C	-7,289	Szkodliwy

Można jednak założyć, że po pierwsze, zdarzyć się mogą substytucje rekonstruuujące właściwy kodon, a po drugie, w niektórych przypadkach obecność białka o zmienionej strukturze jest wystarczająca do zachowania funkcji rzęsek. Położenie trzech omawianych mutacji w odniesieniu do lokalizacji funkcjonalnych domen w tworzących zewnętrzne ramiona dyneinowe rzęski białkach DNAH5 i DNAH11 przedstawiono schematycznie na rycinie 34. Według bazy *Interpro* (www.ebi.ac.uk/interpro²⁰⁶), aminokwasy 1711 oraz 2677 w białku DNAH5 (konstrukty DNAH5_32 i DNA5_49), leżą w obrębie

potencjalnie wrażliwych domen funkcjonalnych – odpowiednio *Dynein heavy chain, domain-2* (Ryc. 34A, kolor brązowy) oraz *AAA+ ATPase domain* (Ryc. 34A, kolor zielony). Jednakże, aminokwas 3809 w białku DNAH11 (konstrukt DNA11_70) jest położony pomiędzy funkcjonalnymi domenami białka DNAH11, co może sugerować potencjalnie mały wpływ tej substytucji aminokwasowej (Ryc. 34B).



Rycina 34. Położenie badanych substytucji aminokwasowych (oznaczone strzałkami) w odniesieniu do lokalizacji funkcjonalnych domen w białkach: A) DNAH5; B) DNAH11. Na podstawie: *InterPro*²⁰⁶ (www.ebi.ac.uk/interpro).

Ze względu na ograniczenia finansowe projektu nie byliśmy w stanie przeprowadzić sekwencjonowania peptydów uzyskanych na drodze PTC *readthrough*, ani modelowania białek metodami bioinformatycznymi lub krystalizacji białek DNAH11 i DNAH5, co z pewnością pogłębiłoby ocenę możliwych zmian w strukturze tych białek na skutek substytucji aminokwasowych.

Biorąc pod uwagę podatność na stymulowany odczyt PTC oraz na lokalizację poza domenami funkcjonalnymi białka, mutacja PTC znajdująca się w konstrukcie DNAH11_70 wydaje się być obiecującym celem dalszych badań nad terapeutycznym zastosowaniem PTC *readthrough*.

Równocześnie warto podkreślić, że w przypadku słabo responsywnej mutacji Q672* w genie *SPAG1* (konstrukt SPAG1_16 zawierający kodon STOP typu UAG) analiza zmian struktury białka w programie PROVEAN wskazuje na znacznie mniej destruktywny efekt możliwych substytucji niż dla PTC z genów *DNAH5* i *DNAH11*. Punktacja PROVEAN dla substytucji Q672K wykazuje wynik neutralny (wartość -1,699), a substytucja Q672T wiąże się ze stosunkowo niewielkim wpływem na strukturę (wartość -4,115). Ze względu na wysoką częstotliwość występowania tej mutacji w polskiej populacji

pacjentów PCD, warto więc inwestować w badania możliwości PTC *readthrough* dla tej mutacji (np. przy zastosowaniu NAGs).

6.7.2. Poziom transkryptu w komórkach a genomowe mutacje PTC

Rozważając możliwość zastosowania stymulowanego PTC *readthrough* w komórkach od pacjentów (gdzie, w przeciwieństwie do badanego w niniejszej pracy konstrukt, obecny jest cały gen zawierający mutację PTC), można pokusić się o spekulacje dotyczące prawdopodobieństwa wystąpienia NMD w komórkach zawierających badane PTC.

Wśród badanych przez nas mutacji, tylko dwa PTC w genie *CCDC40* (konstrukty *CCDC40_20a*, *CCDC_40b*) znajdowały się w ostatnim eksonie genu. Taka lokalizacja jest uznawana za sprzyjającą PTC *readthrough*, ze względu na osłabioną indukcję procesu NMD transkryptu, tym samym zwiększającą jego dostępność dla translacyjnego odczytu PTC⁷⁴. Pomimo, że nasze niepublikowane dane wykazały, że ilość transkryptu *CCDC40* jest porównywalna u pacjentów z mutacją i u osób zdrowych, w testowanych przez nas warunkach, konstrukty z tymi mutacjami nie manifestowały podatności na stymulowaną supresję kodonów STOP. Niska responsywność tych konstruktów może być spowodowana otoczeniem nukleotydowym kodonu STOP jak i jego tożsamością: obydwie konstrukty zawierają kodony, które charakteryzują się brakiem lub bardzo niską podatnością na PTC *readthrough* (konstrukt *CCDC40_20a*: kodon UAA, brak PTC *readthrough*; konstrukt *CCDC40_20b*: kodon UAG – PTC *readthrough* niski lub brak).

W przypadku pozostałych analizowanych mutacji PTC, sekwencje genów zawierały między miejscem PTC a końcem 3'UTR transkryptu miejsca składania transkryptu (introny) i związane z nimi kompleksy białek EJC, których obecność zdecydowanie przyspiesza degradację transkryptów w procesie NMD. Analizy transkryptów pochodzących z komórek nabłonka oddechowego pacjentów chorych na PCD metodą pół-ilościową (*multiplex* PCR) lub ilościową (*Real-Time* qPCR) wykazują, że dla każdego genu może być to sytuacja indywidualna, np. transkrypty dla genu *SPAG1* z PTC w eksonie 16 (wstawka *SPAG1_16*) są prawie niewykrywalne, natomiast dla innych analizowanych genów (np. *DNAH5* lub *CCDC40*), ilość transkryptu u pacjentów z PCD jest podobna do ilości obserwowanej u osób zdrowych (nasze niepublikowane dane).

Z opublikowanych niedawno badań wynika, że już niewielki poziom stymulacji translacyjnego odczytu PTC (1-2%), poprzez usunięcie kompleksów białek UPF1

znajdujących się poniżej PTC, może znacząco zmniejszyć efektywność degradacji na drodze NMD i ustabilizować transkrypty. Dlatego też, wykazana przez nas podatność na stymulację dla części z badanych mutacji (np. mutacje PTC w genie *DNAH5* egz. 20, 32, 49 lub *DNAH11* egz. 70) na poziomie 2-6% białka typu dzikiego (system *ex vivo*), pozwala przypuszczać, że te transkrypty zostaną ustabilizowane przez proces PTC *readthrough* i umożliwią ekspresję białek pełnej długości.

Ponadto, zakładając możliwość degradacji na drodze NMD, warto pamiętać o możliwości zwiększenia ilości zawierającego PTC transkryptu poprzez zastosowanie związków hamujących proces NMD, takich jak amleksanoks. Związek ten skutecznie indukuje PTC *readthrough* a jednocześnie hamuje degradację transkryptów na drodze NMD^{162,163}. Nasze wyniki wstępne wykazały, że cytotoksyczność amleksanoksu wobec komórek nabłonka oddechowego jest niższa niż gentamycyny (20-30%). W następnym etapie badań (grant NCN Preludium) planowana jest pełna analiza wpływu amleksanoksu na stymulację supresji kodonów STOP w badanych mutacjach.

6.7.3. Ilość białka potrzebna do zniesienia/złagodzenia symptomów chorobowych

Istotnym zagadnieniem związanym z zastosowaniem klinicznym terapii wykorzystujących podejście PTC *readthrough* jest minimalna ilość białka pełnej długości, potrzebna do złagodzenia objawów danej choroby. Opisywane wartości mają szeroki zakres – od 30-35% normalnego poziomu białka CFTR w mukowiscydozie, przez 20-30% dystrofiny w DMD, do 0,4-1% α -L-iduronidazy w mukopolisacharydozie typu I¹⁸⁷.

W przypadku PCD, nie można mówić o ilości pojedynczego białka wymaganej do złagodzenia objawów chorobowych. PCD charakteryzuje się bowiem wysoką heterogennością genetyczną, a geny zaangażowane w jej patogenezę posiadają różne funkcje komórkowe, a co za tym idzie, mogą występować w komórce nabłonka oddechowego w różnej ilości, na różnych etapach jej różnicowania. W szczególności, można się spodziewać różnic pomiędzy wymaganą do prawidłowego funkcjonowania rzęsek ilością białek strukturalnych (takich jak *DNAH5*, *DNAH11* czy *RSPH4A*) oraz białek biorących udział w składaniu i transporcie tych elementów z cytoplazmy do rzęski (takich jak *SPAG1*). Dlatego też, przyszłe zastosowanie kliniczne podejścia PTC *readthrough* będzie wymagało eksperymentalnego sprawdzenia wymaganej ilości białka dla każdego badanego genu.

6.7.4. Skuteczna dawka i sposób podawania związków stymulujących proces PTC *readthrough*

Stymulowany PTC *readthrough* jest zjawiskiem przejściowym, w związku z czym, terapeutyczne wykorzystanie tego mechanizmu wymaga powtarzalnego, długotrwałego (zazwyczaj dożywotniego) podawania środków stymulujących.

Większość badań na modelach zwierzęcych wskazuje, że mechanizm stymulacji PTC *readthrough* przez AAGs działa w sposób tzw. „*peak-driven*”- efektywniejsze działanie obserwowano po podaniu większej dawki leku niż po wielokrotnym podawaniu dawek mniejszych⁴⁸. Przykładem są badania na mysim modelu DMD, myszy *mdx*, gdzie maksymalne stężenie w serum dożylnie podawanej gentamycyny było obserwowane 20 minut po podaniu leku. Po 4 godzinach, stężenie leku drastycznie spadało⁹⁵. Podobne wyniki zaobserwowano w mysim modelu zwyrodnienia barwnikowego siatkówki, gdzie większą wydajność stymulacji PTC *readthrough* po traktowaniu gentamycyną, wykryto po powtarzalnych podaniach większych dawek, niż po ciągłej administracji małych dawek AAGs¹⁰⁶. W próbach klinicznych z wykorzystaniem gentamycyny do indukcji PTC *readthrough* u pacjentów z mukowiscydozą, również testowano różne schematy podawania leku. Clancy i wsp. badali podawanie dożylnie 2,5 mg/kg gentamycyny trzy razy dziennie¹⁰⁷, z kolei w próbach klinicznych grupy Sermet-Gaudelus podawano 10 mg/kg raz dziennie przez 15 dni; osiągając maksymalne stężenie w serum po 30 minutach¹¹⁰- wynik bardzo zbliżony do tego obserwowanego u myszy. Powyższe próby kliniczne potwierdziły, że wyższe, jednorazowe dawki AAGs efektywniej stymulują PTC *readthrough*, choć może się to wiązać ze wzmożonym działaniem toksycznym tych związków. Mimo teoretycznego ryzyka, w kolejnej, długoterminowej próbie klinicznej, podawano dożylnie dużą dawkę gentamycyny, 7,5 mg/kg (raz lub dwa razy w tygodniu), przez sześć miesięcy i nie zaobserwowano istotnych efektów ubocznych¹¹¹. Badania te pokazały, że długotrwała terapia z wykorzystaniem AAGs do stymulacji PTC *readthrough* jest możliwa, jednakże osiągnięty poziom stymulacji był zbyt niski, aby zaobserwować korzyści kliniczne.

