

PRACA DOKTORSKA

**Rola toksyczności RNA w patogenezie ataksji  
rdzeniowo-mózdkowej typu 3**

Grzegorz Figura

Praca wykonana pod opieką promotora  
dr hab. Marty Olejniczak, prof. ICHB PAN

oraz promotora pomocniczego  
dr Magdaleny Jazurek-Ciesiołka

Zakład Biomedycyny Molekularnej  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań 2019

Do powstania tej pracy przyczyniła się nieoceniona pomoc całej rzeszy osób, stąd nie sposób jest wymienić wszystkich z imienia i nazwiska, jeśli więc tutaj o Tobie nie wspomniałem, nie martw się bo i tak o Tobie pamiętam

Chciałbym serdecznie podziękować:

*prof. dr hab. Włodzimierzowi Krzyżosiakowi*

za opiekę, ukierunkowanie zainteresowań naukowych oraz liczne rozmowy będące inspiracją do badań i motywacją do jeszcze cięższej pracy

*dr hab. Marcie Olejniczak, prof. ICHB PAN*

za przyjęcie mnie pod swoją opiekę, niezliczone cenne rady i sugestie oraz zawsze ciepłe słowa otuchy, gdy przychodziły chwile zwątpienia

*dr Magdalenie Jazurek - Ciesiołce*

za nieocenioną pomoc bez której niniejsza praca na pewno by nie powstała, nieustanną opiekę, ukierowanie prac, a także niezbędne wsparcie merytoryczne, eksperymentalne i dobre słowa, które zawsze podnosiły mnie na duchu

*dr Adamowi Ciesiołce*

za pomoc w eksperymentach i bezcenne wsparcie merytoryczne

*Zespołom Zakładów Biomedycyny Molekularnej i Inżynierii Genomowej*

za wszelką pomoc udzielaną w każdej, nawet najbardziej błahej potrzebie

*Mojej rodzinie*

za nieustanne wspieranie mnie w każdej, nawet najcięższej sytuacji, wiem, że zawsze mogę na Was liczyć i nigdy nie mógłbym wymarzyć sobie was jeszcze wspanialszych

*Dziękuję Wam wszystkim!*

<b>1. Wstęp</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Charakterystyka ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu trzeciego</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2 Charakterystyka funkcjonalna ataksyny-3</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Budowa ataksyny-3 i jej lokalizacja w komórce .....	8
1.2.2 Rola ataksyny-3 w ścieżkach degradacji białek.....	10
1.2.2 Rola ataksyny-3 w procesie transkrypcji oraz inne funkcje .....	12
<b>1.3 Mechanizmy patogenezy SCA3</b> .....	<b>13</b>
1.3.1 Rola zmutowanego białka w patogenezie SCA3 .....	13
1.3.1.1 Rola agregatów białkowych w patogenezie SCA3 .....	14
1.3.1.2 Hipoteza toksycznych fragmentów ataksyny-3.....	16
1.3.1.3 Zaburzenia procesu degradacji białek.....	18
1.3.1.4 Dysfunkcja mitochondriów.....	19
1.3.1.5 Deregulacja transkrypcji .....	20
1.3.1.6 Zaburzenie homeostazy jonów wapnia.....	21
1.3.2 Rola zmutowanego RNA w patogenezie SCA3.....	22
1.3.2.1 Tworzenie się skupień jądrowych.....	26
1.3.2.2 Zaburzenia alternatywnego splicingu genów zależnych od MBNL1.....	27
1.3.2.2 Oddziaływanie MID1 z ciągami powtórzeń CAG .....	28
1.3.2.3 Indukcja stresu jąderkowego.....	30
1.3.2.4 Ścieżka interferencji RNA .....	31
1.3.2.5 Przesunięcie ramki odczytu i RAN translacja .....	34
<b>1.4 Modele chorobowe służące do badania patogenezy SCA3, w tym określenia roli RNA</b> .....	<b>35</b>
1.4.1 Modele SCA3 w <i>C. elegans</i> .....	36
1.4.2 Modele SCA3 w <i>D. melanogaster</i> .....	37
1.4.3 Modele SCA3 w <i>M. musculus</i> .....	38
1.4.4 Modele SCA3 w liniach komórkowych.....	41
1.4.5 Modele do badań toksyczności RNA .....	42
<b>2. Cel pracy</b> .....	<b>49</b>
<b>3. Materiały i Metody</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1. Materiały</b> .....	<b>50</b>
3.1.1 Enzymy .....	50
3.1.2 Ważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne.....	50
3.1.3 Przeciwciała .....	52
3.1.4 Zestawy komercyjne .....	52
3.1.5 Roztwory i bufony .....	53
3.1.6 Związki promieniotwórcze .....	56
3.1.7 Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych i białek .....	56

3.1.8 Żele.....	56
3.1.9 Konstrukty genetyczne.....	57
3.1.10 Oligonukleotydy.....	58
3.1.11 Sondy do wizualizacji pojedynczych cząsteczek RNA metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> .....	59
3.1.12 Materiał biologiczny.....	59
3.1.13 Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe.....	60
3.1.14 Programy komputerowe i bazy danych.....	61
<b>3.2 Metody</b> .....	<b>62</b>
3.2.1 Przygotowanie konstruktów genetycznych.....	62
3.2.1.1 Konstrukcja transgenów ataksyny-3 z ciągami 20 CAA, 20 CAG lub 20 CAG z interupcjami CAA.....	62
3.2.1.2 Konstrukcja transgenów ataksyny-3 z ciągami 120 CAA, 120 CAG lub 120 CAG z interupcjami CAA.....	63
3.2.1.3 Konstrukcja transgenów ataksyny-3 nieulegających translacji.....	64
3.2.1.4 Przeklonowanie transgenów ataksyny-33 do wektorów służących do wyprowadzenia stabilnych linii komórkowych.....	65
3.2.1.5 Przygotowanie chemokompetentnych bakterii DH5a.....	67
3.2.1.6 Transformacja bakterii chemokompetentnych metodą szoku termicznego.....	67
3.2.1.7 Sprawdzanie długości ciągu powtórzeń za pomocą kolonijnego PCR.....	67
3.2.1.8 Izolacja plazmidowego DNA i oznaczanie jego stężenia.....	68
3.2.1.9 Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera.....	68
3.2.2 Hodowle komórkowe i transfekcja przejściowa.....	69
3.2.3 Wyprowadzenie stabilnych modeli komórkowych SCA3 za pomocą system Flp-In T-REx...69	
3.2.4 Różnicowanie komórek SH-SY5Y.....	70
3.2.5 Analiza ekspresji wybranych genów.....	71
3.2.5.1 Izolacja RNA i oznaczanie jego stężenia.....	71
3.2.5.2 Synteza cDNA.....	71
3.2.5.3 Standardowy PCR.....	71
3.2.5.4 PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. quantitative PCR).....	73
3.2.6 Analiza RNA metodą Northern blot.....	74
3.2.6.1 Elektroforeza w żelu agarozowym.....	74
3.2.6.2 Transfer mokry.....	75
3.2.6.3 Wyznakowanie i oczyszczanie sondy.....	75
3.2.6.4 Hybrydyzacja.....	76
3.2.6.5 Odczyt sygnału.....	76
3.2.7 Analiza poziomu białka metodą Western blot.....	76
3.2.7.1 Liza komórek i pomiar stężenia białka.....	76

3.2.7.2	Elektroforetyczny rozdział białek w warunkach denaturujących.....	76
3.2.7.3	Transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową.....	77
3.2.7.4	Detekcja białek.....	77
3.2.7.4	Przygotowanie membrany do ponownej detekcji.....	78
3.2.8	Barwienia <i>in situ</i> .....	78
3.2.8.1	Immunofluorescencja.....	78
3.2.8.2	Wizualizacja pojedynczych cząsteczek RNA za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji <i>in situ</i> .....	78
3.2.9	Poszukiwanie markerów toksyczności RNA użyciu sekwencjonowania RNA nowej generacji.....	79
3.2.10	Poszukiwanie markerów toksyczności RNA przy użyciu proteomiki ilościowej.....	80
3.2.11	Obliczenia statystyczne.....	81
<b>4.</b>	<b>Wyniki.....</b>	<b>82</b>
<b>4.1</b>	<b>Przygotowanie konstruktów do wygenerowania stabilnych izogenicznych modeli komórkowych SCA3.....</b>	<b>82</b>
4.1.1	Wydłużenie ciągów powtórzeń trójnukleotydowych metodą SLIP.....	83
4.1.2	Przygotowanie konstruktów z wariantami ataksyny-3 nieulegającymi translacji.....	87
<b>4.2.</b>	<b>Weryfikacja otrzymanych konstruktów w przejściowej transfekcji komórek HEK293T.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3</b>	<b>Wyprowadzenie stabilnych izogenicznych modeli SCA3.....</b>	<b>90</b>
4.3.1	Charakterystyka systemu Flp-In T-Rex.....	90
4.3.2	Wyprowadzenie stabilnych modeli SCA3 w linii komórkowej SH-SY5Y.....	91
<b>4.4</b>	<b>Charakterystyka molekularna stabilnych modeli SCA3.....</b>	<b>94</b>
4.4.1	Określenie czasu po jakim poziom ekspresji transgenu osiąga wysycenie.....	94
4.4.2	Analiza długości transkryptów ataksyny-3 metodą Northern Blot.....	95
4.4.3	Analiza poziomu ekspresji transgenu za pomocą qPCR.....	98
4.4.4	Jakościowa analiza białek powstających z ekspresji transgenu metodą Western Blot.....	100
4.4.5	Analiza znanych markerów patogeny SCA3.....	100
4.4.5.1	Analiza obecności agregatów zmutowanego białka ataksyny-3.....	101
4.4.5.2	Analiza obecności skupień RNA tworzonych przez zmutowaną ataksynę-3.....	103
4.4.5.3	Analiza wpływu ekspresji transgenu na indukcję apoptozy.....	104
4.4.5.4	Analiza wpływu ekspresji transgenu na indukcję stresu retikulum endoplazmatycznego.....	106
<b>4.6</b>	<b>Poszukiwanie nowych markerów toksyczności RNA przy użyciu globalnych analiz transkryptomicznych i proteomicznych.....</b>	<b>108</b>
4.6.1	Poszukiwanie markerów toksyczności RNA za pomocą analiz transkryptomicznych.....	108
4.6.2	Poszukiwanie markerów toksyczności RNA za pomocą analiz proteomicznych.....	123
<b>4.7</b>	<b>Różnicowanie komórek SH-SY5Y.....</b>	<b>133</b>
4.7.1	Opracowanie protokołu do różnicowanie modeli komórkowych SH-SY5Y.....	133

4.7.2 Analiza obecności agregatów zmutowanej ataksyny-3 w zróżnicowanych modelach SCA3 .....	138
4.7.3 Analiza obecności skupień RNA ataksyny-3 w zróżnicowanych modelach SCA3.....	140
<b>5. Dyskusja.....</b>	<b>141</b>
5.1 Wyprowadzenie i charakterystyka stabilnych modeli komórkowych, umożliwiających odróżnienie toksyczności RNA od toksyczności białka w SCA3 .....	141
5.2 Poszukiwanie nowych markerów toksyczności i ścieżek patogenezy RNA przy użyciu globalnych analiz transkryptomicznych i proteomicznych .....	148
5.3 Perspektywy .....	153
<b>6. Streszczenie.....</b>	<b>155</b>
<b>7. Abstract.....</b>	<b>157</b>
<b>8. Bibliografia .....</b>	<b>159</b>

### 1. Wstęp

#### *1.1 Charakterystyka ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu trzeciego*

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu trzeciego (SCA3, ang. spinocerebellar ataxia type 3 – SCA3) należy do dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący chorób neurodegeneracyjnych. SCA3 zalicza się także do grupy chorób poliglutaminowych (poliQ) i jest jedną z najpowszechniej występujących ataksji (Paulson, 2012b). Mutacją odpowiedzialną za SCA3 jest ekspansja powtórzeń CAG w regionie kodującym genu ataksyny-3, kodyjącym ataksynę-3 i znajdującym się na chromosomie 14q32.1 (Takiyama *et al.*, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1994; Paulson *et al.*, 2017). Objawy kliniczne SCA3 mają charakter progresywny. Głównym objawem jest ataksja będąca wynikiem dysfunkcji mózdku i pnia mózgu. Jednak nigdy nie występuje ona samodzielnie, bowiem obecne są liczne inne objawy odzwierciedlające progresywną dysfunkcję kolejnych obszarów w mózgu: pnia, nerwów okoruchowych, ścieżek piramidowych i pozapiramidowych, neuronów motorycznych i nerwów peryferyjnych (Sequeiros and Coutinho, 1993; Takiyama *et al.*, 1994; Cancel *et al.*, 1995; Sasaki *et al.*, 1995; Dürr *et al.*, 1996; Matsumura *et al.*, 1996; Schöls *et al.*, 1996; Soong *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1998; Friedman, 2002; Lin and Soong, 2002; Rüb, R. A. . de Vos, *et al.*, 2002; Rüb, R. A. I. de Vos, *et al.*, 2002; Rüb *et al.*, 2003; U Rüb *et al.*, 2004; U. Rüb *et al.*, 2004). Najczęściej objawy pojawiają się u młodych dorosłych i w średnim wieku, wśród pierwszych wyróżnia się problemy z utrzymaniem równowagi i chodzeniem. Z czasem pojawiają się problemy z widzeniem: oczopląs, nierówne i niesparowane ruchy oczu, ruchy sakkadowe, porażenie mięśni oka, cofnięcie powieki, wytrzeszcz oczu. W zaawansowanym stadium pacjenci poruszają się na wózku i cierpią na ostrą dyzartię i dysfagię. Ponadto mogą się u nich rozwinąć dystonie, spastyczność i zanik mięśni (Maruff *et al.*, 1996; Zawacki *et al.*, 2002; Kawai *et al.*, 2004). SCA3 wywołuje również objawy niemotoryczne, takie jak zaburzenia kognitywne i psychiczne, dysfunkcja węchu, problemy ze snem, skupieniem uwagi i lekko depresyjny nastrój (Rüb *et al.*, 2008; Klinke *et al.*, 2010; Mendonça *et al.*, 2018). Od pojawienia się pierwszych objawów długość życia pacjentów wynosi 20-25 lat (Klockgether *et al.*, 1998). Objawy kliniczne ataksji są bardzo heterogenne i mogą pojawić się między 5 a 70 rokiem życia. Jest to ściśle związane z różną długością ciągu CAG, a długość ekspansji koreluje odwrotnie z wiekiem, w którym dochodzi do ujawnienia się choroby (Subramony and Currier, 1996; Paulson, 2012b). W SCA3 ma miejsce zjawisko antycypacji genetycznej, polegającej na tym, że przebieg choroby pogarsza się z pokolenia na pokolenie co jest związane z faktem, że

75% ciągów powtórzeń przez swoją niestabilność wydłuża się w następnym pokoleniu, co powoduje pojawienie się objawów o około dziesięć lat wcześniej niż u rodziców (Maciel *et al.*, 1995; Takiyama *et al.*, 1995). Długość ciągu powtórzeń CAG u osób zdrowych wynosi 10-44 natomiast u pacjentów 61-87, gdzie ilość 45-60 jest związana z niepełnymi objawami choroby (Kawaguchi *et al.*, 1994; Maciel *et al.*, 2001; Padiath *et al.*, 2005; Bettencourt and Lima, 2011).

Oprócz licznych objawów klinicznych, SCA3 powoduje też szereg zmian neuropatologicznych. Oznaki neurodegeneracji są rozpowszechnione w wielu obszarach mózgu: mózdzku, pniu mózgu, zwojach podstawy mózgu, niektórych nerwach czaszkowych i rdzeniu kręgowym (Rüb *et al.*, 2008; Scherzed *et al.*, 2012). W szczególności neurodegeneracji ulegają jądro mózdzku, istota czarna, nerwy jąder motorycznych, jądra kolumny Clark'a, wewnętrzny róg rdzenia kręgowego i neurony ruchowe pnia mózgu (Dürr *et al.*, 1996; Rüb *et al.*, 2008). Często natomiast choroba nie dotyka kory mózdzku i jąder oliwkowych (Sudarsky and Coutinho, 1995; Dürr *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 2001; Paulson, 2012b; Paulson *et al.*, 2017). Poza widoczną neurodegeneracją, w mózgach pacjentów są obecne inkluzje białkowe tworzone przez zmutowane białko, które występują zarówno w obszarach ulegających zanikowi, jak również nie objętych chorobą (Paulson *et al.*, 1997a; Schmidt *et al.*, 1998; Rüb, Brunt, *et al.*, 2006; Rüb, de Vos, *et al.*, 2006). W większości przypadków agregaty lokalizują na terenie jądra komórkowego, ale identyfikuje się je również w cytoplazmie neuronów i aksonach obszarów dotkniętych chorobą (Hayashi *et al.*, 2003; Seidel *et al.*, 2010, 2012).

### **1.2 Charakterystyka funkcjonalna ataksyny-3**

#### **1.2.1 Budowa ataksyny-3 i jej lokalizacja w komórce**

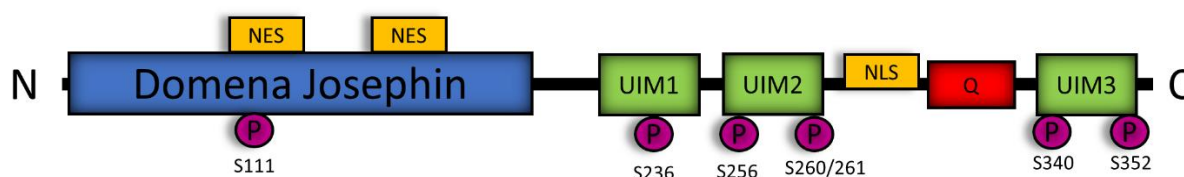
Ataksyna-3, 42 kDa białko, jest ulegającym powszechnie ekspresji enzymem deubikwitynującym, potrafiącym wiązać i ciąć łańcuchy poliubikwitynowe. Ataksyna-3 pełni ważne funkcje w systemie ubikwityna-proteasom (UPS, ang. Ubiquitin – proteasome system) odpowiedzialnym za degradację białek oraz w regulacji transkrypcji, jednak całkowity obraz jej funkcji fizjologicznych nie został jeszcze dokładnie poznany (Pozzi *et al.*, 2008a; Evers *et al.*, 2014; Matos *et al.*, 2018). Białko to posiada kilka różnych izoform, będących wynikiem alternatywnego splicingu, które różnią się sekwencją na C - końcu (Goto *et al.*, 1997; Bettencourt *et al.*, 2010). Kanoniczna forma ataksyny-3 składa się z 361 aminokwasów (aa), zawiera N-terminalną domenę Josephin z aktywnością izopeptydazy, C-końcowy rejon



zawierający trzy motywy oddziałujące z ubikwityną (UIM, ang. Ubiquitin interacting motif) oraz trakt poliQ (Ryc. 1) (Ichikawa *et al.*, 2001; Winborn *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2010).

Ataksyna-3 ulega ekspresji we wszystkich komórkach ludzkiego organizmu i wykazuje lokalizację zarówno jądrową, jak i cytoplazmatyczną (Henry L. Paulson *et al.*, 1997; Tait *et al.*, 1998; Thorsten Schmidt *et al.*, 1998; Trottier *et al.*, 1998; Pozzi *et al.*, 2008b). Mimo, iż nie wiadomo, czy ataksyna-3 pełni swoje główne funkcje w jądrze komórkowym czy cytoplazmie pokazano, że forma aktywna częściej występuje w jądrze komórkowym niż ta, która jest katalitycznie nieaktywna (Todi *et al.*, 2007). Komórkowa lokalizacja ataksyny-3 wydaje się być regulowana przez różne regiony w jej strukturze: przewidzianego za pomocą analiz *in silico* sygnału lokalizacji jądrowej (NLS, ang. nuclear localization signal) (Tait *et al.*, 1998; Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2018) i dwóch sygnałów eksportu z jądra (NES, ang. nuclear export signal) w domenie Josephin (Albrecht *et al.*, 2004; Antony *et al.*, 2009; Matos *et al.*, 2018). Innym rejonem, który wydaje się wpływać na lokalizację ataksyny-3 jest jej pierwsze 27 aa. Białko ich nie posiadające nie jest wykrywane w jądrze komórkowym, jednak mechanizm stojący za tym zjawiskiem wciąż nie jest poznany (Pozzi *et al.*, 2008b). Wpływ posiadanego NLS na rozmieszczenie ataksyny-3 w komórce wydaje się być także dyskusyjny, ponieważ powoduje on słaby import tego białka *in vitro* (Antony *et al.*, 2009; Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009). Ponadto mutacja lub delecja rdzenia tego motywu, czyli 282-285 aa nie wpływa na lokalizację ataksyny-3 w komórce (Evers *et al.*, 2014). Z kolei, z sześciu NES, dwa wspomniane powyżej wykazują znaczny wpływ na usytuowanie ataksyny-3 w cytoplazmie (Albrecht *et al.*, 2004; Antony *et al.*, 2009). Ponadto, ataksyna-3 posiada sześć potencjalnych miejsc fosforylacji, które są substratami dla kinazy CK2 i jedno miejsce fosforylacji modyfikowane przez GSK3/β (kinaza syntazy glikogenu-3 β). Największe znaczenie dla lokalizacji komórkowej ataksyny-3 ma fosforylacja seryn 236, 340 i 352 przez CK2, gdyż to właśnie te potranslacyjne modyfikacje kierują to białko do jądra komórkowego. Fosforylacja ma oprócz tego ważne znaczenie dla stabilności ataksyny-3 (Fei *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2009). Co ciekawe, w odpowiedzi na stres oksydacyjny bądź szok cieplny ataksyna-3 zwiększa swoją obecność w jądrze komórkowym niezależnie od wymienionych powyżej czynników. Dwa regiony wydają się być kluczowe dla tego transportu: S111 w domenie Josephin, która może być celem fosforylacji i C-koniec zawierający ciąg poliQ. Reasumując, w normalnych warunkach lokalizacja jądrowa ataksyny-3 jest określana głównie przez dwa sygnały NES i fosforylację przez CK2, a w znikomym stopniu przez sygnał NLS, jednak stymulacja w postaci odpowiedniego rodzaju stresu indukuje jej transport do jądra komórkowego niezależnie od

powyższych sygnałów (Antony *et al.*, 2009; Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2009; Reina *et al.*, 2010).



**Rycina 1. Schemat budowy ataksyny-3 z zaznaczonymi miejscami fosforylacji i sygnałami lokalizacji komórkowej.** Q – ciąg poliglutaminowy, P – miejsce fosforylacji, NES – sygnał eksportu z jądra, NLS – sygnał lokalizacji jądrowej, UIM – motyw oddziałujący z ubikwityną (Matos *et al.*, 2011; Evers *et al.*, 2014).

### 1.2.2 Rola ataksyny-3 w ścieżkach degradacji białek

Ataksyna-3 jest zaangażowana w regulację wielu procesów, co jest bezpośrednio związane z ilością białek z jakimi może oddziaływać, jej aktywnością deubikwitynującą i lokalizacją komórkową (Matos *et al.*, 2018). Biochemiczne właściwości motywów UIM i domeny Josephin wskazują, że funkcja ataksyny-3 jest powiązana z szlakiem UPS, który jest zaangażowany w degradację białek, endocytozę, regulację transkrypcji i prezentację antygenów (Burnett *et al.*, 2003; Evers *et al.*, 2014). Co więcej, może ona nawet kontrolować swój własny wzór ubikwitynacji, regulując w ten sposób swój okres półtrwania w komórce (Todi *et al.*, 2007). Inhibicja aktywności katalitycznej ataksyny-3 prowadzi do zwiększenia ilości poliubikwitylowanych białek do podobnego stopnia jaki jest obserwowany w przypadku hamowania działania proteasomu (Song *et al.*, 2010). Stąd pierwszymi i potwierdzonymi hipotezami, na temat funkcji ataksyny-3 były te odnośnie jej zaangażowania w proteasomalną degradację ubikwitylowanych białek poprzez edycję łańcuchów poliubikwitylowych białek przeznaczonych do degradacji (Wang *et al.*, 2012). Domena Josephin razem z UIM może chronić białka przed kierowaniem do proteasomu przez odcinanie od nich łańcuchów poliubikwityny lub stymulować ścieżkę proteasomu przez cięcie wolnych łańcuchów poliubikwityny, regenerując w ten sposób dostępną w komórce pulę ubikwityny (Burnett *et al.*, 2003; Winborn *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010). Motywy UIM są odpowiedzialne za selektywne wiązanie do łańcuchów ubikwityny i decydują o typach łańcuchów, które mogą być cięte. Dwa konserwatywne motywy UIM, zlokalizowane są na początku regionu poliQ, oddzielone krótkim łącznikiem, działają kooperatywnie podczas wiązania ubikwityny – powinowactwo tandemu jest większe niż pojedynczego motywu. Ataksyna-3 rozpoznaje łańcuchy poliubikwityny zawierające cztery lub więcej ubikwityn i wiąże te, w których monomery

ubikwityny są ze sobą połączone poprzez lizyny (K) w pozycjach 48 i 63 (Burnett *et al.*, 2003; Fang and Weissman, 2004; Berke *et al.*, 2005; Winborn *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010). Dla wiązania ubikwityny najważniejszy jest pierwszy i drugi motyw UIM - mutacja leucyny w pozycjach 229 i 249 niemalże całkowicie pozbawia ataksynę-3 zdolności do wiązania ubikwityny (Burnett *et al.*, 2003; Evers *et al.*, 2013). Mimo zdolności do wiązania łańcuchów ubikwityny połączonych przez K48 lub K63, motywy UIM pozycjonują łańcuchy w przestrzeni w ten sposób, że promuje to cięcie łańcuchów K63 a hamuje cięcie łańcuchów K48, co pokazano *in vitro* (Costa and Paulson, 2012). Z kolei sama domena Josephin zawiera dwa miejsca wiązania ubikwityny. Ich znaczenie nie jest jeszcze do końca wyjaśnione, jednak pokazano, że mutacja pierwszego miejsca uniemożliwia wiązanie łańcuchów z typem połączenia K48 i K63 do domeny Josephin. Drugie miejsce jest z kolei kluczowe tylko dla łańcuchów z połączeniem K63 (Nicastro *et al.*, 2009, 2010). Łańcuchy ubikwityny z połączeniami przy K48 uczestniczą w regulacji poziomu białek przez kierowanie ich do degradacji w proteasomie (Burnett *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2005; Schmitt *et al.*, 2007; Winborn *et al.*, 2008). Z kolei łańcuchy z połączeniami K63 biorą udział w mechanizmach naprawy DNA, translacji, endocytozie i transporcie komórkowym (Weissman, 2001; Winborn *et al.*, 2008).

Ostatnio pokazano, że deubikwitynylująca aktywność ataksyny-3 chroni białko beclinę 1, kluczowego aktywatora autofagii, przed degradacją proteasomalną i za tę aktywność jest odpowiedzialne oddziaływanie normalnej długości domeny poliQ z tym białkiem (Ashkenazi *et al.*, 2017). O zaangażowaniu ataksyny-3 w działanie UPS świadczy też fakt, że ataksyna-3 deubikwitynyluje białka CHIP i parkin będące ligazami ubikwityny, regulując w ten sposób ich stabilność i aktywność. Białko parkin ubikwitynyluje białka na błonie mitochondrialnej, kierując w ten sposób uszkodzone organella do autofagii, a mutacje tego białka są odpowiedzialne za rozwój choroby Parkinsona. Białko CHIP natomiast oddziałuje z białkami opiekuńczymi i kieruje nieprawidłowo sfałdowane białka do degradacji (Durcan *et al.*, 2011; Scaglione *et al.*, 2011; Seirafi *et al.*, 2015). Ataksyna-3 redukuje samoubikwitynylację białka parkin przez przekierowanie transferu ubikwityny na samą siebie (Durcan *et al.*, 2012; Durcan and Fon, 2013). Z kolei oddziaływanie ataksyny z CHIP ma miejsce tylko wtedy, gdy łańcuch poliubikwityny na CHIP osiągnie pewną krytyczną długość, co w rezultacie zapobiega dodawaniu kolejnych ubikwityn do białka CHIP (Scaglione *et al.*, 2011). Z drugiej strony, białko CHIP ubikwitynyluje domenę Josephin przy K117, co bezpośrednio zwiększa izopeptydazową aktywność ataksyny-3 (Todi *et al.*, 2009, 2010). Ponadto ataksyna-3 może oddziaływać także z białkiem zawierającym walozynę (VCP/p97, *ang.* valosin-containing

protein), które regulują degradację nieprawidłowo sfałdowanych białek na ścieżce zależnej od retikulum endoplazmatycznego (Zhong and Pittman, 2006; Liu and Ye, 2012). Potencjalna domena wiążąca VCP/p97 została zmapowana do motywu bogatego w argininę/lizynę znajdującego się tuż przy trakcie poliQ. Natomiast kompleks tworzony przez ataksynę-3 i VCP/p97 zaangażowany jest w kierowanie białek do proteasomu (Boeddrich *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

### *1.2.2 Rola ataksyny-3 w procesie transkrypcji oraz inne funkcje*

Istnieją doniesienia wskazujące też na zaangażowanie ataksyny-3 w regulację procesu transkrypcji (Evert *et al.*, 2003a; Rodrigues *et al.*, 2007). Wykazano, że ataksyna-3 oddziałuje z histonami, koaktywatorami transkrypcji: CBP (ang. cAMP - response - element-binding - protein - binding protein, białko wiążące czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cykliczne AMP), p300 (acetylotransferaza histonów), PCAF (ang. p300/CBP-associated factor, białko wiążące się do kompleksu p300/CBP), TAF4 (ang. TATA box-binding protein-associated factor 4, podjednostka czynnika transkrypcyjnego IID) i innymi regulatorami transkrypcji takimi jak: NCoR1 (ang. nuclear receptor co-repressor, represor transkrypcji), FOXO4 (ang. forkhead box O4, czynnik transkrypcyjny), deacetylazą histonów 3 i 6 (Shimohata *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002; Burnett and Pittman, 2005; Evert *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2011; Evers *et al.*, 2014). Globalna analiza ekspresji genów pierwotnych hodowli komórek MEF z myszy dzikich i pozbawionych genu ataksyny-3 pokazała różnice w ekspresji 423 genów. Najbardziej zmieniony był poziom genu *Efna3*, który ulega wysokiej ekspresji w układzie nerwowym i koduje receptor – kinazę tyrozynową, wchodzącą w skład ścieżki sygnałowej efryn, która odgrywa istotną rolę w migracji aksonów podczas rozwoju ośrodkowego układu nerwowego. Dalsze eksperymenty pokazały, że przyczyną zwiększonego poziomu ekspresji powyższego genu jest acetylacja histonów w rejonie jego promotora. Stąd, na podstawie tych badań przypuszcza się, że ataksyna-3 może brać udział w regulacji procesu transkrypcji przez hamowanie acetylacji histonów (Zeng *et al.*, 2018).

Zasugerowano też, że ataksyna-3 może odgrywać znaczącą rolę w mechanizmach naprawy DNA przez bezpośrednie interakcje z enzymem PNKP, który jest zaangażowany w naprawę pęknięć DNA (Chatterjee *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015); wiązanie się z Chk1, kinazą, odgrywającą rolę w utrzymaniu integralności genomu (Tu *et al.*, 2017) oraz regulację ubikwitynylacji MDC1, przez co może pośredniczyć w mechanizmach punktów kontrolnych i

sygnałach, świadczących o uszkodzeniu DNA (Pfeiffer *et al.*, 2017). Ataksyna-3 oddziałuje także z ludzkimi homologami drożdżowych białek RAD23, hHR23A i hHR23B, które są zaangażowane w ścieżki naprawy DNA jak i dostarczanie ubikwitylowanych substratów do proteasomu w celu degradacji. Miejsce wiązania hHR23B do ataksyny-3 jest zlokalizowane w drugiej pozycji wiązania ubikwityny w domenie Josephin. Pokazano, że hHR23B konkuruje o to miejsce z ubikwityną (Wang *et al.*, 2000; Nicastro *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2018). Stwierdzono, że oddziaływanie ataksyny-3 z wszystkimi wymienionymi powyżej białkami przyczynia się do utrzymania integralności genomu (Matos *et al.*, 2018).

Ponadto ataksyna zaangażowana jest także w inne mechanizmy komórkowe, np. oddziałuje z dyneiną, białkami wpływającymi na formacje i regulacje agresomów (Burnett and Pittman, 2005) jak i tubuliną i MAP2 - białkami cytoszkieletu komórkowego (Mazzucchelli *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2010).