Zarówno dane literaturowe, jak i wyniki badań opisanych w niniejszej pracy wskazują, że wydajność procesu PTC *readthrough* zależy zarówno od użytego związku stymulującego, jego stężenia, rodzaju kodonu STOP jak i jego otoczenia. Jednakże, ani sama znajomość danego związku stymulującego lub sekwencji DNA

nie jest wystarczająca, aby przewidzieć wydajność supresji kodonu STOP w przypadku danej mutacji. Co więcej, używany związek stymulujący PTC *readthrough*, jego biodostępność, wpływ na proces NMD oraz tożsamość wbudowanego aminokwasu w miejscu przedwczesnego kodonu STOP mogą wpływać na możliwość zastosowania terapeutycznego podejścia PTC *readthrough* dla konkretnej mutacji. Wynika z tego, iż każdorazowo przy planowaniu eksperymentu należy nie tylko rozważać parę: mutacja PTC - związek stymulujący, zamiast każdego z tych czynników osobno, ale również jak najdokładniej eksperymentalnie sprawdzić możliwość zastosowania podejścia PTC *readthrough* u pacjenta.

6.8. Znaczenie otrzymanych wyników dla rozwoju dziedziny naukowej oraz rozwoju cywilizacyjnego

Terapeutyczne zastosowanie PTC *readthrough*, mimo wielu zalet i obiecujących wyników wstępnych zebranych podczas kilku prób klinicznych (m.in. w leczeniu mukowiscydozy i DMD; więcej informacji rozdziałach 1.7 i 1.8), wymaga nadal dalszych badań związanych z bezpieczeństwem takich terapii, ich specyficznością oraz długofalowym efektem. Niemniej, wyniki uzyskane w opisanym projekcie mogą przyczynić się do lepszego poznania zależności efektywności stymulowanego związkami chemicznymi procesu PTC *readthrough* od miejsca występowania kodonu STOP w genomie oraz wpływu otaczającej go sekwencji.

Mimo wykazania skutecznej stymulacji translacyjnego odczytu niektórych PTC przez AAGs, wyniki niniejszej pracy wskazują na potrzebę poszukiwania związków o mniejszej toksyczności, wyższej zdolności przenikania przez błonę komórkową i/lub większym potencjale stymulacji procesu PTC *readthrough*. Wnioski te stały się podstawą otrzymania grantu NCN Etiuda oraz niedawno rozpoczętego (listopad 2017) projektu badawczego NCN Preludium, który zakłada przetestowanie związków nie-aminoglikozydowych (NAGs) do stymulacji PTC *readthrough* w PCD. Według danych literaturowych, wybrane związki NAGs (amleksanoks, tylozyna, azytromycyna, escyna i ataluren) wykazują podobny lub wyższy niż AAGs potencjał stymulujący - przy znacznie obniżonej toksyczności, zarówno na poziomie komórkowym (cyto- i ciliotoksyczność), jak i na poziomie organizmu (ototoksyczność i nefrotoksyczność)^{135,139,207,181,208,209}.

Biorąc pod uwagę przetestowane w naszych badaniach mutacje PTC odpowiadające choćby w niewielkim stopniu na stymulację AAGs oraz uwzględniając częstość ich występowania u polskich pacjentów z PCD, szacuje się, że około 3% chorych mogłoby odnieść korzyści z opracowania terapii opartej na stymulowanym PTC *readthrough*. Niestety, PTC obecny w genie SPAG1 (najczęstsza mutacja związana z patogenezą PCD w Polsce, odpowiadająca za około 10% wszystkich polskich przypadków), nie podlegał supresji po stymulacji testowanymi związkami AAGs; w najbliższej przyszłości planowane są dalsze poszukiwania efektywnego supresora tej mutacji wśród związków NAGs (grant NCN Preludium).

Badania nad wpływem AAGs oraz NAGs na żywotność komórek nabłonka oddechowego oraz wydajność procesu ciliogenezy mogą stworzyć podstawy dla dalszych prac nad wykorzystaniem tych związków, zarówno w PCD jak i innych chorobach genetycznych dotyczących układu oddechowy, w których użycie badanych związków mogłoby okazać się skuteczną metodą terapeutyczną (np. mukowiscydoza).

7. WNIOSKI

- Najbardziej podatnymi na translacyjny odczyt były przedwczesne kodony STOP wprowadzające kodon o sekwencji UGA, w drugiej kolejności te wprowadzające UAG. Kodon STOP o sekwencji UAA nie podlegał supresji pod wpływem stosowanych związków.
- Wpływ cytozyny w pozycji +4 (nukleotyd bezpośrednio za kodonem STOP) na wydajność stymulowanego odczytu przedwczesnych kodonów STOP był mniej znaczący niż wskazują na to dane literaturowe - konstrukt najbardziej podatny na stymulację (DNAH11_70) zawierał w tej pozycji tyminę.
- Najbardziej efektywnymi związkami stymulującymi translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP były G418, następnie paromomycyna i gentamycyna. Jednocześnie, najbardziej efektywne stężenie G418 było zbyt toksyczne dla komórek nabłonka oddechowego, aby stosować je terapeutycznie. Gentamycyna i paromomycyna charakteryzowały się umiarkowaną toksycznością oraz nie wpływały w istotny sposób na żywotność i funkcję komórek nabłonka oddechowego. Amikacyna w żadnym z testowanych stężeń nie indukowała mierzalnego poziomu stymulowanego translacyjnego odczytu przedwczesnych kodonów STOP.
- Antybiotyki aminoglikozydowe wydają się posiadać jedynie ograniczoną zdolność przenikania przez błony komórkowe, co powoduje ich zmniejszone działanie w warunkach *ex vivo* w porównaniu do badań *in vitro*.
- Konieczne jest zbadanie, jako alternatywy dla antybiotyków aminoglikozydowych, związków nie-aminoglikozydowych o zwiększonym potencjale stymulacyjnym, obniżonej toksyczności i większej zdolności przenikania przez błony komórkowe. Wstępne wyniki wskazują na niską cytotoksyczność większości związków nie-aminoglikozydowych w odniesieniu do komórek nabłonka oddechowego oraz na brak ich negatywnego wpływu na ciliogenezę.

8. LITERATURA

1. Bertram G, Innes S, Minella O, Richardson J, Stansfield I. Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiol Read Engl* 2001; 147:255–69.
2. Turanov AA, Xu X-M, Carlson BA, Yoo M-H, Gladyshev VN, Hatfield DL. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Adv Nutr Bethesda Md* 2011; 2:122–8.
3. Dever TE, Green R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4:a013706.
4. Kisselev L, Ehrenberg M, Frolova L. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J* 2003; 22:175–82.
5. Scolnick E, Tompkins R, Caskey T, Nirenberg M. Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968; 61:768–74.
6. Nakamura Y, Ito K. A tripeptide discriminator for stop codon recognition. *FEBS Lett* 2002; 514:30–3.
7. Alkalaeva EZ, Pisarev AV, Frolova LY, Kisselev LL, Pestova TV. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* 2006; 125:1125–36.
8. Zavialov AV, Buckingham RH, Ehrenberg M. A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* 2001; 107:115–24.
9. Gao H, Zhou Z, Rawat U, Huang C, Bouakaz L, Wang C, Cheng Z, Liu Y, Zavialov A, Gursky R, et al. RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors. *Cell* 2007; 129:929–41.
10. Frolova L, Le Goff X, Rasmussen HH, Cheperegin S, Drugeon G, Kress M, Arman I, Haenni AL, Celis JE, Philippe M. A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* 1994; 372:701–3.
11. Song H, Mugnier P, Das AK, Webb HM, Evans DR, Tuite MF, Hemmings BA, Barford D. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* 2000; 100:311–21.
12. Kolosov P, Frolova L, Seit-Nebi A, Dubovaya V, Kononenko A, Oparina N, Justesen J, Efimov A, Kisselev L. Invariant amino acids essential for decoding function of polypeptide release factor eRF1. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:6418–25.

13. Cheng Z, Saito K, Pisarev AV, Wada M, Pisareva VP, Pestova TV, Gajda M, Round A, Kong C, Lim M, et al. Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev* 2009; 23:1106–18.
14. Blanchet S, Rowe M, Von der Haar T, Fabret C, Demais S, Howard MJ, Namy O. New insights into stop codon recognition by eRF1. *Nucleic Acids Res* 2015; 43:3298–308.
15. Uchida N, Hoshino S-I, Imataka H, Sonenberg N, Katada T. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* 2002; 277:50286–92.
16. Kononenko AV, Mitkevich VA, Dubovaya VI, Kolosov PM, Makarov AA, Kisselev LL. Role of the individual domains of translation termination factor eRF1 in GTP binding to eRF3. *Proteins* 2008; 70:388–93.
17. des Georges A, Hashem Y, Unbehaun A, Grassucci RA, Taylor D, Hellen CUT, Pestova TV, Frank J. Structure of the mammalian ribosomal pre-termination complex associated with eRF1.eRF3.GDPNP. *Nucleic Acids Res* 2014; 42:3409–18.
18. Salas-Marco J, Bedwell DM. GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Mol Cell Biol* 2004; 24:7769–78.
19. Weiss RB, Dunn DM, Atkins JF, Gesteland RF. Ribosomal frameshifting from -2 to +50 nucleotides. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1990; 39:159–83.
20. Buvoli M, Buvoli A, Leinwand LA. Suppression of Nonsense Mutations in Cell Culture and Mice by Multimerized Suppressor tRNA Genes. *Mol Cell Biol* 2000; 20:3116–24.
21. Beier H, Grimm M. Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:4767–82.
22. Dabrowski M, Bukowy-Bieryllo Z, Zietkiewicz E. Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes - The impact of RNA sequence. *RNA Biol* 2015; 12:950–8.
23. Roy B, Leszyk JD, Mangus DA, Jacobson A. Nonsense suppression by near-cognate tRNAs employs alternative base pairing at codon positions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:3038–43.
24. Roy B, Friesen WJ, Tomizawa Y, Leszyk JD, Zhuo J, Johnson B, Dakka J, Trotta CR, Xue X, Mutyam V, et al. Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:12508–13.
25. Naphthine S, Yek C, Powell ML, Brown TDK, Brierley I. Characterization of the stop codon readthrough signal of Colorado tick fever virus segment 9 RNA. *RNA N Y N* 2012; 18:241–52.
26. Dreher TW, Miller WA. Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* 2006; 344:185–97.