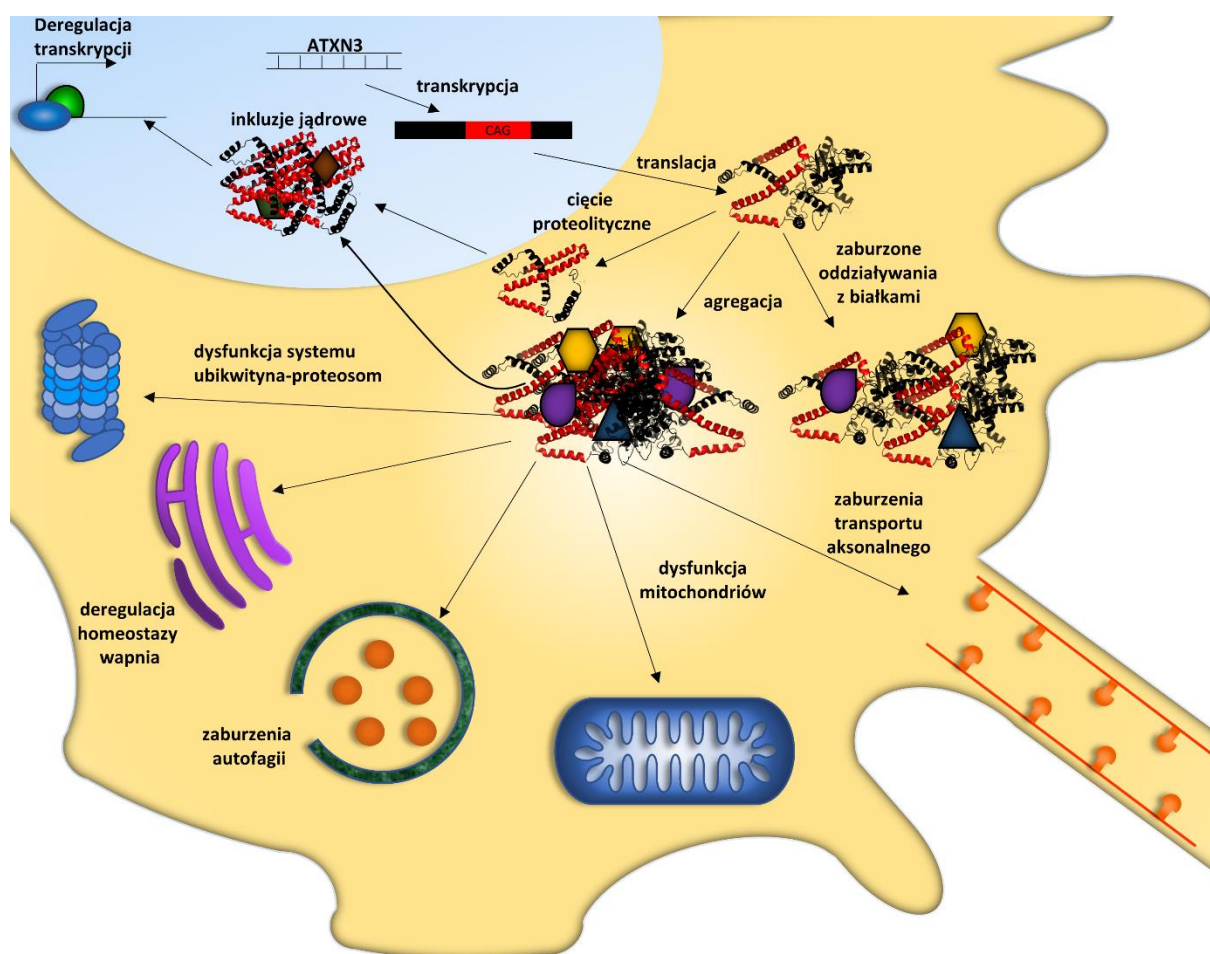
### **1.3 Mechanizmy patogenezy SCA3**

Biorąc pod uwagę liczbę białek, z którymi oddziałuje ataksyna-3 i procesów w jakie jest zaangażowana, patogeneza SCA3 wydaje się być bardzo złożonym zagadnieniem. Jeszcze do niedawna uważano, że choroba ta jest powodowana wyłącznie przez zmutowane ciągi poliQ w ataksynie-3, jednak ostatnie doniesienia pokazują, że obraz patogenezy SCA3 jest jeszcze bardziej skomplikowany. Coraz więcej obserwacji sugeruje, że obok toksycznego białka właściwości toksyczne może mieć również transkrypt ataksyny-3. Obecnie, postuluje się więc o dwutorowej ścieżce patogenezy w której uczestniczą zarówno białko jak i transkrypt. Rola białka, mimo iż jeszcze nie do końca poznana jest jednak lepiej zbadana niż rola transkryptu, która ciągle pozostaje niewyjaśniona (Evers *et al.*, 2014).

#### **1.3.1 Rola zmutowanego białka w patogenezie SCA3**

W SCA3 wydłużony trakt poliQ zlokalizowany na C-końcu ataksyny-3 powoduje konformacyjne zmiany w białku, co prowadzi do zmienionych właściwości wiązania, utraty/zyskania nowych funkcji, zmienionej lokalizacji komórkowej, agregacji i zmian w proteolitycznym cięciu samej ataksyny-3 (Jana and Nukina, 2004). Mimo intensywnych badań nadal nie jest całkowicie zrozumiałe w jaki sposób ekspansja ciągu poliQ powoduje obserwowane zmiany chorobowe. W obszarach mózgu dotkniętych chorobą nie

zaobserwowano zwiększonej ekspresji genu ataksyny-3, co sugeruje, że poziom ekspresji nie jest skorelowany z selektywną neurodegeneracją obserwowaną u pacjentów (Jana and Nukina, 2004). Z tego powodu inne zmiany powodowane przez zmutowaną ataksynę-3 wydają się być kluczowe w patogenezie tej choroby (Evers *et al.*, 2014). Do tej pory zidentyfikowano kilka ścieżek patogenezy za które odpowiedzialne jest ściśle białko, wśród których możemy wyróżnić: tworzenie się agregatów, powstawanie toksycznych fragmentów białka, zaburzenia degradacji białek, dysfunkcja mitochondriów, deregulacja transkrypcji i zaburzenie homeostazy jonów wapnia (Ryc. 2) (Matos *et al.*, 2018).



Rycina 2. Ścieżki patogenezy w SCA3 indukowane przez zmutowane białko (Evers *et al.*, 2014; Matos *et al.*, 2018; Nóbrega *et al.*, 2018).

### 1.3.1.1 Rola agregatów białkowych w patogenezie SCA3

Jak przedstawiono w poprzednim rozdziale ataksyna-3 jest zlokalizowana zarówno w jądrze komórkowym jak i w cytoplazmie, przy czym normalna forma występuje głównie w cytoplazmie (T Schmidt *et al.*, 1998; Trottier *et al.*, 1998; Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009).

Zmutowane białko, z wydłużonym ciągiem poliQ ma tendencję do agregacji w jądrze komórkowym, tworząc w ten sposób inkluzje zarówno w komórkach obszarów mózgu dotkniętych jak i nie objętych chorobą (Paulson *et al.*, 1997a; Schmidt *et al.*, 1998; Riess *et al.*, 2008). Inkluzje są uważane za główny element toksyczności ciągu poliQ, przez ich zdolność do sekwestracji różnych białek, w wyniku czego dochodzi do zaburzenia wielu szlaków komórkowych regulowanych przez te białka (Matos *et al.*, 2011; Weishäupl *et al.*, 2019). Poza ataksyną-3 w inkluzjach identyfikowane są także inne białka, takie jak uczestniczące w kontroli homeostazy komórki, składniki proteasomu, ubikwityna, czy białka opiekuńcze, które mogą być aktywowane w odpowiedzi na nieprawidłowo zwiniętą ataksynę-3 (Paulson *et al.*, 1997b; Chai *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; Seidel *et al.*, 2010). Co ciekawe, choć białko zmutowane od normalnego różni się diametralnie swoimi właściwościami, mają one jedną cechę wspólną; obydwie białka wiążą łańcuchy ubikwityny, w których pojedyncze monomery są połączone ze sobą poprzez K48 lub K63 w sposób niezależny od długości sekwencji poliQ (Chai *et al.*, 2004; Winborn *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2018). Zachowanie możliwości oddziaływania ze swoimi partnerami przez zmutowaną ataksynę-3 jest zapewne przyczyną rekrutacji do agregatów tak dużej puli różnych białek.

Badania sugerują, że do agregacji zmutowanej ataksyny-3 dochodzi przez złe zwinięcie się białka, wynikające z obecności traktu poliQ (Ellisdon *et al.*, 2007; Saunders and Bottomley, 2009). Domena Josephin odgrywa kluczową rolę we wczesnych zmianach konformacyjnych białka, modelując agregację zmutowanej ataksyny-3. Powierzchnia zaangażowana w samoagregację tej domeny pokrywa się z miejscami wiązania ubikwityny. Wskazuje to na bezpośredni związek między funkcją białka a agregacją (Nicastro *et al.*, 2009; Laura *et al.*, 2011). Ponadto akumulacja zmutowanej ataksyny-3 w jądrze komórkowym jest wymagana do pojawienia się toksyczności *in vivo* (Paulson *et al.*, 1997a; Thorsten Schmidt *et al.*, 1998; Seidel *et al.*, 2010). W transgenicznym mysz SCA3 można zaobserwować, że wraz z postępem choroby w mózdzku zwiększa się poziom agregatów przy jednoczesnym zmniejszaniu się rozpuszczalnej frakcji zmutowanej ataksyny-3 (Nguyen *et al.*, 2013). Uważa się, że warunki panujące w jądrze komórkowym sprzyjają tworzeniu się agregatów (Evers *et al.*, 2014). Dowodem na preferencyjne tworzenie inkluzji jądrowych przez ataksynę-3 jest zmniejszenie się ich liczby w wyniku zahamowania kinazy CK2, co prowadzi do obniżenia poziomu białka w jądrze komórkowym (Fei *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2009). Jednakże agregacja nie jest ściśle ograniczona do jądra komórkowego. Nadekspresja zmutowanej ataksyny-3 w małych komórkach nerki COS-7 prowadzi do tworzenia się cytoplazmatycznych agregatów, zlokalizowanych głównie wokół jądra komórkowego (Pozzi *et al.*, 2008b). Z kolei w aksonach

włókien nerwowych tkanki mózgowej pacjentów ze SCA3 zaobserwowane zostały rozległe agregaty, które mogą potencjalnie tworzyć zawadę przestrzenną i interferować w ten sposób z transportem aksonalnym. Powoduje to zaburzenie funkcji komórkowych i śmierć komórki (Seidel *et al.*, 2010). Długość traktu poliQ w zmutowanej ataksynie determinuje szybkość jej agregacji, im dłuższe ciągi poliQ tym szybsza agregacja, co wykazano zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (Teixeira-Castro *et al.*, 2011; Streets *et al.*, 2013).

Nadal istnieje wiele niewiadomych na temat roli i właściwości agregatów tworzonych przez zmutowaną ataksynę-3 w SCA3. Niektórzy autorzy sugeruje nawet, że mogą one być wynikiem obronnych mechanizmów komórkowych, mających na celu przeciwdziałanie bardziej toksycznym, rozpuszczalnym formom ataksyny-3 zawierającej ciągi poliQ. Ich funkcja ochronna mogłaby też polegać na zapobieganiu oddziaływaniom zmutowanego białka z innymi składnikami komórkowymi (Matsumoto *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2011). Toksyczność rozpuszczalnych oligomerów białek zawierających ciągi poliQ została pokazana na zróżnicowanych komórkach SH-SY5Y stransfekowanych wektorami kodującymi skrócone formy zmutowanych białek atrofiny-1 i huntiginy. Komórki w których obecne były rozpuszczalne oligomery tych białek wykazały wyższą śmiertelność w porównaniu do komórek zawierających inkluzje (Takahashi *et al.*, 2008). Ponadto neurony mostu z mózgow pacjentów ze SCA3, zawierające agregaty ataksyny-3, wykazywały mniejsze obkurczenie i deformacje morfologiczne w porównaniu z tymi, które ich nie posiadały (Uchihara *et al.*, 2002). Z kolei w doświadczeniach *in vivo* na mysim modelu HD, zastosowanie agonisty dopaminy - pramipeksolu powodowało zmniejszenie się ilości rozpuszczalnej formy zmutowanego białka i zwiększenie rozmiaru inkluzji jądrowych. W porównaniu do zwierząt nietraktowanych, u myszy przyjmujących powyższy związek dochodziło do polepszenia cech motorycznych i częściowego przywrócenia poziomu białka DARPP-32 (ang. dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, fosfoproteina regulowana przez dopaminę i cAMP), które jest markerem degeneracji neuronów prążkowiec (Luis-Ravelo *et al.*, 2018).

### *1.3.1.2 Hipoteza toksycznych fragmentów ataksyny-3*

Głównym założeniem tej hipotezy jest, że powstające w wyniku cięcia proteolitycznego zmutowanej ataksyny-3 fragmenty białka zawierające ciąg poliQ wykazują bardziej toksyczne właściwości niż pełnej długości białko (Berke *et al.*, 2004; Haacke *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2011). Jest to zgodne z badaniami sugerującymi, że pojawienie się krótkich fragmentów zmutowanej ataksyny-3 jest ważnym elementem prowadzącym do



formowania się agregatów (Evers *et al.*, 2014). Nie jest jeszcze do końca jasne czy agregaty obserwowane w mózgach zawierają ataksynę-3 pełnej długości, powstałe w wyniku cięcia proteolitycznego jej krótsze fragmenty, czy może mieszaninę dwóch powyższych. Co ciekawe, agregacja pełnej długości ataksyny-3 może zostać zaindukowana przez transfekcję komórek wektorami kodującymi krótkie fragmenty ataksyny-3, zawierające ciąg poliQ (Ikeda *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 2013). Możliwe jest więc, że fragmenty ataksyny-3 zawierające trakt poliQ mogą służyć jako katalizator lub ognisko dla agregacji pełnej długości białka. (Schmidt *et al.*, 2002). W mysim modelu SCA3 wykazano obecność krótkich fragmentów z ciągiem poliQ, powstałych w wyniku cięcia proteolitycznego ataksyny-3. Ponadto, w dwóch przebadanych mózgach obszary ulegające neurodegeneracji były wzbogacone w C-końcowe fragmenty tego białka (Goti *et al.*, 2004). W kolejnych badaniach zidentyfikowano kilka enzymów proteolitycznych – kaspaz i kalpain, mogących odpowiadać za cięcie zmutowanej ataksyny-3 i generowanie krótkich, toksycznych fragmentów. (Goti *et al.*, 2004; Teixeira-Castro *et al.*, 2011). Pokazano, że w ataksynie-3 jest potencjalnie kilka miejsc cięć, trzy najistotniejsze to reszty asparaginianu znajdujące się w pozycjach 241, 244 i 248. Wykazano, że mutacja tych reszt znacząco hamuje cięcie ataksyny-3 przez kaspazę-1. Pokazano też, że cięcie zmutowanego białka prowadzi do utworzenia się agregatów nierozpuszczalnych w SDS, a ich ilość może zostać zmniejszona przez dodanie inhibitorów kaspaz (Berke *et al.*, 2004). Dalsze badania wykazały, jednak że wkład kaspaz w cięcie ataksyny-3 jest raczej ograniczony: inkubacja ataksyny-3 z oczyszczoną kaspazą-1 i 3 pokazała zaledwie niewielkie cięcie tego białka przez te enzymy (Evers *et al.*, 2014). Ponadto inhibitory kaspazy-1 i 3 nie redukowały tworzenia się agregatów w neuronalnej linii komórkowej wyprowadzonej od pacjentów ze SCA3 (Koch *et al.*, 2011). Obecnie nie ma jasnych konkluzji z badań *in vitro* i *in vivo* na temat zaangażowania kaspaz w patogenezę SCA3, co sugeruje, że inne enzymy mogą uczestniczyć w generowaniu toksycznych fragmentów. Pojawia się natomiast coraz więcej dowodów na udział kalpain w patogenezie SCA3. Pokazano, że cięcie ataksyny-3 przez kalpaina zachodzi w pozycji 60, 221 i 260 aa (Goti *et al.*, 2004; Haacke *et al.*, 2007; Simoes *et al.*, 2012; Hubener *et al.*, 2013). Ponadto, zmutowana ataksyna-3 była bardziej podatna na cięcie kalpainą 2 przy 260 aa w porównaniu z niezmutowanym białkiem a powstające w ten sposób fragmenty były bardzo podatne na agregację (Hubener *et al.*, 2013). Inhibicja kalpain zmniejszała toksyczność wywołaną przez zmutowaną ataksynę-3 *in vivo* u myszy, w wyniku zmniejszenia proteolizy, agregacji oraz obecności w jądrze komórkowym zmutowanego białka. (Haacke *et al.*, 2007; Simoes *et al.*, 2012). Obserwacje te są też poparte innymi doświadczeniami wykonanymi na modelach mysich, gdzie zwiększenie aktywności kalpain przez wyciszenie ich inhibitora –

kalpastatyny, prowadził do pogorszenia się fenotypu u zwierząt (Hubener *et al.*, 2013). W mózgach pacjentów ze SCA3 wykryto obniżony poziom kalpastatyny, co sugeruje, że mechanizm ten może brać udział w patogenezie SCA3 (Simoes *et al.*, 2012). Cięcie ataksyny-3 przez kalpainy zostało też zaproponowane jako wyjaśnienie tego, że SCA3 atakuje tylko komórki neuronalne. Badania *in vitro* pokazały, że napływ wapnia wywołany wzbudzeniem komórek neuronalnych za pomocą glutaminianu jest wymagany do cięcia ataksyny-3 przez kalpainy i następującemu po tym formowaniu się agregatów. Cięcie to, wywołane wzbudzeniem komórek, było zainicjowane w komórkach neuronalnych ale już nie w fibroblastach czy komórkach gleju (Koch *et al.*, 2011).