27. Li G, Rice CM. The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. *J Virol* 1993; 67:5062–7.
28. Jungreis I, Lin MF, Spokony R, Chan CS, Negre N, Victorsen A, White KP, Kellis M. Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoa. *Genome Res* 2011; 21:2096–113.
29. Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, Lin MF, Parker BJ, Washietl S, Kheradpour P, Ernst J, Jordan G, Mauceli E, et al. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature* 2011; 478:476–82.
30. Dunn JG, Foo CK, Belletier NG, Gavis ER, Weissman JS. Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *eLife* 2013; 2:e01179.
31. Andreev DE, O'Connor PBF, Loughran G, Dmitriev SE, Baranov PV, Shatsky IN. Insights into the mechanisms of eukaryotic translation gained with ribosome profiling. *Nucleic Acids Res* 2017; 45:513–26.
32. Yamaguchi Y, Hayashi A, Campagnoni CW, Kimura A, Inuzuka T, Baba H. L-MPZ, a novel isoform of myelin P0, is produced by stop codon readthrough. *J Biol Chem* 2012; 287:17765–76.
33. Loughran G, Chou M-Y, Ivanov IP, Jungreis I, Kellis M, Kiran AM, Baranov PV, Atkins JF. Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes. *Nucleic Acids Res* 2014; 42:8928–38.
34. Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA N Y N* 2000; 6:1044–55.
35. Bidou L, Hatin I, Perez N, Allamand V, Panthier J-J, Rousset J-P. Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. *Gene Ther* 2004; 11:619–27.
36. Floquet C, Hatin I, Rousset J-P, Bidou L. Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin. *PLoS Genet* 2012; 8:e1002608.
37. Pedersen WT, Curran JF. Effects of the nucleotide 3' to an amber codon on ribosomal selection rates of suppressor tRNA and release factor-1. *J Mol Biol* 1991; 219:231–41.
38. Skuzeski JM, Nichols LM, Gesteland RF, Atkins JF. The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons. *J Mol Biol* 1991; 218:365–73.
39. Tate WP, Poole ES, Horsfield JA, Mannering SA, Brown CM, Moffat JG, Dalphin ME, McCaughan KK, Major LL, Wilson DN. Translational termination efficiency in both bacteria and mammals is regulated by the base following the stop codon. *Biochem Cell Biol* 1995; 73:1095–103.

40. McCaughan KK, Brown CM, Dalphin ME, Berry MJ, Tate WP. Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:5431–5.
41. Fearon K, McClendon V, Bonetti B, Bedwell DM. Premature translation termination mutations are efficiently suppressed in a highly conserved region of yeast Ste6p, a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *J Biol Chem* 1994; 269:17802–8.
42. Bonetti B, Fu L, Moon J, Bedwell DM. The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 1995; 251:334–45.
43. Howard MT, Shirts BH, Petros LM, Flanigan KM, Gesteland RF, Atkins JF. Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2000; 48:164–9.
44. Arkov AL, Korolev SV, Kisselev LL. 5' contexts of *Escherichia coli* and human termination codons are similar. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:4712–6.
45. Mottagui-Tabar S, Tuite MF, Isaksson LA. The influence of 5' codon context on translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem FEBS* 1998; 257:249–54.
46. Tork S, Hatin I, Rousset J-P, Fabret C. The major 5' determinant in stop codon read-through involves two adjacent adenines. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:415–21.
47. Cassan M, Rousset JP. UAG readthrough in mammalian cells: effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC Mol Biol* 2001; 2:3.
48. Lee H-LR, Dougherty JP. Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases. *Pharmacol Ther* 2012; 136:227–66.
49. Phillips-Jones MK, Watson FJ, Martin R. The 3' Codon Context Effect on UAG Suppressor tRNA is Different in *Escherichia coli* and Human Cells. *J Mol Biol* 1993; 233:1–6.
50. Wills NM, Gesteland RF, Atkins JF. Evidence that a downstream pseudoknot is required for translational read-through of the Moloney murine leukemia virus gag stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:6991–5.
51. Firth AE, Wills NM, Gesteland RF, Atkins JF. Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:6679–91.
52. Carnes J, Jacobson M, Leinwand L, Yarus M. Stop codon suppression via inhibition of eRF1 expression. *RNA N Y N* 2003; 9:648–53.
53. Chauvin C, Salhi S, Le Goff C, Viranaicken W, Diop D, Jean-Jean O. Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation. *Mol Cell Biol* 2005; 25:5801–11.

54. Diop D, Chauvin C, Jean-Jean O. Aminoglycosides and other factors promoting stop codon readthrough in human cells. *C R Biol* 2007; 330:71–9.
55. Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E, et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* 2007; 117:683–92.
56. Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metze S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, Mühlemann O. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2010; 67:677–700.
57. Klagges BR, Heimbeck G, Godenschwege TA, Hofbauer A, Pflugfelder GO, Reifegerste R, Reisch D, Schaupp M, Buchner S, Buchner E. Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1996; 16:3154–65.
58. Steneberg P, Samakovlis C. A novel stop codon readthrough mechanism produces functional Headcase protein in *Drosophila* trachea. *EMBO Rep* 2001; 2:593–7.
59. Chittum HS, Lane WS, Carlson BA, Roller PP, Lung FD, Lee BJ, Hatfield DL. Rabbit beta-globin is extended beyond its UGA stop codon by multiple suppressions and translational reading gaps. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 37:10866–70.
60. Jungreis I, Chan CS, Waterhouse RM, Fields G, Lin MF, Kellis M. Evolutionary Dynamics of Abundant Stop Codon Readthrough. *Mol Biol Evol* 2016; 33:3108–32.
61. Schueren F, Thoms S. Functional Translational Readthrough: A Systems Biology Perspective. *PLOS Genet* 2016; 12:e1006196.
62. Eswarappa SM, Potdar AA, Koch WJ, Fan Y, Vasu K, Lindner D, Willard B, Graham LM, DiCorleto PE, Fox PL. Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell* 2014; 157:1605–18.
63. Schueren F, Lingner T, George R, Hofhuis J, Dickel C, Gärtner J, Thoms S. Peroxisomal lactate dehydrogenase is generated by translational readthrough in mammals. *eLife* 2014; 3:e03640.
64. Mort M, Ivanov D, Cooper DN, Chuzhanova NA. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat* 2008; 29:1037–47.
65. Pan Q, Saltzman AL, Kim YK, Misquitta C, Shai O, Maquat LE, Frey BJ, Blencowe BJ. Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev* 2006; 20:153–8.
66. Lewis BP, Green RE, Brenner SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:189–92.

67. Mendell JT, Dietz HC. When the Message Goes Awry: Disease-Producing Mutations that Influence mRNA Content and Performance. *Cell* 2001; 107:411–4.
68. Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet EJHG* 2006; 14:1074–81.
69. Thein SL, Hesketh C, Taylor P, Temperley IJ, Hutchinson RM, Old JM, Wood WG, Clegg JB, Weatherall DJ. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:3924–8.
70. Celik A, Kervestin S, Jacobson A. NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie* 2015; 114:2–9.
71. Mühlemann O. Recognition of nonsense mRNA: towards a unified model. *Biochem Soc Trans* 2008; 36:497–501.
72. Hogg JR, Goff SP. Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell* 2010; 143:379–89.
73. Ivanov PV, Gehring NH, Kunz JB, Hentze MW, Kulozik AE. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* 2008; 27:736–47.
74. Mühlemann O. Recognition of nonsense mRNA: towards a unified model. - PubMed - NCBI [Internet].; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18481988>
75. Kuzmiak HA, Maquat LE. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 2006; 12:306–16.
76. Maquat LE The Pioneer Round of Translation: Features and Functions. *Cell*. 2010 Aug 6;142(3):368-74.
77. Pereverzev AP, Gurskaya NG, Ermakova GV, Kudryavtseva EI, Markina NM, Kotlobay AA, Lukyanov SA, Zarsky AG, Lukyanov KA. Method for quantitative analysis of nonsense-mediated mRNA decay at the single cell level. *Sci Rep* 2015; 5:7729.
78. Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA, Ghosh S, Jacobson A. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 2004; 432:112–8.
79. Hardee CL, Arévalo-Soliz LM, Hornstein BD, Zechiedrich L. Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes* 2017; 8:65.
80. Mavilio F. Developing gene and cell therapies for rare diseases: an opportunity for synergy between academia and industry. *Gene Ther* 2017; 24:590.
81. Keles E, Song Y, Du D, Dong W-J, Lin Y. Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications. *Biomater Sci* 2016; 4:1291–309.
82. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet* 2015; 52:289–96.

83. Carroll D. Genome Editing: Past, Present and Future. *Yale J Biol Med* 2017; 90:653–9.
84. Lu Z. Interaction of nonsense suppressor tRNAs and codon nonsense mutations or termination codons. *Adv Biol Chem* 2012; 02:301–14.
85. Temple GF, Dozy AM, Roy KL, Wai Kan Y. Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for β -thalassaemia. *Nature* 1982; 296:537–40.
86. Panchal RG, Wang S, McDermott J, Link CJ. Partial functional correction of xeroderma pigmentosum group A cells by suppressor tRNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10:2209–19.
87. Sako Y, Usuki F, Suga H. A novel therapeutic approach for genetic diseases by introduction of suppressor tRNA. *Nucleic Acids Symp Ser* 2004 2006; :239–40.
88. Bordeira-Carriço R, Ferreira D, Mateus DD, Pinheiro H, Pêgo AP, Santos MA, Oliveira C. Rescue of wild-type E-cadherin expression from nonsense-mutated cancer cells by a suppressor-tRNA. *Eur J Hum Genet* 2014; 22:ejhg2013292.
89. François B, Russell RJM, Murray JB, Aboul-ela F, Masquida B, Vicens Q, Westhof E. Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:5677–90.
90. Davies J, Gilbert W, Gorini L. Streptomycin, suppression, and the code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964; 51:883–90.
91. Anderson WF, Gorini L, Breckenridge L. Role of ribosomes in streptomycin-activated suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1965; 54:1076–83.
92. Fan-Minogue H, Bedwell DM. Eukaryotic ribosomal RNA determinants of aminoglycoside resistance and their role in translational fidelity. *RNA N Y N* 2008; 14:148–57.
93. Lynch SR, Puglisi JD. Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. *J Mol Biol* 2001; 306:1037–58.
94. Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 1996; 2:467–9.
95. Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999; 104:375–81.
96. Bukowy-Bieryllo Z, Dabrowski M, Witt M, Zietkiewicz E. Aminoglycoside-stimulated readthrough of premature termination codons in selected genes involved in primary ciliary dyskinesia. *RNA Biol* 2016; 13:1041–50.

97. Keeling KM, Bedwell DM. Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J Mol Med Berl Ger* 2002; 80:367–76.
98. Lai C-H, Chun HH, Nahas SA, Mitui M, Gamo KM, Du L, Gatti RA. Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced read-through of premature termination codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:15676–81.
99. Howard MT, Anderson CB, Fass U, Khatri S, Gesteland RF, Atkins JF, Flanigan KM. Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann Neurol* 2004; 55:422–6.
100. Floquet C, Deforges J, Rousset J-P, Bidou L. Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:3350–62.
101. Salvatori F, Breveglieri G, Zuccato C, Finotti A, Bianchi N, Borgatti M, Feriotto G, Destro F, Canella A, Brognara E, et al. Production of beta-globin and adult hemoglobin following G418 treatment of erythroid precursor cells from homozygous beta(0)39 thalassemia patients. *Am J Hematol* 2009; 84:720–8.
102. Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, Morio T, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional Characterization and Targeted Correction of ATM Mutations Identified in Japanese Patients with Ataxia-Telangiectasia. *Hum Mutat* 2012; 33:198–208.
103. Cogan J, Weinstein J, Wang X, Hou Y, Martin S, South AP, Woodley DT, Chen M. Aminoglycosides restore full-length type VII collagen by overcoming premature termination codons: therapeutic implications for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2014; 22:1741–52.
104. Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, et al. Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J Biochem (Tokyo)* 2003; 134:751–8.
105. Du M, Keeling KM, Fan L, Liu X, Kovaçs T, Sorscher E, Bedwell DM. Clinical doses of amikacin provide more effective suppression of the human CFTR-G542X stop mutation than gentamicin in a transgenic CF mouse model. *J Mol Med Berl Ger* 2006; 84:573–82.
106. Guerin K, Gregory-Evans CY, Hodges MD, Moosajee M, Mackay DS, Gregory-Evans K, Flannery JG. Systemic aminoglycoside treatment in rodent models of retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res* 2008; 87:197–207.
107. Clancy JP, Bebök Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, et al. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1683–92.
108. Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 2003; 349:1433–41.

109. Politano L, Nigro G, Nigro V, Piluso G, Papparella S, Paciello O, Comi LI. Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol Myopathies Cardiomyopathies* 2003; 22:15–21.
110. Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, Bismuth E, Reinert P, Lenoir G, et al. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med* 2007; 5:5.
111. Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, Al-Dahhak R, Lewis S, Shilling CJ, Kota J, Serrano-Munuera C, et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2010; 67:771–80.
112. Woodley DT, Cogan J, Hou Y, Lyu C, Marinkovich MP, Keene D, Chen M. Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Clin Invest* 2017; 127. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/92707>
113. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:727–37.
114. Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 2011; 79:33–45.
115. Huth ME, Ricci AJ, Cheng AG. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection. *Int J Otolaryngol* 2011; 2011:937861.
116. Abi-Hachem RN, Zine A, Van De Water TR. The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otoprotectives strategies. *Recent Patents CNS Drug Discov* 2010; 5:147–63.
117. Talaska AE, Schacht J. Adverse Effects of Aminoglycoside Therapy. Książka: Arya DP, editor. *Aminoglycoside Antibiotics*. John Wiley & Sons, Inc. 2007; 255–66.
118. Marzolo M-P, Farfán P. New Insights into the Roles of Megalin/LRP2 and the Regulation of its Functional Expression. *Biol Res* 2011; 44:89–105.
119. Moestrup SK, Cui S, Vorum H, Bregengård C, Bjørn SE, Norris K, Gliemann J, Christensen EI. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest* 1995; 96:1404–13.
120. Tauris J, Christensen EI, Nykjaer A, Jacobsen C, Petersen CM, Ovesen T. Cubilin and megalin co-localize in the neonatal inner ear. *Audiol Neurotol* 2009; 14:267–78.
121. Couture M, Simard M, Gourde P, Lessard C, Gurnani K, Lin L, Carrier D, Bergeron MG, Beauchamp D. Daptomycin may attenuate experimental tobramycin nephrotoxicity by electrostatic complexation to tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:742–9.
122. Reasor MJ, Kacew S. Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Exp Biol Med* Maywood NJ 2001; 226:825–30.

123. Xie J, Talaska AE, Schacht J. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear Res* 2011; 281:28–37.
124. Shulman E, Belakhov V, Wei G, Kendall A, Meyron-Holtz EG, Ben-Shachar D, Schacht J, Baasov T. Designer aminoglycosides that selectively inhibit cytoplasmic rather than mitochondrial ribosomes show decreased ototoxicity; a strategy for the treatment of genetic diseases. *J Biol Chem* 2014; 289:2318–30.
125. Hobbie SN, Akshay S, Kalapala SK, Bruell CM, Shcherbakov D, Böttger EC. Genetic analysis of interactions with eukaryotic rRNA identify the mitoribosome as target in aminoglycoside ototoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:20888–93.
126. Kishore BK, Lambricht P, Laurent G, Maldague P, Wagner R, Tulkens PM. Mechanism of protection afforded by polyaspartic acid against gentamicin-induced phospholipidosis. II. Comparative in vitro and in vivo studies with poly-L-aspartic, poly-L-glutamic and poly-D-glutamic acids. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255:875–85.
127. Du M, Keeling KM, Fan L, Liu X, Bedwell DM. Poly-L-aspartic Acid Enhances and Prolongs Gentamicin-mediated Suppression of the CFTR-G542X Mutation in a Cystic Fibrosis Mouse Model. *J Biol Chem* 2009; 284:6885–92.
128. Gilbert DN, Wood CA, Kohlhepp SJ, Kohnen PW, Houghton DC, Finkbeiner HC, Lindsley J, Bennett WM. Polyaspartic acid prevents experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J Infect Dis* 1989; 159:945–53.
129. Campbell KCM, Meech RP, Klemens JJ, Gerberi MT, Dyrstad SSW, Larsen DL, Mitchell DL, El-Azizi M, Verhulst SJ, Hughes LF. Prevention of noise- and drug-induced hearing loss with D-methionine. *Hear Res* 2007; 226:92–103.
130. Reiter RJ, Tan D-X, Korkmaz A, Fuentes-Broto L. Drug-mediated ototoxicity and tinnitus: alleviation with melatonin. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc* 2011; 62:151–7.
131. Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int J Pharm* 2010; 387:187–98.
132. Schiffelers R, Storm G, Bakker-Woudenberg I. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48:333–44.
133. Yukihara M, Ito K, Tanoue O, Goto K, Matsushita T, Matsumoto Y, Masuda M, Kimura S, Ueoka R. Effective drug delivery system for duchenne muscular dystrophy using hybrid liposomes including gentamicin along with reduced toxicity. *Biol Pharm Bull* 2011; 34:712–6.
134. Nudelman I, Rebibo-Sabbah A, Shallom-Shezifi D, Hainrichson M, Stahl I, Ben-Yosef T, Baasov T. Redesign of aminoglycosides for treatment of human genetic diseases caused by premature stop mutations. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16:6310–5.

135. Nudelman I, Rebibo-Sabbah A, Cherniavsky M, Belakhov V, Hainrichson M, Chen F, Schacht J, Pilch DS, Ben-Yosef T, Baasov T. Development of novel aminoglycoside (NB54) with reduced toxicity and enhanced suppression of disease-causing premature stop mutations. *J Med Chem* 2009; 52:2836–45.
136. Brendel C, Belakhov V, Werner H, Wegener E, Gärtner J, Nudelman I, Baasov T, Huppke P. Readthrough of nonsense mutations in Rett syndrome: evaluation of novel aminoglycosides and generation of a new mouse model. *J Mol Med Berl Ger* 2011; 89:389–98.
137. Xue X, Mutyam V, Tang L, Biswas S, Du M, Jackson LA, Dai Y, Belakhov V, Shalev M, Chen F, et al. Synthetic aminoglycosides efficiently suppress cystic fibrosis transmembrane conductance regulator nonsense mutations and are enhanced by ivacaftor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50:805–16.
138. Gunn G, Dai Y, Du M, Belakhov V, Kandasamy J, Schoeb TR, Baasov T, Bedwell DM, Keeling KM. Long-term nonsense suppression therapy moderates MPS I-H disease progression. *Mol Genet Metab* 2014; 111:374–81.
139. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007; 447:87–91.
140. Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, Connolly AM, Day JW, Flanigan KM, Goemans N, et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve* 2014; 50:477–87.
141. Goldmann T, Overlack N, Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K. PTC124-Mediated Translational Readthrough of a Nonsense Mutation Causing Usher Syndrome Type 1C. *Hum Gene Ther* 2011; 22:537–47.
142. Matalonga L, Arias Á, Tort F, Ferrer-Cortés X, Garcia-Villoria J, Coll MJ, Gort L, Ribes A. Effect of Readthrough Treatment in Fibroblasts of Patients Affected by Lysosomal Diseases Caused by Premature Termination Codons. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 2015; 12:874–86.
143. Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, Nissim-Rafinia M, Blau H, Rivlin J, Aviram M, et al. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet Lond Engl* 2008; 372:719–27.
144. Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, Hwang S, Leonard EM, Almstead NG, Ju W, Peltz SW, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol* 2007; 47:430–44.
145. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S, et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1262–72.

146. Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Elborn JS, Melotti P, Bronsveld I, Fajac I, et al. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med* 2014; 2:539–47.
147. Finkel RS, Flanigan KM, Wong B, Bönnemann C, Sampson J, Sweeney HL, Reha A, Northcutt VJ, Elfring G, Barth J, et al. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PloS One* 2013; 8:e81302.
148. McDonald CM, Campbell C, Torricelli RE, Finkel RS, Flanigan KM, Goemans N, Heydemann P, Kaminska A, Kirschner J, Muntoni F, et al. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390(10101):1489-1498
149. 1,2,4-oxadiazole benzoic acid compounds and their use for nonsense suppression and the treatment of disease [patent]. Dostępny na stronie [www: http://www.google.com/patents/US6992096](http://www.google.com/patents/US6992096)
150. Salian S, Matt T, Akbergenov R, Harish S, Meyer M, Duscha S, Shcherbakov D, Bernet BB, Vasella A, Westhof E, et al. Structure-Activity Relationships among the Kanamycin Aminoglycosides: Role of Ring I Hydroxyl and Amino Groups. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:6104–8.
151. Zilberberg A, Lahav L, Rosin-Arbesfeld R. Restoration of APC gene function in colorectal cancer cells by aminoglycoside- and macrolide-induced read-through of premature termination codons. *Gut* 2010; 59:496–507.
152. Caspi M, Firsow A, Rajkumar R, Skalka N, Moshkovitz I, Munitz A, Pasmanik-Chor M, Greif H, Megido D, Kariv R, et al. A flow cytometry-based reporter assay identifies macrolide antibiotics as nonsense mutation read-through agents. *J Mol Med* 2015; 94:469–82.
153. Osman EY, Iii W, W C, Simon ME, Megiddo D, Greif DH, Lorson CL. Analysis of Azithromycin Monohydrate as a Single or a Combinatorial Therapy in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy. *J Neuromuscul Dis* 2017; Preprint:1–13.
154. Thompson J, Pratt CA, Dahlberg AE. Effects of a Number of Classes of 50S Inhibitors on Stop Codon Readthrough during Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4889–91.
155. Mutyam V, Du M, Xue X, Keeling KM, White EL, Bostwick JR, Rasmussen L, Liu B, Mazur M, Hong JS, et al. Discovery of Clinically Approved Agents That Promote Suppression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Nonsense Mutations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 194:1092–103.
156. Welch EM, Wang W, Peltz SW. 11 Translation Termination: It's Not the End of the Story. *Cold Spring Harb Monogr Arch* 2000; 39:467–85.