### *1.3.1.3 Zaburzenia procesu degradacji białek*

Ataksyna-3 jest enzymem bezpośrednio zaangażowanym w funkcjonowanie UPS, którego główną funkcją jest degradacja uszkodzonych lub nieprawidłowo sfałdowanych białek (Takahashi *et al.*, 2010; Matos *et al.*, 2011). Choć aktywność deubikwitynylująca zmutowanej ataksyny-3 nie różni się od aktywności formy normalnej, to w komórkach SCA3 obserwujemy ogólne obniżenie poziomu deubikwitynylacji. Zjawisko to może być częściowo wyjaśnione faktem, że zmutowana ataksyna-3 tworzy agregaty, które zawierają również ubikwitynę i składniki systemu proteasomalnego. Rekrutacja do agregatów zarówno komponentów proteasomu jak i ubikwityny uniemożliwia im oddziaływanie ze swoimi partnerami i prowadzi do zaburzenia funkcjonowania UPS w SCA3 (Paulson *et al.*, 1997b; Chai *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2002). Zmutowana ataksyna-3 ulega w takim samym stopniu ubikwitynylacji jak normalne białko, ale jej okres półtrwania wydaje się być dłuższy, co może dodatkowo wskazywać na zaburzenie funkcjonowania UPS. Ponadto, mogłoby to też ułatwiać agregację zmutowanego białka (Matsumoto *et al.*, 2004). Ataksyna-3 z ekspansją ciągu poliQ wiąże białko VCP/p97 bardziej efektywnie niż normalna, co jest prawdopodobnie spowodowane zmianami konformacyjnymi w ataksynie-3. Wydaje się to interferować z degradacją substratów retikulum endoplazmatycznego (Hirabayashi *et al.*, 2001; Doss-Pepe *et al.*, 2003; Zhong and Pittman, 2006; Łaço *et al.*, 2012). W SCA3 zaburzona jest nie tylko degradacja w siateczce endoplazmatycznej, ale również autofagia, gdzie zakłócona jest degradacja składników komórkowych przez maszynę lizosomalną. W agregatach zmutowanej ataksyny-3 znaleziono między innymi molekularne komponenty zaangażowane w proces autofagii, takie jak białko beklina 1. Endogeny poziom tego białka jest znacząco obniżony w fibroblastach od pacjentów SCA3 i prązkowiu transgenicznym myszy (Nascimento-Ferreira *et al.*, 2011).

Ponadto jak opisano powyżej ataksyna-3 deubikwitynylując beklinę 1, chroni to białko przed degradacją w proteasomie, co umożliwia prawidłowy przebieg autofagii. Za oddziaływanie pomiędzy ataksyną-3 a bekliną 1 odpowiedzialny jest trakt poliQ. Zmutowane białko z wydłużonym ciągiem poliQ konkuruje efektywniej o oddziaływanie z bekliną 1 niż normalne białko, przez co znosi ochronne działanie ataksyny-3 (Ashkenazi et al., 2017). Nadekspresja bekliny 1 w kulturach neuronalnych oraz szczurzym modelu z ekspresją ataksyny-3 prowadziła do stymulacji autofagii i usuwania zmutowanego białka. (Nascimento-Ferreira *et al.*, 2011).

Obserwacje te sugerują, że patogenezę SCA3 może częściowo wynikać z zaburzenia ścieżki degradacji zależnej od retikulum endoplazmatycznego jak i autofagii, co sumarycznie powoduje zahamowanie procesów degradacji, akumulację ubikwitynowanych białek, stres komórkowy i może w konsekwencji prowadzić do śmierci komórki (Bence *et al.*, 2001; Evers *et al.*, 2014).

### *1.3.1.4 Dysfunkcja mitochondriów*

Stres oksydacyjny jest indukowany w komórkach przez reaktywne formy tlenu i wolne rodniki. W chorobach poliQ, w tym SCA3, stres oksydacyjny i brak ochrony przed nim może prowadzić do dysfunkcji mitochondriów i śmierci komórki (Kim *et al.*, 2003; Goswami *et al.*, 2006; Miyata *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2009; Ajayi *et al.*, 2012). Na modelu *Saccharomyces cerevisiae* pokazano, że w porównaniu do normalnego białka ekspresja zmutowanej ataksyny-3 z 85 powtórzeniami CAG powoduje znaczne podwyższenie poziomu  $H_2O_2$ . W komórkach tych obserwowano także obniżony stosunek zredukowanego do całkowitego glutationu, co świadczy o zaburzeniu mechanizmów obronnych, chroniących przed stresem oksydacyjnym (Bonanomi *et al.*, 2015). Wykazano, że ekspresja zmutowanej ataksyny-3 z 78 powtórzeniami CAG prowadzi do zredukowania poziomu enzymów antyoksydacyjnych i zwiększenia uszkodzeń mitochondrialnego DNA w komórkach neuroblastoma SK-N-SH, co świadczy o dysfunkcji mitochondriów (Yu *et al.*, 2009). Zaobserwowano również uszkodzenia mitochondrialnego DNA w transgenicznym modelu myszy z ekspresją pełnej długości ataksyny-3, zawierającej około 100 powtórzeń CAG. W jądrach mostu, będących obszarem dotkniętym chorobą u tych myszy, zaobserwowano mniej kopii mitochondrialnego DNA w porównaniu do hipokampu, będącego obszarem nie objętym chorobą (Kazachkova *et al.*, 2013). Ponadto mniejszą liczbę kopii mitochondrialnego DNA zaobserwowano w modelach komórkowych i próbkach pochodzących od pacjentów (Yu *et al.*, 2009). Co więcej, w obszarze mostu u pacjentów SCA3 zaobserwowano obniżony poziom dysmutazy ponadtlenkowej, jednego z

enzymów antyoksydacyjnych. W SCA3 upośledzona jest aktywność drugiego kompleksu oddechowego (Kazachkova *et al.*, 2013). Uszkodzone mitochondria nie są w stanie pełnić swoich funkcji, co może przyczynić się do zwiększenia stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji może to doprowadzić do ekscytotoksyczności lub aktywacji apoptozy – dwóch głównych przyczyn śmierci neuronów (Emerit *et al.*, 2004).

### 1.3.1.5 Deregulacja transkrypcji

Obecność zmutowanej ataksyny-3 w komórce prowadzi również do deregulacji transkrypcji (Perez *et al.*, 1998; McCampbell *et al.*, 2000; Nóbrega *et al.*, 2018). Zmutowana ataksyna-3 może sekwestrować w inkluzjach specyficzne czynniki transkrypcyjne, takie jak TBP (ang. TATA binding protein, białko wiążące sekwencję TATA), czy CBP, co prowadzi do zmian w profilach transkrypcji genów kontrolowanych przez te czynniki i przez to może się przyczyniać do neurotoksyczności (Perez *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 2001; van Roon-Mom *et al.*, 2005). Ponadto zarówno normalna jak i zmutowana ataksyna-3 może wiązać się do CREB (ang. cAMP responsive element binding protein 1, czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cykliczne cAMP), p300 i PCAF, prowadząc do inhibicji transkrypcji. Jednak obecność wydłużonego ciągu poliglutaminowego powoduje, że zmutowane białko wiąże się efektywniej do tych czynników niż białko z normalną długością ciągu, co sugeruje możliwą patologiczną funkcję ataksyny-3 (Li *et al.*, 2002b). Zmutowana ataksyna-3 wykazuje również zmienione właściwości wiązania DNA i chromatyny, w wyniku czego jej oddziaływanie z deacetylazą histonową, jak i zdolność do represji transkrypcji są osłabione. Normalna ataksyna-3 hamuje aktywność acetylazy histonowej, jednak w wyniku ekspansji ciągu poliQ ta represja transkrypcyjna jest zahamowana. Skutkuje to zwiększonym poziomem całkowitej acetylacji histonu H3, co zostało zaobserwowane w modelach komórkowych i w materiale pochodzącym z mózgów pacjentów. Zjawisko to powoduje zwiększenie całkowitego poziomu transkrypcji w komórkach dotkniętych SCA3 (Evert *et al.*, 2006a; Evers *et al.*, 2014). Zmutowana ataksyna-3 wykazuje również zmniejszoną zdolność do oddziaływania z czynnikiem transkrypcyjnym FOXO4, co w konsekwencji zmniejsza aktywację ekspresji SOD2 (ang. superoxide dismutase 2, dysmutaza ponadtlenkowa 2) w stresie oksydacyjnym, przyczyniając się w ten sposób do cytotoksyczności (Araujo *et al.*, 2011).

Powyższe dane sugerują, że w SCA3 może dochodzić do deregulacji szeregu procesów komórkowych przez zaburzenia transkrypcji, co mogłoby się przyczyniać do patogenezy tej choroby. Wydają się to potwierdzać eksperymenty przeprowadzone na modelach komórkowych i mysich SCA3, gdzie obserwowano zaburzoną transkrypcję genów

zaangażowanych w procesy zapalne, przekazywanie sygnału w komórce i kodujących białka powierzchni komórkowej (Evert *et al.*, 2001, 2003b; Chou *et al.*, 2008; Nóbrega *et al.*, 2018). Z kolei w materiale od pacjentów ze SCA3 poziom białek MMP-2 (ang. metalloproteinase 2, metaloproteinaza 2), interleukiny, amyloidального  $\beta$ -białka jest bardzo podwyższony (Evert *et al.*, 2001). Obserwacje te zostały dodatkowo poparte faktem, że w komórkach z nadekspresją zmutowanej ataksyny-3 dochodzi do zwiększenia ekspresji MMP-2 (Evert *et al.*, 2003a). Z kolei w transgenicznym modelu SCA3 dysfunkcja mózdzku i ataksja były skorelowane z zaburzeniem normalnego profilu transkrypcji. Ponadto u myszy transgenicznych, niewykazujących fenotypu neuronalnego, zaobserwowano obniżony poziom mRNA genów zaangażowanych w ścieżki sygnałowe zależne od glutaminianu (Chou *et al.*, 2008; Lodewijk J. A. Toonen *et al.*, 2018).

Powyższe fakty wzmacniają znaczenie deregulacji transkrypcji w patogenezie SCA3, potrzeba jednak dalszych badań aby dokładnie określić jaką rolę odgrywa to zjawisko w tym procesie.

### *1.3.1.6 Zaburzenie homeostazy jonów wapnia*

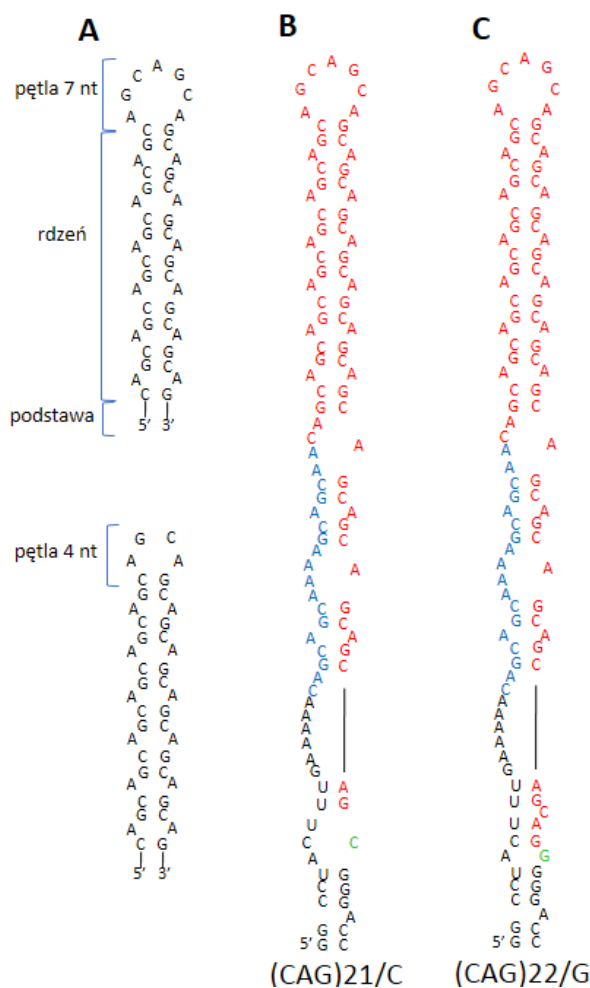
W neuronach homeostaza jonów wapnia jest niezwykle istotna dla kluczowych procesów, takich jak uwalnianie neurotransmiterów, wzrost neurytów i plastyczność synaptyczna. Zaburzenia ścieżek sygnałowych zależnych od jonów wapnia mają poważne konsekwencje w funkcjonowaniu kluczowych szlaków komórkowych i tym samym mogą przyczyniać się do neurodegeneracji (Clapham, 2007; Zhivotovsky and Orrenius, 2011; Bading, 2013; Brini *et al.*, 2014). Zmutowana ataksyna-3 (w przeciwieństwie do normalnej) wiąże się do InsP3R1 – wewnątrzkomórkowego kanału wapnia obecnego w retikulum endoplazmatycznym. Podnosi to jego wrażliwość na aktywację przez trifosforan inozytolu i zwiększa w ten sposób uwalnianie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego (Chen *et al.*, 2008). Zbyt duży wewnątrzkomórkowy napływ wapnia może doprowadzić do śmierci komórki przez aktywację kilku cytotoksycznych mechanizmów, takich jak permeabilizacja mitochondriów, stres oksydacyjny, zaburzenia funkcjonowania cytoszkieletu i aktywacja białek zależnych od wapnia – np. kalpajny (Zhivotovsky and Orrenius, 2011). Podanie Dantrolenu, inhibitora uwalniania jonów wapnia myszom SCA3, u których dochodzi do ekspresji ataksyny-3 z ciągiem 84 Q, znacząco poprawiało koordynację motoryczną, chód i zapobiegało śmierci neuronów. Sugeruje to, że ścieżki sygnałowe zależne od wapnia mogą być zaangażowane w patogenezę SCA3 (Chen *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Rola zmutowanego RNA w patogenezie SCA3

Do niedawna uważano, że choroby poliQ, w tym SCA3 są powodowane tylko przez patogenne białko, zyskujące w wyniku mutacji toksyczne funkcje, a w mniejszym stopniu przez utratę funkcji normalnego białka. Jednakże coraz więcej doniesień sugeruje, że oprócz toksyczności białka w patomechanizm chorób poliQ może być zaangażowany także transkrypt zawierający wydłużone ciągi CAG. Jak do tej pory istotną rolę zmutowanego RNA w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych opisano w chorobach, w których ekspansja powtórzeń znajduje się w niekodującym obszarze genu – rejonach UTR lub intronach. Przykładami tych chorób są dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1, powtórzenia CTG), ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu ósmego (SCA8, CTG), zespół łamliwego chromosomu X (FXTAS, CGG), ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu dwunastego (SCA12, CAG), stwardnienie zanikowe boczne i otępienie czołowo skroniowe (C9ALS/FTD, GGGGCC). W przypadku tych chorób z racji lokalizacji mutacji nie powstaje w sposób kanoniczny patogenne białko a jedynie zmutowany RNA, którego obecność prowadzi w znacznym stopniu do rozwoju tych chorób (Todd and Paulson, 2009; Nalavade *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017). Wykazywanymi przez komórki molekularnymi oznakami toksyczności RNA w tych chorobach jest m.in. obecność skupień jądrowych tworzonych przez zmutowane transkrypty, o różnej morfologii, które sekwestrując białka komórkowe prowadzą do utraty ich funkcji i deregulacji wielu kluczowych procesów. Toksyczne oddziaływanie MBNL1 z ciągami CUG prowadzi do zaburzeń procesu alternatywnego splicingu genów zależnych od tego białka. Z kolei sekwestracja nukleoliny przez powtórzenia GGGGCC zaburza transkrypcję rRNA powodując stres jądrowy, który prowadzi do apoptozy komórki (Li *et al.*, 2008; Mykowska *et al.*, 2011; Tsoi *et al.*, 2011, 2012; Nalavade *et al.*, 2013; Jazurek *et al.*, 2016; Ciesiolka *et al.*, 2017). Obecnie uważa się, że toksyczność RNA jest głównie spowodowana przez jego zdolność do tworzenia stabilnej struktury spinki lub kwadrupleksu, rozpoznające ją białka są do niej rekrutowane przez co nie mogą pełnić swojej normalnej funkcji w komórce (de Mezer *et al.*, 2011; Chan, 2014).