157. Kubo I, Kim M, Hood WF, Naoki H. Clitocine, a new insecticidal nucleoside from the mushroom *clitocybe inversa*. *Tetrahedron Lett* 1986; 27:4277–80.
158. Friesen WJ, Trotta CR, Tomizawa Y, Zhuo J, Johnson B, Sierra J, Roy B, Weetall M, Hedrick J, Sheedy J, et al. The nucleoside analog clitocine is a potent and efficacious readthrough agent. *RNA N Y N* 2017; 23:567–77.
159. Miller JN, Pearce DA. Nonsense-mediated decay in genetic disease: friend or foe? *Mutat Res Rev Mutat Res* 2014; 762:52–64.
160. Baker SL, Hogg JR. A system for coordinated analysis of translational readthrough and nonsense-mediated mRNA decay. *PLOS ONE* 2017; 12:e0173980.
161. Usuki F, Yamashita A, Kashima I, Higuchi I, Osame M, Ohno S. Specific inhibition of nonsense-mediated mRNA decay components, SMG-1 or Upf1, rescues the phenotype of Ullrich disease fibroblasts. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2006; 14:351–60.
162. Gonzalez-Hilarion S, Beghyn T, Jia J, Debreuck N, Berte G, Mamchaoui K, Mouly V, Gruenert DC, Déprez B, Lejeune F. Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7:58.
163. Atanasova VS, Jiang Q, Prisco M, Gruber C, Piñón Hofbauer J, Chen M, Has C, Bruckner-Tuderman L, McGrath JA, Uitto J, et al. Amlexanox enhances premature termination codon read-through in COL7A1 and expression of full length type VII collagen: potential therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*
164. Pifferi M, Di Cicco M, Piras M, Cangiotti AM, Saggese G. Up to date on primary ciliary dyskinesia in children. *Early Hum Dev* 2013; 89 Suppl 3:S45-48.
165. Kurkowiak M, Ziętkiewicz E, Witt M. Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics. *J Med Genet* 2015; 52:1–9.
166. Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, Knowles MR, Zariwala MA. Clinical and Genetic Aspects of Primary Ciliary Dyskinesia / Kartagener Syndrome. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2009; 11:473–87.
167. Satir P, Christensen ST. Structure and function of mammalian cilia. *Histochem Cell Biol* 2008; 129:687–93.
168. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol* 2009; 187:921–33.
169. Bukowy Z, Ziętkiewicz E, Witt M. In vitro culturing of ciliary respiratory cells--a model for studies of genetic diseases. *J Appl Genet* 2011; 52:39–51.
170. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli M-PF, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, Escribano A, Lucas JSA, Yiallourous P, Omran H, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *Eur Respir J* 2010; 36:1248–58.

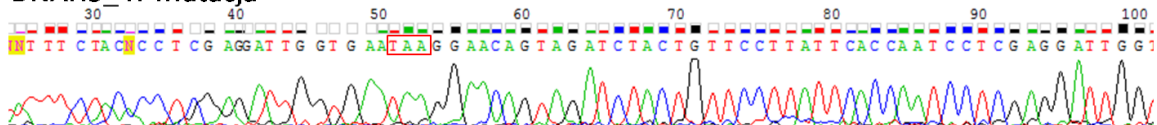
171. Grentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, Gestaland RF, Atkins JF. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA* 1998; 4:479–486.
172. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 2015; 82:518–29.
173. Jorissen M, Bessems A. Normal Ciliary Beat Frequency after Ciliogenesis in Nasal Epithelial Cells Cultured Sequentially as Monolayer and in Suspension. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995; 115:66–70.
174. Jorissen M, Van der Schueren B, Tyberghein J, Van der Berghe H, Cassiman JJ. Ciliogenesis and coordinated ciliary beating in human nasal epithelial cells cultured in vitro. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1988; 43:67–73.
175. de Jong PM, van Sterkenburg MA, Hesseling SC, Kempenaar JA, Mulder AA, Mommaas AM, Dijkman JH, Ponc M. Ciliogenesis in human bronchial epithelial cells cultured at the air-liquid interface. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:271–7.
176. Fulcher ML, Gabriel S, Burns KA, Yankaskas JR, Randell SH. Well-differentiated human airway epithelial cell cultures. *Methods Mol Med* 2005; 107:183–206.
177. Sisson JH, Stoner JA, Ammons BA, Wyatt TA. All-digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. *J Microsc* 2003; 211:103–11.
178. Curtis LN, Carson JL, Collier AM, Gambling TM, Hu SS, Leigh MW, Boat TF. Features of Developing Ferret Tracheal Epithelium: Ultrastructural Observations of in Vivo and in Vitro Differentiation of Ciliated Cells. *Exp Lung Res* 1987; 13:223–40.
179. Castillon N, Hinnrasky J, Zahm J-M, Kaplan H, Bonnet N, Corlieu P, Klossek J-M, Taouil K, Avril-Delplanque A, Péault B, et al. Polarized expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and associated epithelial proteins during the regeneration of human airway surface epithelium in three-dimensional culture. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2002; 82:989–98.
180. Forbes B, Shah A, Martin GP, Lansley AB. The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport. *Int J Pharm* 2003; 257:161–7.
181. Nudelman I, Glikin D, Smolkin B, Hainrichson M, Belakhov V, Baasov T. Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations. *Bioorg Med Chem* 2010; 18:3735–46.
182. Popescu AC, Sidorova E, Zhang G, Eubanks JH. Aminoglycoside-mediated partial suppression of MECP2 nonsense mutations responsible for Rett syndrome in vitro. *J Neurosci Res* 2010; 88:2316–24.
183. Allamand V, Bidou L, Arakawa M, Floquet C, Shiozuka M, Paturneau-Jouas M, Gartioux C, Butler-Browne GS, Mouly V, Rousset J-P, et al. Drug-induced readthrough of premature stop codons leads to the stabilization of laminin alpha2 chain mRNA in CMD myotubes. *J Gene Med* 2008; 10:217–24.

184. Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li P, Thompson JN, Bedwell DM. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Genet* 2001; 10:291–9.
185. Sánchez-Alcudia R, Pérez B, Ugarte M, Desviat LR. Feasibility of nonsense mutation readthrough as a novel therapeutical approach in propionic acidemia. *Hum Mutat* 2012; 33:973–80.
186. Nagel-Wolfrum K, Möller F, Penner I, Baasov T, Wolfrum U. Targeting Nonsense Mutations in Diseases with Translational Read-Through-Inducing Drugs (TRIDs). *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* 2016; 30:49–74.
187. Keeling KM, Xue X, Gunn G, Bedwell DM. Therapeutics based on stop codon readthrough. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2014; 15:371–94.
188. Beznosková P, Gunišová S, Valášek LS. Rules of UGA-N decoding by near-cognate tRNAs and analysis of readthrough on short uORFs in yeast. *RNA* 2016; 22(3); 456-66.
189. De Broe ME, Paulus GJ, Verpooten GA, Roels F, Buyssens N, Wedeen R, Van Hoof F, Tulkens PM. Early effects of gentamicin, tobramycin, and amikacin on the human kidney. *Kidney Int* 1984; 25:643–52.
190. Kacew S, Bergeron MG. Pathogenic factors in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 1990; 51:241-259; 237-239.
191. Rothen-Rutishauser B, Blank F, Mühlfeld C, Gehr P. In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4:1075–89.
192. Azzopardi D, Haswell LE, Foss-Smith G, Hewitt K, Asquith N, Corke S, Phillips G. Evaluation of an air–liquid interface cell culture model for studies on the inflammatory and cytotoxic responses to tobacco smoke aerosols. *Toxicol In Vitro* 2015; 29:1720–8.
193. Sirtori CR. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol Res* 2001; 44:183–93.
194. Steyger PS. Cellular Uptake of Aminoglycosides. *Volta Rev Wash* 2005; 105:299–324.
195. Christensen EI, Birn H, Storm T, Weyer K, Nielsen R. Endocytic receptors in the renal proximal tubule. *Physiol Bethesda Md* 2012; 27:223–36.
196. Marcotti W, van Netten SM, Kros CJ. The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *J Physiol* 2005; 567:505–21.
197. Lee J-H, Park C, Kim S-J, Kim H-J, Oh G-S, Shen A, So H-S, Park R. Different uptake of gentamicin through TRPV1 and TRPV4 channels determines cochlear hair cell vulnerability. *Exp Mol Med* 2013; 45:e12.

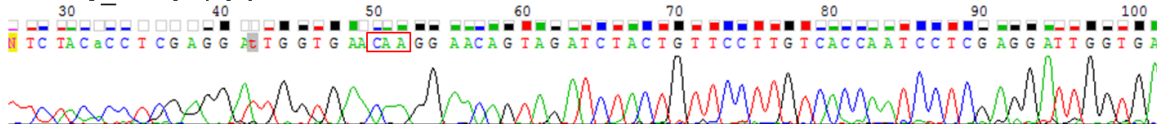
198. Stepanyan RS, Indzhukulian AA, Vélez-Ortega AC, Boger ET, Steyger PS, Friedman TB, Frolenkov GI. TRPA1-mediated accumulation of aminoglycosides in mouse cochlear outer hair cells. *J Assoc Res Otolaryngol JARO* 2011; 12:729–40.
199. Wang T, Yang Y, Karasawa T, Wang Q, Phillips A, Guan B-C, Ma K-T, Jiang M, Xie D-H, Steyger PS, et al. Bumetanide hyperpolarizes Madin-Darby canine kidney cells and enhances cellular gentamicin uptake via elevating cytosolic Ca²⁺ thus facilitating intermediate conductance Ca²⁺-activated potassium channels. *Cell Biochem Biophys* 2013; 65:381–98.
200. Feng YX, Copeland TD, Oroszlan S, Rein A, Levin JG. Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:8860–3.
201. Zerfass K, Beier H. The leaky UGA termination codon of tobacco rattle virus RNA is suppressed by tobacco chloroplast and cytoplasmic tRNAs(Trp) with CmCA anticodon. *EMBO J* 1992; 11:4167–73.
202. Urban C. UGA suppression by tRNA^{CmCATrp} occurs in diverse virus RNAs due to a limited influence of the codon context. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:3424–30.
203. Nilsson M, Rydén-Aulin M. Glutamine is incorporated at the nonsense codons UAG and UAA in a suppressor-free *Escherichia coli* strain. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1627:1–6.
204. Blanchet S, Cornu D, Argentini M, Namy O. New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2014; 42:10061–72.
205. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 2015; 31:2745–7.
206. Finn RD, Attwood TK, Babbitt PC, Bateman A, Bork P, Bridge AJ, Chang H-Y, Dosztányi Z, El-Gebali S, Fraser M, et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res* 2017; 45:D190–9.
207. Mattis VB, Rai R, Wang J, Chang C-WT, Coady T, Lorson CL. Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts. *Hum Genet* 2006; 120:589–601.
208. Goldmann T, Overlack N, Möller F, Belakhov V, van Wyk M, Baasov T, Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K. A comparative evaluation of NB30, NB54 and PTC124 in translational read-through efficacy for treatment of an USH1C nonsense mutation: Comparison of read-through drugs. *EMBO Mol Med* 2012; 4:1186–99.
209. Mattis VB, Tom Chang C-W, Lorson CL. Analysis of a read-through promoting compound in a severe mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurosci Lett* 2012; 525:72–5.