Powtórzenia CAG analogicznie do powtórzeń CUG i CGG tworzą w RNA strukturę typu spinki, stąd prawdopodobne jest, że patomechanizmy zaobserwowane w DM1 czy FXTAS mają również swoje odzwierciedlenie w SCA3 (Sobczak *et al.*, 2003). W strukturze drugorzędowej RNA z powtórzeniami CAG możemy wyróżnić podstawę, spinkę tworzącą rdzeń i pętlę końcową. Rdzeń jest zbudowany z par G-C i C-G z niesparowaniami A-A (Ryc. 4). Długość spinki i jej stabilność zwiększa się wraz z liczbą powtórzeń. Spinki tworzone przez

wydłużone powtórzenia CAG są bardziej stabilne niż ich normalne, niezmutowane odpowiedniki. Badania struktury *in vitro* fragmentów transkryptów ataksyny-3 z 21, 22 i 65 powtórzeniami CAG, które posiadały 34 nt sekwencji flankującej po stronie 5' i 44 nt po stronie 3' pokazały, że posiadają one heterogenną strukturę. Konformacja motywu CAG we wspomnianych powyżej transkryptach obejmuje kilka wariantów spinek, przesuniętych względem siebie w kierunku końca 5' i posiadających różną wielkość pętli końcowej. Obserwowane przesunięcie jest wynikiem parowania się powtórzeń CAG z flankującą je sekwencją 5' zawierającą pseudo-powtórzenia (CAG CAG CAA AAG CAG CAA) (Michlewski and Krzyzosiak, 2004). Natomiast rozmiar pętli zależy od liczby powtórzeń, gdzie nieparzysta liczba daje pętle złożone z 7 nt a parzysta z 4 nt. Ponadto, między powtórzeniami CAG a flankującą je sekwencją 3' znajduje się polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. Single nucleotide polymorphism-SNP) G/C (rs12895357). Wykazano, że wariant G występuje a allelu normalnym a C na zmutowanym, Na świecie 70% chromosomów z mutacją posiada wariant C. Ma on wpływ na strukturę sekwencji pseudo-powtórzeń i wielkość pętli w strukturze spinki. Świadczą o tym różne profile cięcia tych regionów przez nukleazy w zależności od obecnego SNP. Wzór cięcia enzymatycznego pętli w transkrypcie ataksyny-3 z 21 CAG i SNP C przypomina ten dla transkryptu 22 CAG z SNP G i odpowiada 7 nt pętli terminalnej. Stąd możliwe jest, że wariant SNP C razem z resztą G ostatniego powtórzenia CAG pełni rolę dodatkowego donora GpC naśladując w ten sposób strukturę transkryptu (CAG)<sub>22</sub> z SNP G. Oznaczałoby to, że polimorfizm obecny tuż za powtórzeniami powoduje powstanie innej pętli w strukturze spinki niż wynikałoby to z ilości powtórzeń CAG (Ryc. 3) (Sobczak *et al.*, 2003; Michlewski and Krzyzosiak, 2004; Ciesiolka *et al.*, 2017).



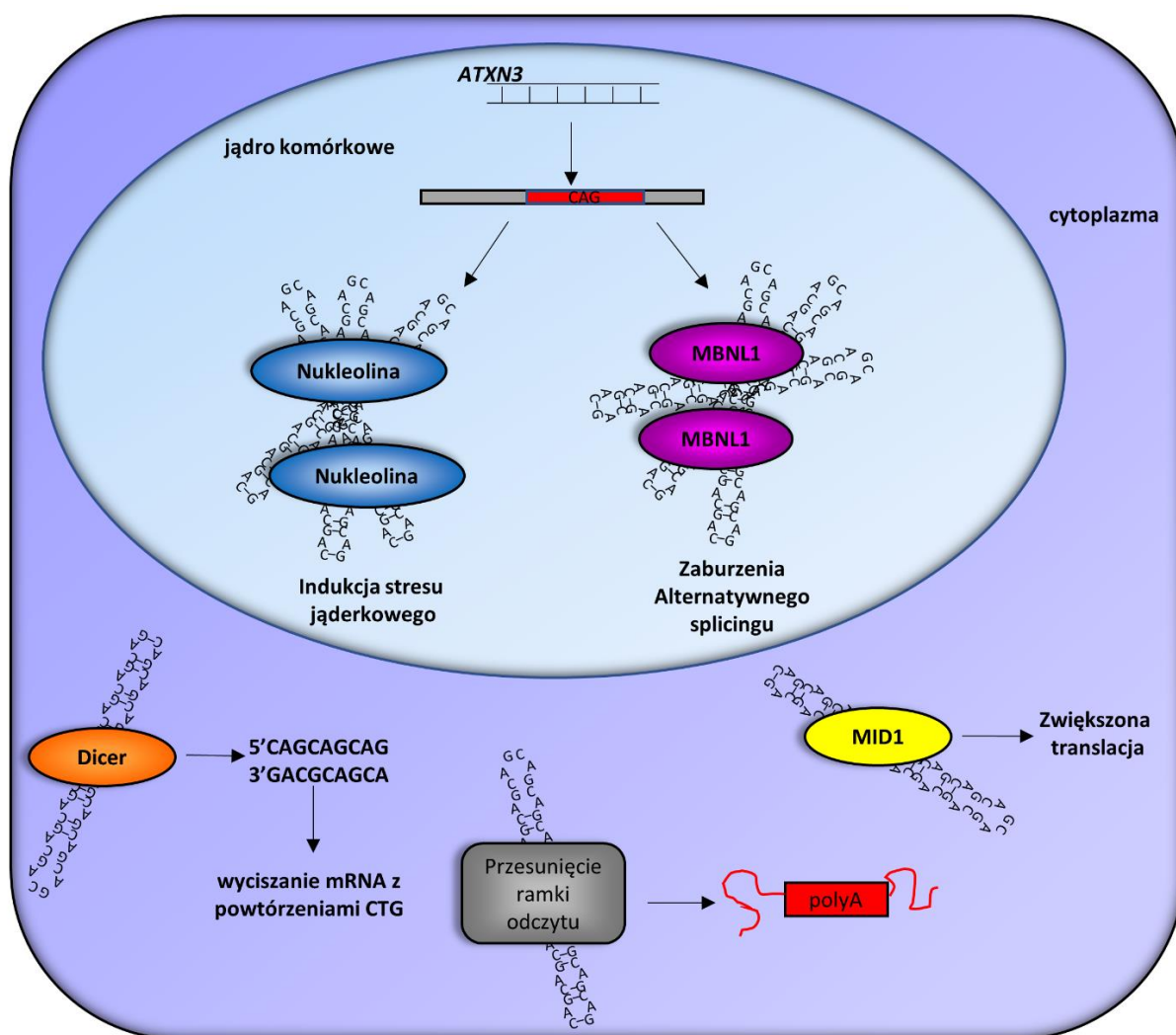
**Rycina 3. Struktury spinek tworzonych przez powtórzenia CAG i rejonu powtórzeń transkryptu ataksyny-3 z poszczególnymi SNP.** A – Spinki z pętlą 7 i 4 nt. B – Struktura rejonu powtórzeń fragmentu transkryptu ataksyny-3 z SNP C. C - Struktura rejonu powtórzeń fragmentu transkryptu ataksyny-3 z SNP G. Na czerwono zaznaczono ciąg powtórzeń, na niebiesko pseudo-powtórzenia, na zielono SNP (Michlewski and Krzyzosiak, 2004).

Jednymi z pierwszych doniesień opisujących potencjalną toksyczność RNA zawierającego ciągi CAG były te dotyczące jądrowej retencji MBNL1, która została zaobserwowana przy ekspresji nieulegających translacji powtórzeń CAG w linii komórkowej COSM6 oraz w modelu *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* i *Mus musculus* (Ho *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Hsu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Evers *et al.*, 2014). Doświadczenia przeprowadzone na *C. elegans*, gdzie ekspresja ciągu 83 CAG nieulegającego translacji nie dała żadnego fenotypu, wykazały, że ciąg 200 CAG w przeciwieństwie do 83 CAG powodował przedwczesną śmierć (Wang *et al.*, 2011). Ponadto, w transgenicznym modelu *D. melanogaster* z ekspresją nieulegających translacji powtórzeń CAG znajdujących się w rejonie 3'UTR genu DsRed (*ang. Discosoma sp.* red fluorescent protein), obserwowano progresywną dysfunkcję neuronalną. Natomiast, gdy do ciągu powtórzeń wprowadzono



interrupcje CAA (oba kodony kodują glutaminę, ale tworzą różne struktury na poziomie RNA) nie obserwowano żadnych toksycznych efektów (Li *et al.*, 2008).

Toksyczny RNA może działać poprzez różne ścieżki. Tworzenie skupień RNA i sekwestracja białek odgrywają ważną rolę w toksyczności RNA, jednak zmutowany RNA może również aktywować ścieżki stresu jąderkowego i zaburzać alternatywny splicing. Ponadto zmutowany transkrypt może przyczyniać się do neurotoksyczności na poziomie białka poprzez mechanizm rybosomalnego przesunięcia ramki odczytu (ang. ribosomal frameshifting) (Ryc. 4) (Evers *et al.*, 2014). W następnych rozdziałach zostaną opisane postulowane ścieżki patogenezy RNA dla SCA3 (Neueder, 2018).



**Rycina 4. Potencjalne ścieżki i mechanizmy patogenezy indukowane obecnością zmutowanego RNA w SCA3 (Nalavade *et al.*, 2013).**

### 1.3.2.1 Tworzenie się skupień jądrowych

Skupienia RNA są dynamicznymi strukturami charakteryzującymi się randomiczną formacją i dysocjacją, z fazą formowania, w której pośredniczą białka wiążące RNA (Querido *et al.*, 2011). W przeciwieństwie do normalnych transkryptów, te z ekspansją ciągów CAG gromadzą się w jądrze, co może być bezpośrednią przyczyną tworzenia się skupień jądrowych (Wojciechowska and Krzyzosiak, 2011). Jednakże akumulacja transkryptów sugeruje zaburzenia transportu zmutowanego RNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Czynnikiem wpływającym na lokalizację zmutowanego transkryptu ataksyny-3, jak pokazały badania przeprowadzone na modelu *D. melanogaster*, jest białko U2AF65 (Blanchette *et al.*, 2004). W modelu muszki owocowej z ekspresją cDNA ataksyny-3 z 78 powtórzeniami CAG dochodzi do wiązania się do powtórzeń białka U2AF50 (ortolog ludzkiego U2AF65), zaangażowanego w eksport jądrowy. Zahamowanie jego ekspresji powoduje wzmocnienie fenotypu neurodegeneracyjnego u muszek (Tsoi *et al.*, 2011). Badania przeprowadzone na linii HEK293, potwierdziły wiązanie się U2AF65 do długich powtórzeń CAG, natomiast nie zaobserwowano wiązania się do krótszych powtórzeń. Ponadto pokazano, że zahamowanie ekspresji tego białka powoduje akumulację zmutowanego transkryptu ataksyny-3 w jądrze komórkowym i aktywację kaspazy, natomiast nadekspresja tego białka stymuluje eksport zmutowanego transkryptu do cytoplazmy. Pokazuje to, jak istotny dla lokalizacji zmutowanego transkryptu jest poziom białek eksportujących, którego obniżenie może prowadzić do zahamowania eksportu jądrowego i akumulacji toksycznego mRNA w jądrze komórkowym (Tsoi *et al.*, 2011). Innym wyjaśnieniem akumulacji zmutowanych transkryptów w jądrze może być formowanie kompleksów z wieloma białkami oddziałującymi niespecyficznie z powtórzeniami, co prowadzi do ich sekwestracji (Mankodi *et al.*, 2003).

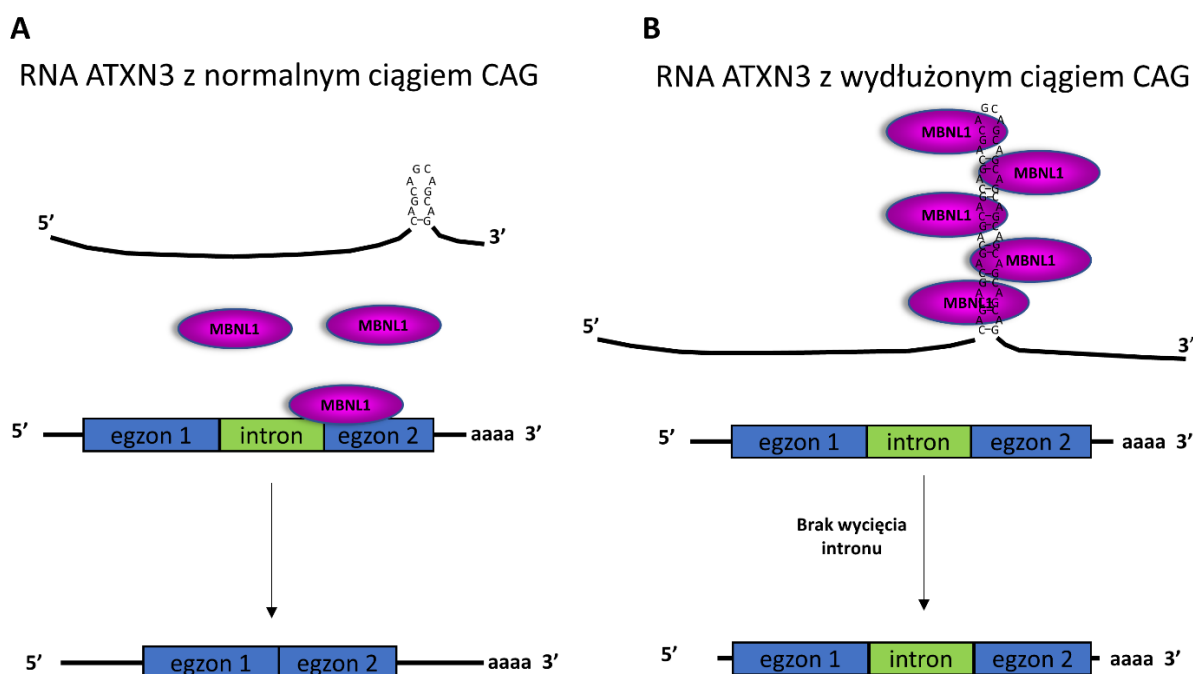
Do tej pory skupienia jądrowe tworzone przez zmutowany transkrypt wykryto w chorobach DM1, DM2 (dystrofia miotoniczna typu drugiego, CCTG) i C9ALS/FTD. W innych chorobach takich jak FXTAS, HDL2, SCA 8, 10, 31 zaobserwowano inkluzje jądrowe posiadające różną morfologię (Taneja *et al.*, 1995; Greco *et al.*, 2002; Wojciechowska and Krzyzosiak, 2011; Kumar *et al.*, 2017; Zhang and Ashizawa, 2017). Morfologia skupień RNA i inkluzji różni się. Skupienia w DM1 są bardziej zwarte, najprawdopodobniej z powodu ściślejszych oddziaływań między RNA a związanymi białkami, podczas gdy inkluzje w FXTAS są większymi, bardziej rozproszonymi strukturami, zawierającymi wiele białek, w tym laminę i MBNL1 (Hagerman, 2013). Retencję transkryptów i tworzenie skupień jądrowych na obszarze jądra komórkowego wykryto też w ludzkich fibroblastach od pacjentów, w których

dochodziło do ekspresji 44 powtórzeń CAG w transkrypcie *HTT* lub 69 powtórzeń CAG w transkrypcie ataksyny-3. Skupienia te nie zniknęły po traktowaniu DNA-zą, za to rozpadały się po potraktowaniu RNA-zą, co świadczy o udziale RNA w ich tworzeniu (Mykowska *et al.*, 2011). Formowanie się skupień jądrowych obserwowano też w wyniku ekspresji długich ciągów CAG u *C. elegans* i myszy. W mysich mioblastach C2C12 liczebność skupień była wprost proporcjonalna do długości ciągów powtórzeń CAG, jednak długość ciągów nie wpływała na liczbę jąder zawierających skupienia (Hsu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

### *1.3.2.2 Zaburzenia alternatywnego splicingu genów zależnych od MBNL1*

Białko MBNL1 należące do rodziny białek Muscleblind, reguluje alternatywny splicing specyficznych mRNA. Motyw wiązania RNA w tej rodzinie białek jest złożony z czterech domen palca cynkowego (Ho *et al.*, 2004; Kino *et al.*, 2004; Brinegar and Cooper, 2016). Za jego pomocą wiążą się one do regulowanych mRNA, takich jak: sercowa troponina T (TNNT2), pre-mRNA receptora insuliny i wielu innych (E. T. Wang *et al.*, 2012). Po związaniu do mRNA MBNL1 może działać jako aktywator lub represor splicingu. MBNL1 indukuje włączanie egzonu w pre-mRNA receptora insuliny, a hamuje ten proces w mRNA TNNT2. Oprócz powinowactwa do swoich specyficznych mRNA, MBNL1 wykazuje wysokie powinowactwo do RNA zawierającego wydłużone ciągi trójnukleotydowe (Kino *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2007). Wiązanie się MBNL1 do ciągów zostało na początku zaobserwowane w DM1, gdzie pokazano, że skupienia RNA tworzone przez mRNA z ciągami CUG sekwestrują to białko. Powoduje to funkcjonalną inaktywację MBNL1, co prowadzi do zaburzenia alternatywnego splicingu genów kontrolowanych przez to białko - nie dochodzi do wycinania z nich danych intronów (Ryc. 5) (Mankodi *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004). Ciągi CAG tworzą w RNA podobną strukturę spinki jak ciągi CUG, kluczową do oddziaływania z MBNL1. (Yuan *et al.*, 2007; de Mezer *et al.*, 2011) Co ciekawe, zaobserwowano kolokalizację MBNL1 ze strukturami RNA tworzonymi przez zmutowany transkrypt w jądrach komórek mięśniowych i neuronalnych (Miller *et al.*, 2000; Fardaei *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). Badania przeprowadzone na komórkach SK-N-MC z ekspresją zmutowanej ataksyny-3 wykazały zmiany w alternatywnym splicingu podobne do tych, które były indukowane przez ekspresję ciągów CAG nieulegających translacji (Mykowska *et al.*, 2011). Zaburzonemu splicingowi uległy geny *CLCN1* (ang. chloride voltage-gated channel 1, kanał chlorkowy typu *CLCN1*) i *SERCA1* (ang. ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transporting 1, pompa wapniowa siateczki śródplazmatycznej), których splicing zależny jest od MBNL1. Natomiast w fibroblastach od pacjentów, *SCA3* zmianie ulegał splicing *SERCA1* i *INSR* (ang.

insulin receptor, receptor insuliny). Wydaje się, że za obserwowane zmiany jest odpowiedzialny transkrypt z ciągiem CAG. Wyciszenie zmutowanego transkryptu ataksyny-3 przez siRNA spowodowało 3-krotne obniżenie ilości zmutowanego transkryptu i przywróciło częściowo splicing egzonu 11 w transkrypcie INSR. Ponadto nadekspresja MBNL1 w komórkach HeLa ekspresujących długie ciągi powtórzeń CAG częściowo supresowała defekty splicingu genów SERCA1 i INSR (Mykowska *et al.*, 2011). Podobnie, nadekspresja ortologu MBNL1 w modelu *C. elegans* z ekspresją RNA posiadającego wydłużony ciąg CAG częściowo łagodziła obserwowany fenotyp (Wang *et al.*, 2011). Powyższe badania wskazują, że patogenne oddziaływanie pomiędzy MBNL1 a zmutowanym transkrypcem może stanowić jeden z mechanizmów prowadzących do rozwoju SCA3 (Nalavade *et al.*, 2013; Chan, 2014).



**Rycina 5. Sekwestracja MBNL1 przez zmutowany transkrypt i następujące w wyniku tego zaburzenia alternatywnego splicingu.** A – Działanie MBNL1 w układzie z normalnym transkrypcem, gdzie dochodzi do wycięcia intronu. B – Sekwestracja białka przez strukturę spinki tworzonej przez powtórzenia CAG, co uniemożliwia MBNL1 wycięcia intronu (Todd and Paulson, 2009).

### 1.3.2.2 Oddziaływanie MID1 z ciągami powtórzeń CAG

Innym przykładem, toksycznego oddziaływania jest wiązanie kompleksu białkowego MID1 uczestniczącego w syntezie białek, do transkryptu zawierającego wydłużone ciągi CAG. MID1 jest ligazą ubikwityny, która ubikwitynyluje PP2Ac i przez to kieruje je do degradacji w proteasomie. Z tego powodu MID1 jest negatywnym regulatorem PP2A (Troddenbacher *et al.*,

2001). Przez tę negatywną regulację aktywności PP2A, MID1 kontroluje też aktywność kinazy mTOR (E. Liu *et al.*, 2011). Obydwa enzymy: mTOR i PP2A odgrywają ważną rolę w regulacji translacji białek przez kontrolowanie fosforylacji i tym samym aktywności kinazy S6 (S6K). Aktywowana poprzez fosforylację S6K fosforyluje i wzmacnia aktywność eIF4B (eukariotyczny czynnik 4B inicjacji translacji) i białka rybosomalnego S6, które w efekcie rozwija i linearyzuje 5'UTR odpowiednich mRNA, promując wiązanie rybosomu i inicjację translacji (Aranda-Orgillés *et al.*, 2008, 2011; Griesche *et al.*, 2016). Prowadzi to do zwiększenia poziomu translacji i powstawania większych ilości patogennego białka. Zjawisko to zostało początkowo zaobserwowane dla zmutowanego mRNA *HTT*, a następnie również dla transkryptów zmutowanej ataksyny-2, ataksyny-3 i ataksyny-7 co sugeruje, że zjawisko to jest zależne przede wszystkim od ciągu powtórzeń CAG, a nie od sekwencji go flankujących. W eksperymentach na pierwotnych hodowlach komórek neuronalnych otrzymanych, z myszy SCA3 pokazano, że zmutowany RNA ataksyny-3 wiąże się z białkiem MID1, które jest katalityczną podjednostką białkowej fosfatazy 2A (PP2Ac) (Griesche *et al.*, 2016). Ze względu na to, że kompleks, w którego skład wchodzi białko MID1, zawiera polirybosomy i kilka czynników translacyjnych, jest zdolny więc do wiązania i translacji mRNA. Konsekwencją jest zwiększenie wydajności procesu translacji i powstawania większych ilości zmutowanego białka z transkryptu oddziałującym z MID1 (Aranda-Orgillés *et al.*, 2008, 2011; Griesche *et al.*, 2016).

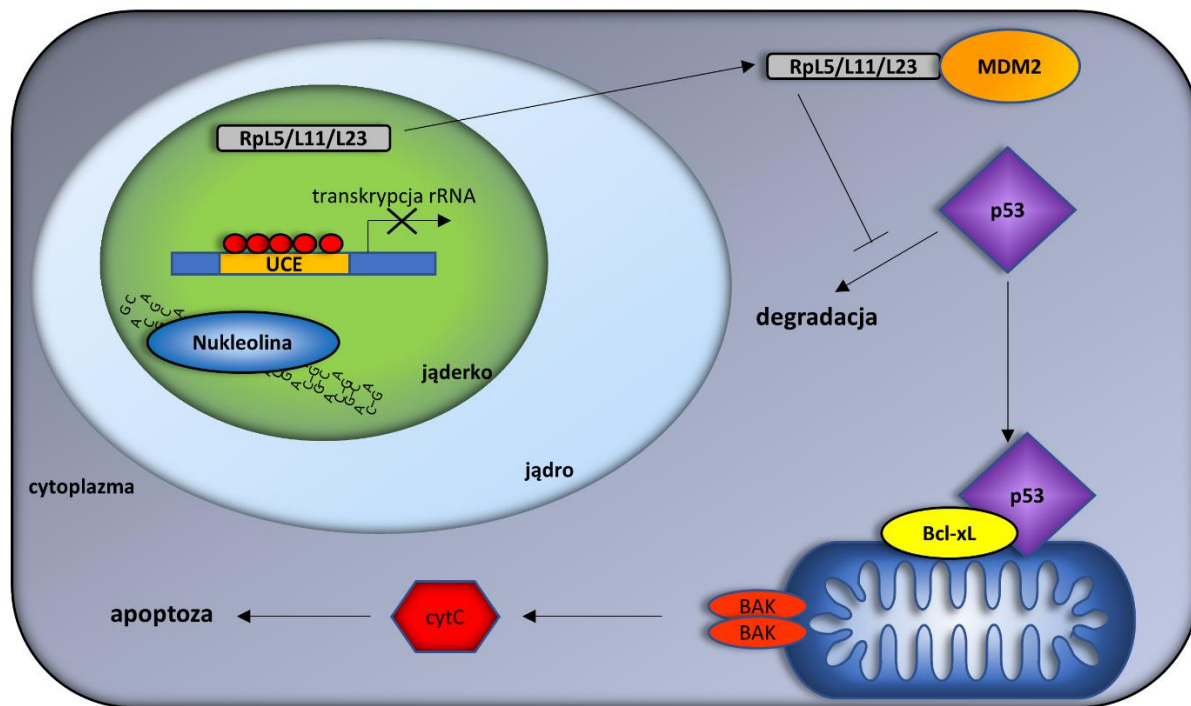
W doświadczeniach przeprowadzonych na komórkach HEK293T, gdzie fragment RNA ataksyny-3 (145 nt przed i 115 nt za ciągiem CAG) zawierający 15 lub 62 powtórzenia CAG znajdował się w 3'UTR genu lucyferazy, wykazano podwyższoną translację genu reporterowego z długim ciągiem w porównaniu do krótkiego ciągu. Ponadto, wyciszenie *MID1* za pomocą siRNA powodowało obniżenie poziomu translacji genu reporterowego, posiadającego wydłużone ciągi CAG. Efekt ten nie był obserwowany w przypadku powtórzeń CAA. Pokazano również, że mRNA ataksyny-3 oddziałuje z białkiem MID1 przez powtórzenia CAG w sposób zależny od ich długości – im dłuższe powtórzenia tym więcej wiąza one białka. Reasumując, zaobserwowana zwiększona translacja zmutowanego RNA ataksyny-3, wynikająca z rekrutacji białka MID1 przez powtórzenia CAG może prowadzić do akumulacji patogennego białka i przyczyniać się w ten sposób do rozwoju patogenezy SCA3 (Krauß *et al.*, 2013; Griesche *et al.*, 2016).

### 1.3.2.3 Indukcja stresu jąderkowego

Deregulacja zachodzącej na terenie jąderka biogenezy rybosomów prowadzi do różnych zaburzeń, w tym do indukcji stresu, jak i apoptozy (Kressler *et al.*, 2010). Wykazano, że ścieżkę tę może indukować także toksyczny transkrypt z powtórzeniami CAG (Tsoi *et al.*, 2012). Nukleolina, jąderkowe białko regulujące transkrypcję rRNA może oddziaływać bezpośrednio z ciągami powtórzeń CAG w RNA, a w wiązaniu tym pośredniczą motywy RRM2 i RRM3 rozpoznające RNA (Tsoi *et al.*, 2012; Durut and Sáez-Vásquez, 2015). Oddziaływanie zmutowanego RNA z nukleoliną uniemożliwia jej wiązanie się do sekwencji promotorowej rRNA (ang. Upstream control element, UCE), co powoduje hipermetylację DNA UCE. Prowadzi to następnie do zahamowania transkrypcji rRNA i akumulacji wolnych białek rybosomalnych, takich jak PpL5, RpL11 i RPL23. Oddziaływanie między tymi białkami a ligazą ubikwityny MDM2 hamuje degradację p53 i skutkuje jego akumulacją w mitochondrium. Oddziaływanie między p53 i antyapoptotycznym białkiem Bcl-xL prowadzi do oligomeryzacji proapoptotycznego białka Bak w błonie mitochondrium, co powoduje uwolnienie cytochromu c, który aktywuje kaskadę kaspaz i indukuje apoptozę komórki (Ryc. 7). Efekty te mogą zostać zniesione poprzez nadekspresję egzogennej nukleoliny, która prowadzi do zahamowania hipermetylacji UCE i przywrócenia transkrypcji pre-rRNA (Tsoi *et al.*, 2012).

Powyższe wyniki stały się punktem wyjścia dla badań, mających na celu opracowanie nowych podejść terapeutycznych w chorobie SCA3. Skupiono się na poszukiwaniu inhibitorów peptydowych, które mogłyby wiązać się do struktury spinki tworzonej przez powtórzenia CAG i blokować oddziaływanie z nukleoliną. Syntetyczny peptyd P3, opracowany w oparciu o sekwencję RRM2 nukleoliny, wiąże się bezpośrednio do ciągów CAG w RNA prowadząc do uwolnienia nukleoliny i przywrócenia transkrypcji pre-rRNA. Komórki HEK293 z ekspresją 78 CAG w 3'UTR genu EGFP, traktowane peptydem P3, wykazywały zwiększone oddziaływanie nukleoliny z UCE, skutkujące zwiększonym poziomem pre-RNA, 18S rRNA, redukcją hipermetylacji UCE, poziomu białka p53 i aktywności kaspazy 9 w porównaniu do komórek nietraktowanych (Zhang *et al.*, 2016). Z kolei inhibitor BIND (ang. Beta-structured inhibitor for neurodegenerative diseases), zaprojektowany również w oparciu o RRM2 nukleoliny, ale o strukturze sztywniejszej od P3, potrafił hamować stres jąderkowy *in vivo*. W modelu *D. melanogaster*, z ekspresją specyficzną w oku zawierającym w 3' UTR 100 CAG genu reporterowego DsRED podanie BIND hamowało degenerację siatkówki i przywracało ekspresję pre-rRNA (Zhang *et al.*, 2018).

Reasumując indukcja stresu jądrowego przez uniemożliwienie nukleolinie interakcji z UCE i hamowanie w ten sposób ekspresji genów rRNA mogłaby być jedną z ścieżek prowadzących do apoptozy komórki w patogenezie SCA3 (Tsoi *et al.*, 2012).

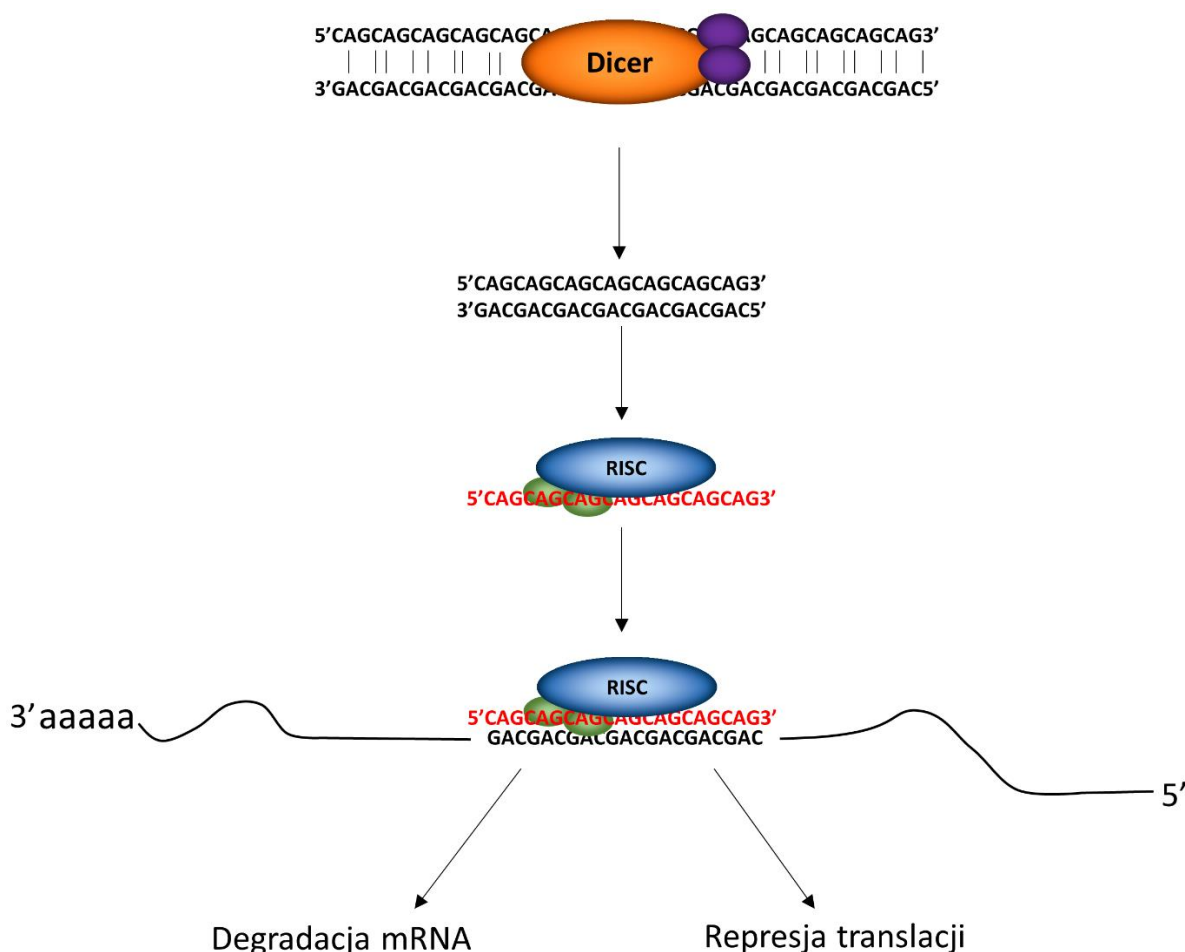


**Rycina 7. Stres jądrowy indukowany przez toksyczne oddziaływanie nukleoliny ze zmutowanym RNA ataksyny-3 (Tsoi *et al.*, 2012).**

#### 1.3.2.4 Ścieżka interferencji RNA

Interferencja RNA służy komórce do obrony przed wirusowym RNA i regulacji natywnej ekspresji. Podczas tego procesu prekursor dsRNA (ang. double stranded RNA) są poddawane obróbce w jądrze komórkowym i eksportowane do cytoplazmy, gdzie wiążą się z Dicer, który tnie długie dsRNA na krótsze, ok 22 nt fragmenty (Bernstein *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 2003). Produkty tego cięcia asocjują następnie z białkiem Ago – komponentem kompleksu wyciszającego RISC – prowadząc do specyficznego wyciszenia ekspresji celowanych genów przez degradację ich mRNA lub hamowanie translacji (Hammond *et al.*, 2000, 2001; Zamore *et al.*, 2000). Ze względu na to, że struktury tworzone przez trójnukleotydydowe ciągi powtórzeń w RNA przypominają struktury tworzone przez dsRNA postuluje się, że mogłyby one być substratami dla Dicer. Zgodnie z hipotezą (Krol *et al.*, 2007) powstałe w wyniku cięcia krótsze fragmenty są załadowywane do kompleksu RISC. Następnie

dochodzi do wyciszenia ekspresji genów, zawierających komplementarne powtórzenia, co mogłoby prowadzić do śmierci komórki (Ryc. 6) (Krol *et al.*, 2007; Song and Rossi, 2017). Zjawisko to zostało na początku zaobserwowane dla powtórzeń CGG w zespole łamliwego chromosomu X (Handa *et al.*, 2003). Toksyczność krótkich RNA powstałych najprawdopodobniej z cięcia przez Dicer długich ciągów powtórzeń CAG i obserwowana w komórkach SH-SY5Y była blokowana przez antysensowe oligonukleotydy skierowane na powtórzenia CAG. Potwierdzałyby to bezpośredni udział ich i zmutowanego RNA w obserwowanej toksyczności (Bañez-Coronel *et al.*, 2012). Ponadto, podane w wysokim stężeniu komórkom HeLa krótkie RNA (7 lub 20 powtórzeń CAG) zmieniały splicing genów INSR i SERCA1 – analogicznie do zmian wywoływanych przez transkrypt zmutowanej ataksyny-3 (Mykowska *et al.*, 2011).