9. MATERIAŁY DODATKOWE

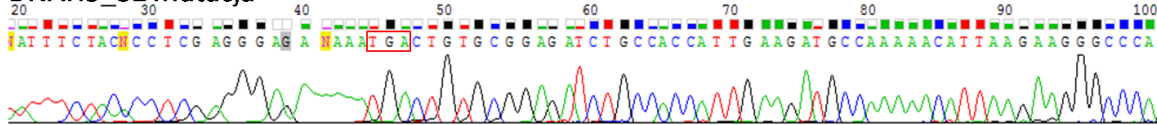
DNAH5_47 Mutacja



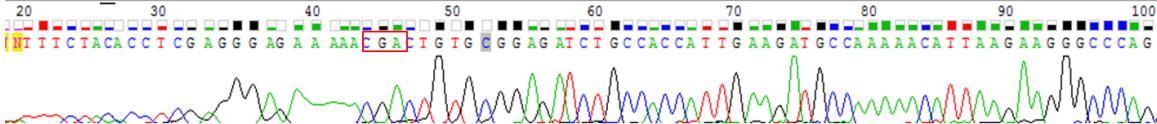
DNAH5_47 Kontrola



DNAH5_32 Mutacja

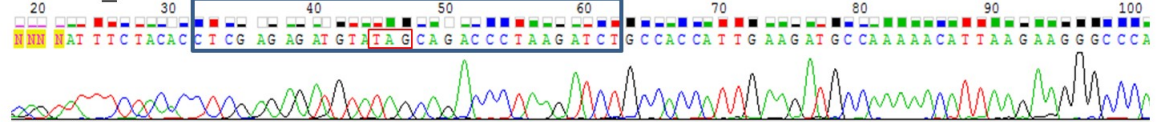


DNAH5_32 Kontrola

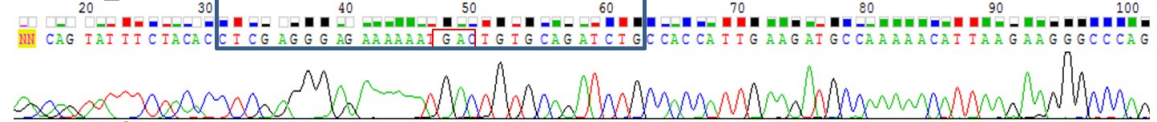


Rycina uzupełniająca 1. Przykładowe wyniki sekwencjonowania konstruktów ze wstawkami wytworzonymi metodą PCR. Sekwencjonowano zarówno wstawki z mutacją PTC jak i wstawki kontrolne z sekwencją typu dzikiego. Sekwencjonowano w obu kierunkach *Forward* i *Reverse* (tu pokazano jedynie *Forward*).

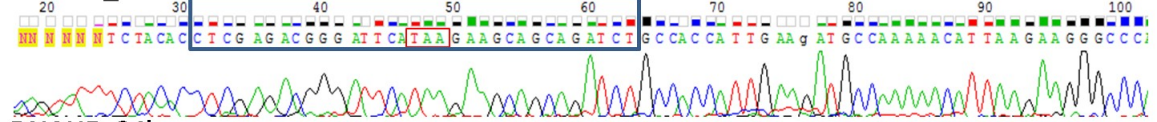
DNAH5_20



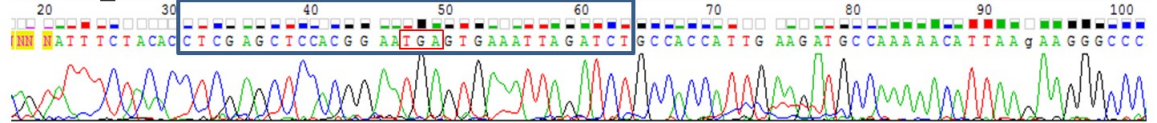
DNAH5_32



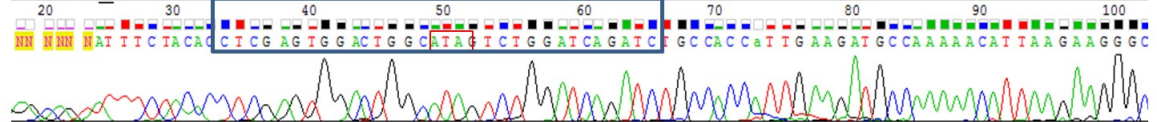
DNAH5_34a



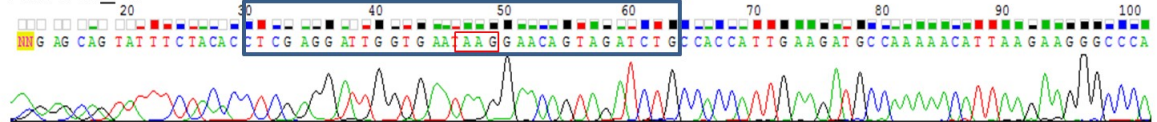
DNAH5_34b



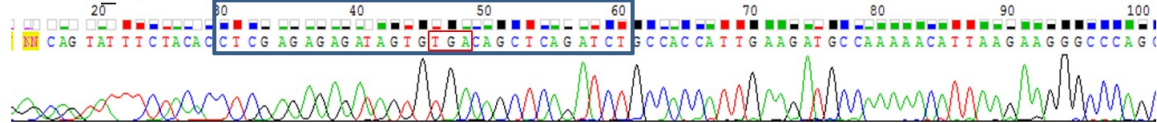
DNAH5_37



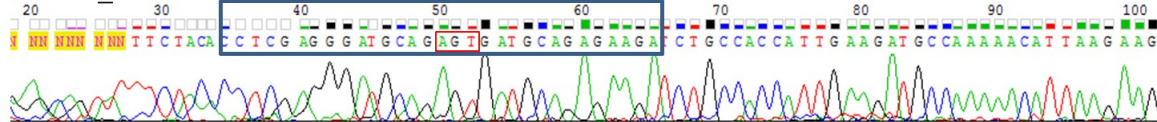
DNAH5_47



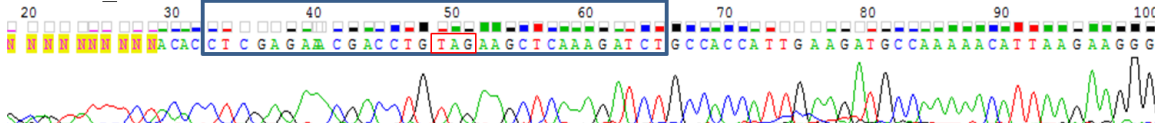
DNAH5_49



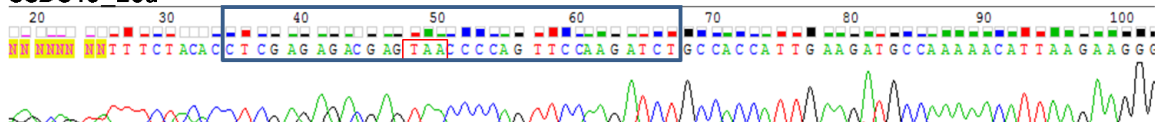
DNAH5_62



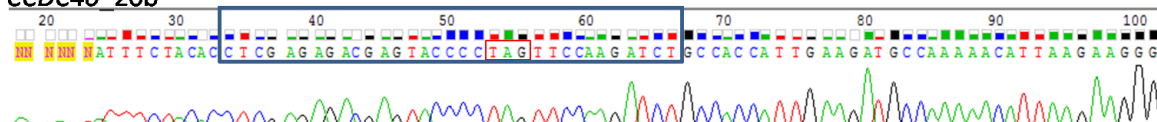
CCDC40_15

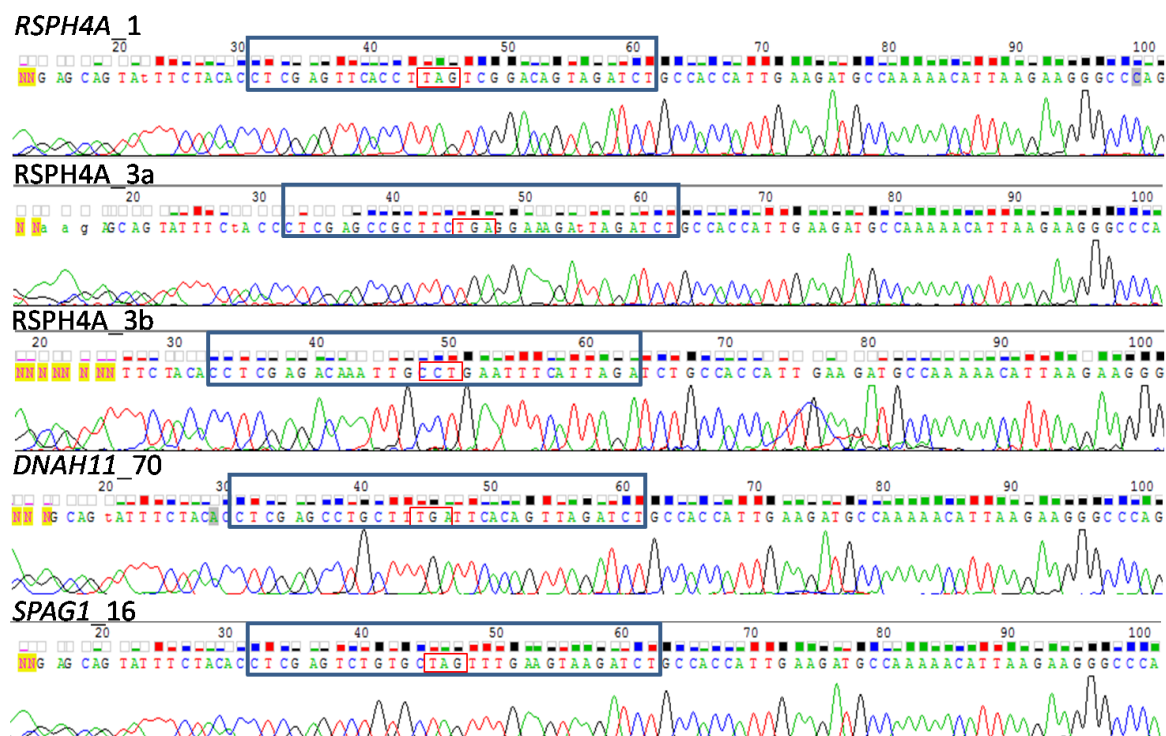


CCDC40_20a



CCDC40_20b





Rycina uzupełniająca 2. Przykładowe wyniki sekwencjonowania konstruktów ze wstawkami wytworzonymi metodą syntezy chemicznej oligonukleotydów. Sekwencjonowano zarówno wstawki z mutacją PTC jak i wstawki kontrolne z sekwencją typu dzikiego. Sekwencjonowano w obu kierunkach *Forward* i *Reverse* (tu pokazano jedynie wstawki zawierające PTC, sekwencjonowanie w kierunku *Forward*).