**Rycina 6.** Schemat działania toksycznego RNA na ścieżce interferencji RNA (Nalavade *et al.*, 2013; Chan, 2014).



Toksyczność krótkich RNA składających się z powtórzeń została też zaobserwowana w innych liniach komórkowych. Podanie ludzkim i mysim komórkom nowotworowym dupleksu złożonego z powtórzeń CAG i CUG (siCAG/CUG) powoduje zmiany morfologiczne, zatrzymanie proliferacji i prowadzi do śmierci (Murmam *et al.*, 2018). Eksperymenty polegające na podaniu krótkich RNA do różnych linii komórek nowotworowych pokazały, że obserwowana toksyczność jest niezależna od tkanki czy linii komórkowej. Wyciszenie ekspresji Ago2 niemalże zupełnie znosiło efekty podania siCAG/CUG, co sugeruje, że mechanizm RNAi jest zaangażowany w obserwowaną toksyczność. Ponadto modyfikacja nici z powtórzeniami CAG w dupleksie siCAG/CUG, uniemożliwiająca jej wiązanie się z RISC znacząco redukowała toksyczność tego siRNA. Analogiczne modyfikacje w nici CUG nie wywierały prawie żadnego efektu, co mogłoby oznaczać, że za toksyczność siCAG/CUG w głównej mierze odpowiedzialne są ciągi CAG. Natomiast gdy obydwie nici były zmodyfikowane siCAG/CUG nie wykazywał żadnej toksyczności, co wskazuje, że do jej wystąpienia wymagany jest udział RISC, a więc, że mechanizm RNAi jest najprawdopodobniej odpowiedzialny za obserwowaną cytotoxycznosc. Analizy RNA-seq pokazały, że w komórkach, którym podano siCAG/CUG znajduje się około 12 razy więcej wyciszonych genów, które są kluczowe dla funkcjonowania komórki w porównaniu do kontroli. Działanie siCAG/CUG zostało też sprawdzone u myszy z nowotworem jajników. Okazało się, że siCAG/CUG powstrzymywał ekspansję guza, lecz nie powodował jego eliminacji (Andrea E Murmam *et al.*, 2018). Podobne obserwacje zostały poczynione wcześniej w *D. melanogaster*, gdzie równoczesna ekspresja nieulegających translacji ciągów CAG i CTG prowadziła do degeneracji oka i śmierci. Badacze na podstawie analiz Northern blot krótkich RNA sugerują, że może dochodzić do parowania ciągów CAG i CTG, a następnie ich obróbki do krótkich fragmentów. Obserwowana toksyczność była zależna od Ago2 i Dcr2 (enzym tnący dwuniciowe RNA w biogenezie siRNA u muszki owocowej) i wzmacniana przy stymulacji ekspresji *dcr2*. Analizy qPCR pokazały, że u muszek z koekspresją ciągów CAG i CTG mRNA zawierające powtórzenia CAG były wyciszane w około 60-70% (Yu *et al.*, 2011).

Reasumując, krótkie RNA składające się z powtórzeń CAG są toksyczne dla komórek. Jednak nie jest do końca jasne i wymaga to dalszych badań aby potwierdzić, czy rzeczywiście dochodzi do cięcia struktury spinki utworzonej z ciągów CAG przez Dicer i powstawania siRNA, mogących wyciszać geny zawierające powtórzenia.

### 1.3.2.5 Przesunięcie ramki odczytu i RAN translacja

W świetle ostatnich doniesień okazuje się, że zmutowany transkrypt może zaburzać proces translacji przez indukcję niekanonicznych zdarzeń translacyjnych. Jest to kolejny postulowany mechanizm toksyczności RNA w SCA3. W modelach komórkowych SCA3 znaleziono kilka wariantów białek odpowiedzialnych za rozwój choroby, które powstały z alternatywnych ramek odczytu genu ataksyny-3. Ich powstawanie można wytłumaczyć przesunięciem ramki odczytu, które polega na zmianie fazy w jakiej rybosom odczytuje kod genetyczny podczas procesu translacji. Hipoteza przesunięcia ramki odczytu została zasugerowana na podstawie badań z użyciem przeciwciał skierowanych na koniec C białka w różnych ramach odczytu. W linii komórkowej COS-7 transfekowanej pełnej długości zmutowaną ataksyną-3 zaobserwowano akumulację białek polialaninowych (poliA), które były toksyczne dla komórek, powodując zaburzenia struktury jądra komórkowego i tworzenie się agregatów w cytoplazmie. W przeciwieństwie do powolnej i progresywnej akumulacji zaobserwowanej w komórkach transfekowanych zmutowaną ataksyną-3 z ciągami CAG, transfekcja ataksyną-3 z ciągami GCA kodującymi alaninę prowadziła do wczesnej, gwałtownej akumulacji białek polialaninowych i ostrzejszego fenotypu (Gaspar *et al.*, 2000). Ponadto pokazano, że przesunięcie ramki odczytu i ekspresja ataksyny-3, zawierającej ciągu poliA są czynnikami kluczowymi, które przyczyniają się do neurodegeneracji i zaniku pigmentacji oka u *D. melanogaster*. Ekspresja jedynie ataksyny-3 z ciągiem poligQ nie była wystarczająca, aby zaobserwować toksyczny fenotyp u muszki. Wyniki te zdają się również potwierdzać badania przeprowadzone w komórkach Purkiniego myszy, transfekowanych konstrukcjami ataksyny-3 z powtórzeniami CAG, z których powstawały białka poliA. Wykazywały one zmienioną morfologię, silniejszą degenerację i śmiertelność. Tymczasem komórki transfekowane ataksyną-3 z ciągami CAA, gdzie nie było obecnych białek poliA wykazywały, mimo obecności agregatów, identyczną przeżywalność jak komórki kontrolne. (Stochmanski *et al.*, 2012; Wojciechowska *et al.*, 2014). Obecność białek poliA zaobserwowano również w komórkach limfoblastoidalnych i skrawkach z mózgow pacjentów ze SCA3 (Gaspar *et al.*, 2000).

Częstotliwość przesunięcia ramki odczytu wywołana ciągami CAG w SCA3 wydaje się być zależna od ich długości i jest wykrywana od około 60 powtórzeń. Liczba inkluzji jądrowych, zawierających białka powstałe z przesunięcia ramki odczytu zwiększa się wraz z liczbą powtórzeń i nie zależy od sekwencji ich flankujących. Ponadto wydaje się, że do przesunięcia ramki odczytu nie dochodzi w jednym, ściśle określonym miejscu na sekwencji

powtórzeń. Powstające w wyniku tego procesu białka mogą posiadać więc różną długość ciągu poliA (Gaspar *et al.*, 2000; Toulouse *et al.*, 2005; Wills and Atkins, 2006). W linii komórkowej COS-1, z ekspresją skróconej formy zmutowanej ataksyny-3, wykryto tylko białka poliA powstałe z przesunięcia ramki o 1 nukleotyd przeciwnie do kierunku translacji (-1). Sugeruje to, że w SCA3 dochodzi tylko do jednego rodzaju przesunięcia ramki odczytu. Ponadto, w przeciwieństwie do ciągów CAG, zjawisko to nie było obserwowane dla ataksyny-3 z ciągami CAA (Toulouse *et al.*, 2005). Z tego powodu proponuje się, że struktura spinki tworzona przez powtórzenia CAG może stymulować przesunięcie ramki odczytu przez zatrzymywanie rybosomu. Innym wyjaśnieniem jest hipoteza mówiąca o ślizganiu się rybosomu na sekwencjach powtórzeń. Ostatecznie mechanizm, w wyniku którego powtórzenia CAG powodowałyby przesunięcie ramki odczytu pozostaje do rozwiązania (Wojciechowska *et al.*, 2014).

Innym postulowanym wyjaśnieniem powstawania alternatywnych białek w komórkach SCA3, może być RAN translacja. Wykazano, że wydłużonych ciągach powtórzeń CAG, CGG i GGGGCC zlokalizowanych w niekodujących regionach genu i w nieobecności kodonu ATG może dochodzić do syntezy białek z różnych ramek odczytu (Zu *et al.*, 2011; Wojciechowska *et al.*, 2014). W wyniku tego procesu powstają białka zawierające wydłużone trakty reszt określonych aminokwasów. Zjawisko to zaobserwowano do tej pory w takich chorobach neurodegeneracyjnych związanych z ekspansją powtórzeń, jak: SCA8, DM1, FXTAS i C9ALS/FTD (Wojciechowska *et al.*, 2014). Obecnie w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej (ZBM) w ramach projektu SONATA trwają badania nad RAN translacją w SCA3.

### **1.4 Modele chorobowe służące do badania patogenezy SCA3, w tym określenia roli RNA**

W celu określenia patomechanizmu SCA3 powstały zarówno modele oparte na prostych organizmach takich jak *C. elegans* i *D. melanogaster*, jak i bardziej złożone modele ssacze. Wiele modeli SCA3 przygotowano również w komórkach (Matos *et al.*, 2011; Fiszer and Krzyzosiak, 2013; Schmidt and Schmidt, 2018). Wygenerowane do tej pory modele zwierzęce są transgeniczne, ponieważ żaden organizm modelowy nie rozwija naturalnie fenotypu SCA3 z powodu czasu jaki jest na to potrzebny. Ponadto, aby zaobserwować objawy chorobowe u krótko żyjących zwierząt stosowane są bardziej patogenne warianty ataksyny-3, jak na przykład te z dłuższym ciągiem powtórzeń. (Fiszer and Krzyzosiak, 2013; Schmidt and Schmidt, 2018).

### 1.4.1 Modele SCA3 w *C. elegans*

65% ludzkich genów odpowiedzialnych za choroby genetyczne, w tym ataksyna-3 posiada homologu w *C. elegans*. Ponadto, znane interakcje ludzkiej ataksyny-3, jak te między ataksyną a p97/VCP, są też obecne u *C. elegans*, co czyni go dobrym organizmem modelowym SCA3 (Warrick *et al.*, 2005).

W stworzonych do tej pory modelach *C. elegans* ekspresji ulega pełnej długości ataksyna-3 lub jej C-końcowy fragment wraz z regionem powtórzeń CAG. W celu wizualizacji i analiz agregacji białka badacze stosują ataksynę-3 w fuzji z białkiem GFP (ang. green fluorescent protein, białko zielonej fluorescencji) lub YFP (ang. yellow fluorescent protein, białko żółtej fluorescencji). W większości modeli, dzięki zastosowaniu promotorów tkankowo-specyficznych, ekspresja ataksyny-3 zachodzi wyłącznie w układzie nerwowym, bądź też jest kierowana do mięśni, gdzie również może wywołać toksyczne efekty (Christie *et al.*, 2014; Nóbrega and Pereira de Almeida, 2018). W pierwszych stworzonych modelach okazało się, że aby spowodować agregację ataksyny-3 i pojawienie się fenotypu u *C. elegans*, niezbędna jest ekspresja pełnej długości ataksyny z bardzo długim ciągiem powtórzeń, zawierającym 130 Q lub C-końcowego fragmentu białka z przynajmniej 63 Q. Natomiast, pełnej długości ataksyna-3 z 91 lub mniejszą liczbą reszt glutaminy nie ulega agregacji w tym organizmie modelowym (Khan *et al.*, 2006). Nicienie, w wyniku ekspresji zmutowanej ataksyny-3, bądź jej fragmentu, rozwijają łatwy do obserwacji fenotyp, którego cechami charakterystycznymi są zaburzenia motoryczne i tworzenie się agregatów białkowych (Khan *et al.*, 2006; Teixeira-Castro *et al.*, 2011; Bonanomi *et al.*, 2014; Christie *et al.*, 2014). Pojawiające się dysfunkcje motoryczne są ściśle skorelowane z agregacją ataksyny-3. C-końcowy fragment tego białka jest bardziej skłonny do agregacji niż pełnej długości ataksyna-3, o czym może świadczyć to, że obecność ciągu 75 Q powoduje agregację tylko gdy znajduje się w fragmencie ataksyny, a nie w pełnej długości białku (Teixeira-Castro *et al.*, 2011). Z tego powodu nicienie z ekspresją skróconych form zmutowanej ataksyny-3 rozwijają wcześniejszy i ostrzejszy fenotyp niż te z ekspresją pełnej długości białka (Khan *et al.*, 2006; Teixeira-Castro *et al.*, 2011).

Ponadto czynnikiem, który wpływa na fenotyp SCA3 u nicieni jest długość ciągu poliQ. Toksyczne efekty wywołane przez C-końcowe fragmenty ataksyny-3 są skorelowane z liczbą powtórzeń, ponieważ poziom tworzenia się agregatów białkowych jest wprost proporcjonalny do długości ciągu poliQ. Ekspresja C-końcowego fragmentu ataksyny-3 z długim ciągiem poliQ (około 130 Q) daje, w porównaniu z krótszymi ciągami lub zmutowanym białkiem pełnej długości, ostrzejsze fenotypy, które rozwijają się wcześniej i objawiają się silniejszą agregacją

zmutowanego białka, jeszcze większymi zaburzeniami motorycznymi i defektami w procesie składania jaj (Khan *et al.*, 2006; Teixeira-Castro *et al.*, 2011; Christie *et al.*, 2014).

Głównymi wnioskami wysnutymi na podstawie badań patogenezy SCA3 w modelach *C. elegans* jest to, że toksyczność ataksyny-3 jest skorelowana i wprost proporcjonalna do długości ciągu CAG a także to, że fragmenty ataksyny są bardziej toksyczne od pełnej długości zmutowanego białka. Wpisuje się to w przedstawioną wcześniej hipotezę toksycznych fragmentów.

### *1.4.2 Modele SCA3 w D. melanogaster*

Modele *D. melanogaster* rozwijają łatwy do obserwacji fenotyp, a także charakterystyczny profil neurodegeneracji, co czyni je atrakcyjnymi do badania niektórych aspektów patogenezy SCA3. Oczy *D. melanogaster* stały się powszechnie akceptowalnym modelem do badań procesu degeneracji w różnych chorobach związanych z toksycznością białek i RNA, jak np. HD, choroba Alzheimera, C9ALS/FTD, FXTAS, SCA3 i SCA1 (Sang and Jackson, 2005; McGurk *et al.*, 2015; Sutton *et al.*, 2017; Nóbrega and Pereira de Almeida, 2018). Ponad połowa ludzkich genów posiada swoje odpowiedniki u *D. melanogaster*, niestety nie dotyczy to ataksyny-3. Jednakże modele muszki z ekspresją C-końcowego fragmentu lub pełnej długości zmutowanej ataksyny-3 odzwierciedlają niektóre cechy SCA3 występujące u ludzi, takie jak tworzenie się inkluzji jądrowych i neurodegenerację. W tworzonych modelach *D. melanogaster* pełnej długości ataksyna-3 bądź jej C-końcowy fragment ulegała specyficznej ekspresji w oczach lub w układzie nerwowym, bądź zachodziła we wszystkich komórkach organizmu. Charakterystycznymi cechami fenotypu muszki, rozwijanymi w wyniku ekspresji zmutowanej ataksyny-3 jest tworzenie się inkluzji jądrowych, degeneracja oka i skrócone życie. Ostra i progresywna neurodegeneracja obserwowana u dorosłych osobników jest indukowana w wyniku ekspresji w oku lub układzie nerwowym zmutowanej ataksyny-3 pełnej długości z 78 lub 84 Q, lub C-końcowego fragmentu z 78 Q. Ekspresja normalnego białka nie daje takich efektów (Warrick *et al.*, 1998, 2005).