Tabela uzupełniająca 1. Pożywki do hodowli komórek linii HEK293

POŻYWKA ZWYKŁA	
Odczynnik	Końcowe stężenie
DMEM	500 ml
FBS (Sigma)	10%
NEAA (aminokwasy)	1%
Glutamax	1%
Pen-strep	1%

POŻYWKA BEZ ANTYBIOTYKU	
Odczynnik	Końcowe stężenie
DMEM	500 ml
NEAA (aminokwasy)	1%
FBS	10%
Glutamax	1%

Tabela uzupełniająca 2. Pożywki do hodowli komórek pierwotnych nabłonka oddechowego metodą ALI.

BEGM		ALI MEDIUM	
Odczynnik	Końcowe stężenie	Odczynnik	Końcowe stężenie
BEBM	50 ml	BEBM	1/2 objętości
Suplementy Single-Quots	wg. Instrukcji producenta	Suplementy Single-Quots	Stężenie hEGF zmniejszone do 1/5.
Pen-strep	2%	DMEM	1/2 objętości
Nystatin	0,20%	Pen-strep	2%
		Nystatin	0,20%
		Retinol	100 nM

Tabela uzupełniająca 3. Pożywki do hodowli bakterii *E.coli*

POŻYWKA HODOWLANA		POŻYWKA BEZ ANTYBIOTYKU		POŻYWKA SOC	
Odczynnik	Końcowe stężenie	Odczynnik	Końcowe stężenie	Odczynnik	Końcowe stężenie
Ekstrakt drożdżowy	0,5%	Ekstrakt drożdżowy	0,5%	Ekstrakt drożdżowy	0,5%
Trypton	1%	Trypton	1%	Trypton	2%
NaCl	1%	NaCl	1%	NaCl	0,05%
Karbenicylina	0.1%	woda destylowana		KCl	0,05%
woda destylowana			pH 7.0	woda redestylowana	
	pH 7.0				pH 7.0

Tabela uzupełniająca 4. Pożywki do hodowli sekwencyjnej komórek pierwotnych nabłonka oddechowego.

WASH MEDIUM		ADH MEDIUM		SUSP MEDIUM	
Odczynnik	Końcowe stężenie	Odczynnik	Końcowe stężenie	Odczynnik	Końcowe stężenie
DMEM/F12	500 ml	DMEM/F12	500 ml	DMEM/F12	500 ml
Pen-strep	2%	Ultroser G – rozpuszczony	2%	NuSerum IV	10%
		Pen-strep	2%	Pen-strep	2%
Nystatyna	0,2%	Nystatyna	0,2%	Nystatyna	0,2%

Tabela uzupełniająca 5. Sekwencje starterów i oligonukleotydów wykorzystywanych w badaniach.

Startery seria 1	
Nazwa	Sekwencja
DNAH5_32F_M	agtggactcgagGTACTTGGAGAAAAAATGACTGTG
DNAH5_32R_M	gaacggcaagcttACGAAGAAAAACCGAGGAAAG
DNAH5_47F_M	gtgtgctcgagtGCTGTGCTATTAATTGGTGAATAAG
DNAH5_47R_M	gcgcggaagcttAATCCTTTAATTATTACTGTTTTGGCTG
DNAH5_49F_M	gatgtactcgaggGTTACGAATGAGATAGTGTGACAG
DNAH5_49R_M	gacctgcaagcttTTCTCTAGATTATAGAATCCATTTTGTTC
Startery seria 2 (zmienione miejsce restrykcyjne z HindIII na BglII)	
DNAH5_32F_2M	agtggactcgagGTACTTGGAGAAAAAATGACTGTG
DNAH5_32R_2M	gaagcccagatctACGAAGAAAAACCGAGGAAAG
DNAH5_32F_2K	agtggactcgagGTACTTGGAGAAAAAACGACTGTG
DNAH5_32R_2K	gaagcccagatctACGAAGAAAAACCGAGGAAAG
DNAH5_47F_2M	gtgtgctcgagtGCTGTGCTATTAATTGGTGAATAAG
DNAH5_47R_2M	gcgcggagatctAATCCTTTAATTATTACTGTTTTGGCTG
DNAH5_47F_2K	gtgtgctcgagtGCTGTGCTATTAATTGGTGAACAAG
DNAH5_47R_2K	gcgcggagatctAATCCTTTAATTATTACTGTTTTGGCTG
Startery do sekwencjonowania konstrukтів	
Nazwa	Sekwencja
pDluc-F	GGGTAAGTACATCAAGAGCTTC
pDluc-R	GCCCAGCGCCATTCTACCC
Oligonukleotydy Seria 1	
Nazwa	Sekwencja
DNAH5_32F_M	tcgagGGAGAAAAAATGACTGTGCgg
DNAH5_32R_M	agcttccGCACAGTCATTTTTTCTCC
DNAH5_47F_M	tcgaggATTGGTGAATAAGGAACAGg
DNAH5_47R_M	agcttcCTGTTCTTATTACCAATc
DNAH5_49F_M	tcgagcAATGAGATAGTGTGACAGtt
DNAH5_49R_M	agcttaaCTGTCACACTATCTCATTg
DNAH5_32F_K	tcgagGGAGAAAAAACGACTGTGCgg
DNAH5_32R_K	agcttccGCACAGTCGTTTTTCTCC

Seria 2 (zmienione miejsce restrykcyjne z HindIII na BglII)	
DNAH5_20F_2M	tcgagAGATGTATAGCAGACCCTaa
DNAH5_20R_2M	gatcttAGGGTCTGCTATACATCTc
DNAH5_20F_2K	tcgagAGATGTACAGCAGACCCTaa
DNAH5_20R_2K	gatcttAGGGTCTGCTGTACATCTc
DNAH5_32F_2M	tcgagGGAGAAAAAATGACTGTGCa
DNAH5_32R_2M	gatctGCACAGTCATTTTTTCTCCc
DNAH5_32F_2K	tcgagGGAGAAAAAACGACTGTGCa
DNAH5_32R_2K	gatctGCACAGTCGTTTTTCTCCc
DNAH5_34Fa_2M	tcgagGGGATTCATAAGAAGCagca
DNAH5_34Ra_2M	gatctgctGCTTCTTATGAATCCCCc
DNAH5_34Fa_2K	tcgagGGGATTCAGAAGAAGCagca
DNAH5_34Ra_2K	gatctgctGCTTCTTCTGAATCCCCc
DNAH5_34Fb_2M	tcgagCCACGGAATGAGTGAAATta
DNAH5_34Rb_2M	gatctAATTTCACTCATTCCGTGGc
DNAH5_34Fb_2K	tcgagCCACGGAACGAGTGAAATta
DNAH5_34Rb_2K	gatctAATTTCACTCGTTCCGTGGc
DNAH5_37F_2M	tcgagGACTGGCATAAGTCTGGATCa
DNAH5_37R_2M	gatctGATCCAGACTATGCCAGTCc
DNAH5_37F_2K	tcgagGACTGGCACAGTCTGGATCa
DNAH5_37R_2K	gatctGATCCAGACTGTGCCAGTCc
DNAH55_47F_2M	tcgagATTGGTGAATAAGGAACAGa
DNAH5_47R_2M	gatctCTGTTTCCTTATTCACCAATc
DNAH5_47F_2K	tcgagATTGGTGAACAAGGAACAGa
DNAH5_47R_2K	gatctCTGTTTCCTTGTTACCAATc
DNAH5_49F_2M	tcgagAGAGATAGTGTGACAGCTca
DNAH5_49R_2M	gatctgAGCTGTCACACTATCTCTc
DNAH5_49F_2K	tcgagAGAGATAGTGCGACAGCTca
DNAH5_49R_2K	gatctgAGCTGTCGCACTATCTCTc
DNAH5_55F_2M	tcgagCTGGTTCAGCTGATGGCCCCa
DNAH5_55R_2M	gatctGGGCCATCAGCTGAACCAGc
DNAH5_55F_2K	tcgagCTGGTTCAGCCGATGGCCCCa
DNAH5_55R_2K	gatctGGGCCATCGGCTGAACCAGc
DNAH5_62F_2M	tcgaggGCAGAGTGATGCAGAagga

DNAH5_62R_2M	gatctcctTCTGCATCACTCTGCcc
DNAH5_62F_2K	tcgaggGCAGAGCGATGCAGAagga
DNAH5_62R_2K	gatctcctTCTGCATCGCTCTGCcc
RSPH4A_1F_2M	tcgagttCACCTTAGTCGGACAGta
RSPH4A_1R_2M	gatctaCTGTCCGACTAAGGTGaac
RSPH4A_1F_2K	tcgagttCACCTCAGTCGGACAGta
RSPH4A_1R_2K	gatctaCTGTCCGACTGAGGTGaac
RSPH4A_3Fa_2M	tcgagcCGCTTCTGAGGAAAGATta
RSPH4A_3Ra_2M	gatctAATCTTTCCCTCAGAAGCGgc
RSPH4A_3Fa_2K	tcgagcCGCTTCTGGGGAAAGATta
RSPH4A_3Ra_2K	gatctAATCTTTCCCCAGAAGCGgc
RSPH4A_3Fb_2M	tctcgaATTGCCTGAATTTCAaaga
RSPH4A_3Rb_2M	gatctcttTGAAATTCAGGCAATac
RSPH4A_3Fb_2K	tctcgaATTGCCCGAATTTCAaaga
RSPH4A_3Rb_2K	gatctcttTGAAATTCGGGCAATac
SPAG1_16F_2M	tcgagtCTGTGCTAGTTTGAAGtaa
SPAG1_16R_2M	gatcttaCTTCAAACCTAGCACAGac
SPAG1_16F_2K	tcgagtCTGTGCCAGTTTGAAGtaa
SPAG1_16R_2K	gatcttaCTTCAAACCTGGCACAGac
DNAH11_70F_2M	tcgagcCTGCTTTGATTACAGTTa
DNAH11_70R_2M	gatctAACTGTGAATCAAAGCAGgc
DNAH11_70F_2K	tcgagcCTGCTTCGATTACAGTTa
DNAH11_70R_2K	gatctAACTGTGAATCGAAGCAGgc
CCDC40_15F_2M	tcgagACGACCTGTAGAAGCTCAAa
CCDC40_15R_2M	gatctTTGAGCTTCTACAGGTCGTc
CCDC40_15F_2K	tcgagACGACCTGAAGAAGCTCAAa
CCDC40_15R_2K	gatctTTGAGCTTCTTCAGGTCGTc
CCDC40_20Fa_2M	tcgagACGAGTAACCCCAGTTCCAa
CCDC40_20Ra_2M	gatctTGGAACCTGGGGTACTCGTc
CCDC40_20Fab_2K	tcgagACGAGTACCCCAGTTCCAa
CCDC40_20Rab_2K	gatctTGGAACCTGGGGTACTCGTc
CCDC40_20Fb_2M	tcgagACGAGTACCCCTAGTTCCAa
CCDC40_20Rb_2M	gatctTGGAACCTAGGGGTACTCGTc

Tabela uzupełniająca 6. Wykorzystywany sprzęt laboratoryjny

SPRZĘT LABORATORYJNY	
NAZWA	PRODUCENT
2x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc, Berkeley, USA
Aparat do elektroforezy agarozowej HORIZONTAL CER	Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Warszawa, Polska
Aparat do elektroporacji GenePulser Xcell	Bio-Rad Laboratories, Inc, Berkeley, USA
Czytnik Fujifilm FLA-500 Image Reader	Fujifilm Corporation, Tokjo, Japonia
Ekrany fosforowe	Fujifilm Corporation, Tokjo, Japonia
Inkubator z wytrząsaniem C 160	BINDER GmbH, Tuttlingen, Niemcy
Inkubator z wytrząsaniem KS-15	Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Niemcy
Komora do liczenia komórek Neubauera	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Niemcy
Komora laminarna HERAsafe	Heraeus, Hannau, Niemcy
Luminometr płytkowy Glo Max Multi	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Łaźnia wodna MLL 547	AJL electronics, Kraków, Polska
Mikropipety	HTL, Warszawa, Polska
Mikroskop Axio Observer Z1	Zeiss, Jena, Niemcy
Mikroskop IX81	Olympus, Japonia
Mini-PROTEAN® Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories, Inc, Berkeley, USA
Nanodrop	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Palnik Bunsena LABOGAZ 300/470	Witko, Warszawa, Polska
Pipetor SWIFTPET	HTL, Warszawa, Polska
Suszarka próżniowa do żeli GD5040	KAWA SKA, Piaseczno, Polska
System do transfekcji Neon	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Termocykler Peltier PTC-200	MJ Research, San Francisco, USA
Termomikser Comfort	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Wirówka stołowa Espresso	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Wirówka Sorvall	Sorvall, ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA

Wirówka universal 320R z chłodzeniem	Hettich Lab Technology, Niemcy
Woltomierz Evom2	World Precision Instruments, USA
Wirówka universal 5417r z chłodzeniem	Eppendorf, Hamburg, Niemcy
Worteks Fine vortex	FinePCR, Gyeonggi-do, Korea
Zasilacz do elektroforezy e132	Consort, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA

Tabela uzupełniająca 7. Żele poliakrylamidowe i agarozowe oraz bufony stosowane w trakcie badań

ŻELE AGAROWE I POLIAKRYLOAMIDOWE ORAZ BUFORY
Żel agarozowy do rozdzielania produktów PCR i produktów ich trawienia restrykcyjnego
3% agaroz w buforze 1x TBE
1 ul barwnika GelRed
Rozdział prowadzony przy napięciu 100V
Żel agarozowy do rozdzielania produktów trawienia restrykcyjnego (plazmid)
0.8% agaroz w buforze TBE
1 ul barwnika GelRed
Rozdział prowadzony przy napięciu 100V
10x bufor do elektroforezy agarozowej TBE
89 mM Tris
89 mM Kwas bory
2 mM EDTA
Roztwór poliakrylamidu 40%
38.9 g akrylamidu
1.1 g bis-akrylamid
Rozpuszczone w 100 ml wody
10x bufor do SDS-PAGE (pH 8,3)
25mM Tris
192mM glicyna

0,1% SDS
Bufor do dolnego żelu SDS-PAGE
1.5 M Tris pH 8.8
0,4% SDS
Bufor do górnego żelu SDS-PAGE
0,5 M Tris pH 6.8
0,4% SDS
Żel SDS-PAGE
Żel dolny (12%)
3 ml buforu do dolnego żelu SDS-PAGE
3,6 ml roztworu poliakryloamidu 40%
120 ul 10% SDS
12 ul TEMED
120 ul APS
Żel górny (4%)
375 ul buforu do górnego żelu SDS-PAGE
300 ul roztworu poliakryloamidu 40%
30 ul 10% SDS
3 ul TEMED
30 ul APS
Roztwór Coomassie do barwienia białek
50% metanol
10% kwas octowy
0,25% Coomassie® Blue R-250
4% PF do utrwalania preparatów do immunofluorescencji (pH 6,9)
800 ml PBS
40 g PF
Bufor TE (pH 8.0)
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
Bufor do dupleksowania (pH 7,9)
400 mM Tris-HCl
500 mM NaCl
100 mM MgCl ₂

Tabela uzupełniająca 8. Wykorzystywane komercyjne zestawy odczynników.

KOMERCYJNE ZESTAWY ODCZYNNIKÓW	
NAZWA	PRODUCENT
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison, Wisconsin, USA
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	Promega, Madison, Wisconsin, USA
TnT® Coupled Transcription/Translation System	Promega, Madison, Wisconsin, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Venlo, Holandia
QIAGEN Plasmid Isolation Kit (Midi, Maxi)	QIAGEN, Venlo, Holandia

Tabela uzupełniająca 9. Spis dostawców usług zewnętrznych.

USŁUGI ZEWNĘTRZNE	
NAZWA	FIRMA
Mikroskopia elektronowa SEM	Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii, Poznań
Sekwencjonowanie DNA	Wydziałowej Pracownia Sekwencjonowania, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Suszenie próbek w punkcie krytycznym	Wydziałowa Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Synteza oligonukleotydów i starterów do reakcji PCR	GENOMED, Warszawa

Tabela uzupełniająca 10. Spis używanych odczynników.

ODCZYNNIKI	
NAZWA	PRODUCENT
1x <i>Passive Lysis Buffer</i>	Promega, Madison, Wisconsin, USA
4x SDS-PAGE <i>Loading Buffer</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc, Berkeley, USA
Agar mikrobiologiczny	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Agaroza	Lonza Group, Bazylea Szwajcaria
Akryloamid	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Amikacyna	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Amleksanoks	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Antybiotyki do hodowli komórkowych (Pen-Strep)	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
APS	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Azytromycyna	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
BEGM Basal Medium 500 ml	Lonza Group, Bazylea Szwajcaria
BEGM Single Quot kit	Lonza Group, Bazylea Szwajcaria
Bis-akryloamid	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Bufor do enzymów restrykcyjnych R	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Bufor do reakcji PCR	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Bufor obciążający (<i>Loading Dye 6x</i>)	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Bufor PNK A	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Bufor PNK B	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Chlorek amonu NH_4Cl	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Chlorek magnezu (MgCl_2)	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Chlorek Potasu (KCl)	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Chlorek Sodiu (NaCl)	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
<i>Coomassie® Blue R-250</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Cytrynian potasu	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
DMEM (ang. <i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)	Lonza Group, Bazylea Szwajcaria

DMEM/F12 (1:1)	Lonza Group, Bazylea Szwajcaria
DMSO	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
EDTA (kwas wersenowy)	Serva, Heidelberg, Niemcy
Ekstrakt drożdżowy	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Enzym restrykcyjny BglII	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Enzym restrykcyjny HindIII	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Enzym restrykcyjny XhoI	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Escyna	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Etanol 99,8%	PoCh S.A., Gliwice, Polska
FBS (ang. fetal bovine serum; bydlęca surowica płodowa)	Lonza Group, Bazylea Szwajcaria
FCS (ang. fetal calf serum; płodowa surowica cielęca)	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
G418	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
<i>GelRed Nucleic Acid Gel Stain</i>	Biotium, USA
Gentamycyna	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Glicerol	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Glukoza	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
GlutaMAX	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Glutaraldehyd (<i>grade II</i> , 25% w H ₂ O)	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Goat serum	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
HBSS	Lonza Group, Bazylea Szwajcaria
Izopropanol	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Ampicylina	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Kinaza PNK, bufor PNK A i bufor PNK B	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Kolagenaza typu IV	Worthington Biochemical Corp., Wielka Brytania
Kwas borny	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Kwas octowy	PoCh S.A., Gliwice, Polska
Marker wielkości DNA 50 bp	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Medium zamykające <i>Faramount Aqueous Mounting Medium</i>	Dako, USA

Metanol 99,8%	PoCh S.A., Gliwice, Polska
Mleko w proszku	Carl Roth GmbH, Niemcy
NEAA (ang. <i>Non-Essential Amino Acids</i>)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Nukleotydy dNTP Mix 10 mM	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Nu-Serum IV	Beckton Dickinson, USA
Nystatyna	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Octan potasu	Serva, Heidelberg, Niemcy
Paromomycyna	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
PBS roztwór do hodowli komórkowych	GIBCO Invitrogen corporation, USA
PBS tabletki	GIBCO Invitrogen corporation, USA
PF (ang. <i>Paraformaldehyde</i> ; Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Pożywka RPMI	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Synteraza starterów	Genomed, Warszawa, Polska
Proteaza ze <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
PTC124 (Ataluren)	Selleck Chemicals, Niemcy
PureCol 100 ml	Nutacon
Retinol 100 mg	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
RNAsin	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Roztwór akryloamid:bis-akryloamid 29:1	Bio-Rad Laboratories, Inc, Berkeley, USA
Roztwór DAPI	Cytocell, Cambridge, Wielka Brytania
SDS	Serva, Heidelberg, Niemcy
<i>Standard białkowy Precision Plus</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc, Berkeley, USA
TEMED	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Trypsin, 0.25% (1x) with EDTA	GIBCO Invitrogen corporation, USA
Trypton	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Niemcy
Tylozyna	Sigma-Aldrich. St-Louis, USA
Ultrosor G	Pall Life Sciences, USA
Wodorotlenek sodu (NaOH)	Serva, Heidelberg, Niemcy
Metionina znakowana radioaktywnie [35S]	Hartmann Analytic GmbH, Niemcy

Finansowanie badań zawartych w pracy:

Badania zostały sfinansowane z dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki: OPUS (*Analiza wpływu wybranych związków chemicznych na translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP (PTC readthrough) w genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek*; 2011/01/B/NZ4/04840) i PRELUDIUM (*Translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP (PTC readthrough) w genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek- stymulacja związkami nie-aminoglikozydowymi jako alternatywa dla antybiotyków aminoglikozydowych*; 2016/23/N/NZ4/03228) (kierownik: mgr Dąbrowski).

Mgr Dąbrowski był również wykonawcą dwóch blisko powiązanych tematycznie grantów NCN: OPUS (*Cało-eksomowe sekwencjonowanie w polskiej populacji chorych w poszukiwaniu genetycznych podstaw pierwotnej dyskinezy rzęsek*; 2014/13/B/NZ2/03858) i SONATA (*Wpływ czynników zewnętrznych na dynamikę różnicowania nabłonka oddechowego w kontekście wykorzystania metod ciliogenezy in vitro w badaniach pierwotnej dyskinezy rzęsek*; nr 2013/09/D/NZ4/01692).

Staż zagraniczny na Uniwersytecie w Southamton w Wielkiej Brytanii został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach stypendium doktorskiego ETIUDA (*Stymulowany związkami chemicznymi translacyjny odczyt przedwczesnych kodonów STOP w wybranych genach zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy rzęsek*; 2016/20/T/NZ4/00525).

Mgr Dąbrowski jest uczestnikiem międzynarodowego programu BEAT-PCD (*Better Experimental Approaches To Treat PCD*), EU COST Action 1407.