Badania prowadzone na *D. melanogaster* skupiają się głównie na znalezieniu czynników, mogących mieć udział w procesie patogenezy SCA3, albo być potencjalnym celem w terapii tej choroby. Pokazano, że koekspresja normalnej ataksyny-3 opóźniała lub nawet chroniła przed pojawieniem się toksyczności wywołanej przez C-końcowy fragment lub pełnej długości zmutowanej ataksyny-3. Efekt ten był zależny zarówno od motywów UIM jak i aktywności deubikwitynylującej normalnej ataksyny-3 (Warrick *et al.*, 2005). Na modelu muszki pokazano też, że zaburzenie miejsc cięcia dla kaspaz w ulegającej ekspresji zmutowanej

ataksyny-3 zapobiega powstawaniu krótkich fragmentów białka, co osłabia jego toksyczność wobec komórek neuronalnych, lecz nie powstrzymuje tworzenia się inkluzji jądrowych (Jung *et al.*, 2009). Z kolei, w badaniach przesiewowych linii *D. melanogaster* znaleziono 18 genów, mogących modulować toksyczność ataksyny-3. Większość z nich należała do białek opiekuńczych i komponentów UPS. Na podstawie tych badań autorzy postulują, że białka te mają funkcje ochronne i mogą zmniejszać akumulację białka w inkluzjach jądrowych, utrzymywać funkcjonowanie komórki w obecności nieprawidłowo sfałdowanych białek lub stymulować przeżywalność komórek neuronalnych przez regulację autofagii (Bilen and Bonini, 2007). Jest to zgodne z badaniami, w których zaobserwowano, że poziom agregacji ataksyny-3 może być skorelowany z jej toksycznością u *D. melanogaster* (Vinatier *et al.*, 2015). Ponadto, na tym organizmie modelowym pokazano, że na agregację zmutowanej ataksyny-3 wpływa białko VCP/p97. Mutacja w ataksynie-3 w miejscu oddziaływania z VCP/p97 lub wyciszenie VCP w oku *D. melanogaster* osłabiały obserwowany fenotyp, najprawdopodobniej przez spowolnienie procesu agregacji zmutowanego białka (Ristic *et al.*, 2018). Innymi czynnikami mogącymi wpływać na toksyczność ataksyny-3 u *D. melanogaster* jest RAD23 (białko zaangażowane w naprawę DNA i działanie UPS). Oddziałuje z nim drugie miejsce wiązania ubikwityny znajdujące się w domenie Josephin ataksyny-3, co chroni zarówno normalną jak i zmutowaną ataksynę-3 przed degradacją (Blount *et al.*, 2014). Z drugiej strony mutacja tego miejsca oddziaływania w ataksynie obniża jej poziom u *D. melanogaster*, lecz powoduje, że staje się ona bardziej toksyczna (Warrick *et al.*, 2005; Sutton *et al.*, 2017).

### 1.4.3 Modele SCA3 w *M. musculus*

Myszy wykazują wysokie homologie sekwencji genomowych w stosunku do człowieka i są do niego zbliżone pod względem fizjologicznym. (Perlman, 2016). Stworzone mysie modele SCA3 odzwierciedlają wiele cech tej choroby obserwowanych u pacjentów i umożliwiają badanie bardziej złożonych fenotypów w porównaniu do *D. melanogaster* i *C. elegans*. Co ważne możliwe jest u nich badanie procesu neurodegeneracji w mózgu. W prawie wszystkich stworzonych do tej pory mysich modelach SCA3 ekspresji ulega pełnej długości mysia ataksyna-3 bądź jej C-końcowy fragment. W większości modeli zmutowane białko ulega ekspresji specyficznemu w mózgu lub konstytutywnie we wszystkich komórkach ciała. Istnieją także modele z ekspresją zmutowanej ataksyny-3 tylko w komórkach Purkiniego, jednak jak wiadomo pacjenci SCA3 wykazują neurodegenerację w wielu obszarach, nie tylko w mózdzku. Fenotypy rozwijane przez myszy są zróżnicowane pod względem nasilenia jak i czasu potrzebnego do ich rozwinięcia. Czynniki, które odgrywają tu główną rolę są siła promotora

i długość ciągu CAG. Szybsze fenotypy są osiągnięte przy zastosowaniu silnych promotorów lub dłuższych ciągów powtórzeń, natomiast fenotypy objawiające się późno, są charakterystyczne dla modeli, w których ekspresja zmutowanej ataksyny-3 jest kontrolowana przez endogenne promotory. Jest to zapewne związane z tym, że patogeneza SCA3 jest inicjowana dopiero po przekroczeniu przez białko pewnego krytycznego stężenia, natomiast dłuższe ciągi sprzyjają procesowi agregacji ataksyny-3 (Goti *et al.*, 2004; Paulson, 2012a; Nóbrega and Pereira de Almeida, 2018). Progresywny fenotyp rozwijany u transgenicznych myszy SCA3 objawia się zmianami behawioralnymi i histopatologicznymi. Najbardziej charakterystycznymi zmianami wykazywanymi przez myszy są problemy z chodzeniem, zła postawa ciała i zmiany neuropatologiczne w postaci zaniku komórek neuronalnych i tworzenia się inkluzji jądrowych (Ikeda *et al.*, 1996; Silva-Fernandes *et al.*, 2014; Nóbrega and Pereira de Almeida, 2018). Problemy z postawą ciała mogą u myszy być związane z degeneracją mózdzku, gdyż zwierzęta z ekspresją zmutowanej ataksyny-3 tylko w tym obszarze mózgu, wykazywały zaburzenia motoryczne podczas wykonywanych testów behawioralnych (Yamaura *et al.*, 2013).

Pierwszym mysim modelem do badania SCA3 była mysz MJD79 z ekspresją pełnej długości ataksyny z 79Q, specyficznie w komórkach Purkiniego. Do 23 tygodnia – przez cały czas obserwacji, myszy te nie wykazały żadnego fenotypu. Podobnie jak myszy z ekspresją C-końcowego fragmentu ataksyny z 35Q. Dopiero myszy z ekspresją C-końcowego fragmentu ataksyny-3 z 79Q wykazały problemy z chodzeniem i neuropatologię w postaci zaniku mózdzku (Ikeda *et al.*, 1996). Starając się lepiej odzwierciedlić sytuację jaka ma miejsce w komórkach ludzkich Cemal i wsp. 2002 stworzyli mysz model SCA3 za pomocą sztucznego chromosomu drożdżowego. Jego dużą zaletą jest to, że ekspresja zmutowanej ataksyny-3 jest kontrolowana przez jej naturalny promotor i elementy regulatorowe. Sprawia to, że poziom ekspresji transgenu jest zbliżony do poziomu endogennej mysiej ataksyny a sam model lepiej odzwierciedla obraz patogenezy SCA3. Myszy te zaczynały rozwijać progresywny fenotyp od czwartego tygodnia życia, który charakteryzował się złą postawą, problemami z chodzeniem jak i utratą komórek w móście i jądrach mózdzku. Ponadto nasilenie objawów było skorelowane z liczbą powtórzeń. (Cemal *et al.*, 2002). Badanie poziomu ekspresji genów tych myszy wykonane niedawno przez inną grupę badawczą wykazało, że mają one zmienioną ekspresję wielu genów w mózgu. Najbardziej zaburzone okazały się ścieżki sygnałowe CREB (odpowiedzialna za plastyczność synaptyczną i wzrost aksonów) i  $\alpha$ -adrenergiczna (odpowiedzialna za utrzymanie prawidłowej homeostazy komórkowej). Ze względu na to, że

zmiany te pojawiają się przed wystąpieniem zaburzeń motorycznych, mogą one odzwierciedlać wczesne procesy patogenezы SCA3 (Lodewijk J. A. Toonen *et al.*, 2018).

Wpływ długości ciągu powtórzeń CAG i siły promotora, na rozwijany fenotyp oraz czas jego pojawienia się u zwierząt, dobrze obrazuje porównanie modeli stworzonych przez Bichelmieier 2007 i Boy 2010. Bichelmieier stworzył model myszy z ekspresją ataksyny-3, zawierającej 70 lub 148Q pod kontrolą fragmentu promotora białka prionowego, który prowadzi do mocniejszej ekspresji transgenу. Progresja i ostrość syndromów korelowały z długością ciągu poliQ. Dla myszy z ekspresją ataksyny-3 zawierającej 70Q pojawiły się po 5-6 miesięcy, a dla tych z ekspresją ataksyny zawierającej 148Q po dwóch miesiącach. Obserwowano degenerację komórek Purkiniego, inkluzje jądrowe zawierające ubikwitynę w neuronach całego mózgu i fenotyp behawioralny: drżenie, chód na rozstawionych nogach, mniejszą aktywność ruchową, zredukowaną wagę i krótszą długość życia. Ponadto lokalizacja komórkowa zmutowanej ataksyny-3 miała bardzo duży wpływ na fenotyp. Kierowanie tego białka do jądra przez dołączenie sygnału NES prowadzi do bardzo lekkiego fenotypu lub nawet braku symptomów behawioralnych, tymczasem dołączenie NLS zaostrza fenotyp i sprawia, że objawy pojawiają się wcześniej (Bichelmeier *et al.*, 2007). Z kolei Boy i wsp. przez zastosowanie szczurzego promotora huntingtyny stworzył model w którym objawy pojawiają się później i nasilają się dużo wolniej. Model ten posiadał pełnej długości ataksyna-3 z 148Q, czyli o identycznej długości ciągu jak w przypadku modelu stworzonego przez Bichelmieier 2007, ale o słabszej ekspresji, która z drugiej strony była powszechna i miała równy poziom w całym mózgu, podobnie jak u ludzi. Myszy te wykazują bardzo słaby i wolniejszy fenotyp, ale przypomina to bardziej sytuację, jaka ma miejsce u ludzi. Objawy motoryczne rozpoczynają się w 12-14 miesiącu życia, czyli dużo później w porównaniu z modelem zaprezentowanym przez Bichelmieier 2007, gdzie zmutowana ataksyna-3 była pod kontrolą silniejszego promotora. Pierwsze symptomy zaobserwować można jeszcze przed pojawieniem się inkluzji jądrowych czy neurodegeneracji, co wskazuje, że mogą one być przyczyną nie tyle utraty komórek neuronalnych ale ich dysfunkcji. Z tego powodu model ten może być ważny z punktu widzenia wczesnych zmian patogennych, mających miejsce jeszcze przed neurodegeneracją. Po rozwinięciu się pełnego fenotypu, u myszy można było zaobserwować inkluzje jądrowe w mózdzku i moście, degenerację komórek Purkiniego, zaburzoną koordynację motoryczną i pamięć mięśniową oraz nadpobudliwość (Boy *et al.*, 2010). Objawy rozwijane przez myszy w tych dwóch modelach są zatem bardzo podobne, różnią się jednak czasem jaki jest potrzebny do ich pojawienia się. Zaletą modelu stworzonego przez Bichelmieier 2007 jest to, że umożliwia on szybkie osiągnięcie fenotypu i jego analizy, robi to jednak za cenę zniekształcenia



prawidłowego obrazu choroby. Z kolei model stworzony przez Boy i wsp. 2010 wydaje się być bardziej adekwatny do badań patogenezy SCA3 ze względu na wolny rozwój fenotypu.

W modelu mysim Ki91, stworzonym za pomocą technologii wstawiania sekwencji DNA do genomu, ekspresji ulega zmutowana ludzką ataksyna-3, co wydaje się wierniej odzwierciedlać sytuację jaka ma miejsce u ludzi w porównaniu z innymi modelami, w których dochodzi do ekspresji mysiej ataksyny-3. Model ten wykazuje późny fenotyp, charakteryzujący się międzypokoleniową niestabilnością powtórzeń, powstawaniem inkluzji jądrowych, degeneracją komórek Purkinjego i zaburzeniami koordynacji motorycznej. Ponadto, podobnie jak w innych chorobach poliQ obserwowany u niego jest zwiększony poziom ekspresji serpiny 3n, białka które jest eksprymowane podczas ostrej fazy zapalenia (Switonski *et al.*, 2015).

### *1.4.4 Modele SCA3 w liniach komórkowych*

W literaturze opisanych jest wiele modeli komórkowych SCA3. Najważniejsze z nich, dające kluczowe informacje odnośnie patogenezy zostały już wspomniane w poprzednich rozdziałach. Modele komórkowe umożliwiają stosunkowo szybkie, w porównaniu do modeli zwierzęcych, badanie molekularnych mechanizmów patogenezy SCA3. Dobrze służą one do badań przesiewowych i sprawdzania hipotez badawczych, umożliwiają też skonstruowanie bardziej złożonych układów do badań oddziaływań między białkami przez co stanowią niemal zawsze etap doświadczeń poprzedzający walidację postulowanych mechanizmów na modelach zwierzęcych.

Wyróżnić możemy trzy rodzaje istniejących modeli komórkowych, w zależności od sposobu ich otrzymania: komórki transfekowane przejściowo wektorami, stabilne linie komórkowe i linie wyprowadzone od pacjentów ze SCA3. Do otrzymania dwóch pierwszych rodzajów używane są zwykle powszechnie stosowane komórki HEK293T, HeLa czy też te wywodzące się z neuroblastoma - nowotworów układu nerwowego, jak SK-N-MC i SH-SY5Y (Mykowska *et al.*, 2011; Tsoi *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013). SCA3 u człowieka rozwija się latami, a pierwsze objawy pojawiają się zwykle w wieku średnim. Stąd w systemach komórkowych mamy do czynienia z takim samym problemem jak w przypadku prostych organizmów modelowych. Nie sposób jest hodować komórek przez wiele lat, stąd potrzebne są sposoby na szybkie uzyskanie fenotypu. W tym celu stosuje się mocniejsze promotory, dłuższe niż występujące u pacjentów ciągi poliQ lub bardziej toksyczne formy białek. Konstrukcjami używanymi do otrzymania modeli komórkowych jest zwykle cDNA ludzkiej ataksyny-3 z długimi ciągami powtórzeń. Badacze używają zwykle około 70 do nawet ponad 140 powtórzeń

(Araujo *et al.*, 2011; Mykowska *et al.*, 2011; Fiszer and Krzyzosiak, 2013; Hubener *et al.*, 2013). Stosowana jest zarówno ataksyna pełnej długości, jak i jej krótsze, bardziej toksyczne C-końcowe fragmenty. W badaniach mikroskopowych, w celu określenia lokalizacji komórkowej, a także w analizie procesu agregacji, toksyczne białko często ulega ekspresji w fuzji z genem reporterowym takim jak GFP. (Mykowska *et al.*, 2011; Tsoi *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013; Hubener *et al.*, 2013). W większości modeli ekspresja zmutowanej ataksyny-3 jest kontrolowana przez silny promotor CMV. Promotor ten jest powszechnie stosowany i dobrze opisany w literaturze, a ponadto zapewnia efektywną ekspresję w wielu liniach komórkowych, co prowadzi do powstania dużych ilości zmutowanego białka w komórce w krótkim czasie umożliwiając stosunkowo szybką obserwację efektów patogennych. Ponadto, trzeba też pamiętać, że modele komórkowe są pewnym uproszczeniem i przy badaniach należy mieć na uwadze ich ograniczenia. W modelach, do których otrzymania stosowana była przejściowa transfekcja wyniki w dużej mierze zależą od efektywności tego procesu. Z kolei w stabilnych liniach komórkowych pojawia się problem kontekstu genetycznego – nie wiadomo w jakim miejscu zintegruje się nasz transgen i jak może to wpłynąć na prowadzone obserwacje.

Modele komórkowe wyprowadzone od pacjentów SCA3 pochodzą zwykle z komórek skóry – fibroblastów. Ich zaletą jest niewątpliwie to, zachodzą w nich oryginalne procesy patogenez. Natomiast nie są to komórki układu nerwowego, przez co z całą pewnością nie będą one odzwierciedlały wszystkich aspektów SCA3 (Mykowska *et al.*, 2011). Z tego powodu stosowana jest technologia indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs, ang. induced pluripotent stem cells), która umożliwia wyprowadzenie z fibroblastów komórek iPSCs a następnie zróżnicowanie ich do neuronów określonego typu. Takie postępowanie umożliwia pozyskanie komórek, które teoretycznie najwierniej odzwierciedlałyby procesy patogenez zachodzące u pacjentów ze SCA3. Jednak problemem jest dobranie odpowiednich kontroli. Stosuje się tutaj komórki od ludzi zdrowych ale, ze względu na tło genetyczne i różnice osobnicze, jak wiek czy płeć, analiza danych może być również zaburzona (Koch *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2016; Evert *et al.*, 2018).

### *1.4.5 Modele do badań toksyczności RNA*

Do dziś powstało niewiele modeli obrazujących toksyczność RNA w SCA3 (Tab. 1). Jak do tej pory modele do badań toksyczności RNA przygotowywano w *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* i systemach komórkowych. Badanie toksyczności RNA w SCA3 jest jeszcze trudniejsze niż ogólnej patogenez tej choroby. Do wspomnianych wcześniej

problemów związanych z cechami tej choroby, takimi jak długi czas potrzebny do jej rozwoju, dołącza jeszcze jeden, sprawiający największą trudność. Mutacja odpowiedzialna za patogenezę SCA3 znajduje się w otwartej ramce odczytu, stąd toksyczność białka nakłada się z potencjalną toksycznością RNA i nie jest możliwe zbadanie dokładnych relacji występujących między tymi czynnikami patogennymi. Nie wiadomo, na których ścieżkach działają osobno, a na których ich efekty mogą się na siebie nakładać.

W powstałych do tej pory modelach mających na celu określenie roli RNA w SCA3 ekspresji ulegają długie ciągi powtórzeń CAG mające potencjał do wywołania patologii. W badaniach toksyczności RNA, podobnie jak w przypadku toksyczności białka do uzyskania fenotypu u modelowych zwierząt w których normalnie nie rozwija się SCA3 potrzebne jest zastosowanie silniejszych promotorów lub dłuższych ciągów powtórzeń. W większości modeli stosuje się promotory tkankowo-specyficzne, tak aby transgen ulegał ekspresji w miejscach gdzie może wywołać efekty patogenezy, na przykład dla *D. melanogaster* jest to oko lub układ nerwowy a dla *C. elegans* mięśnie (Lawlor *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Ponadto w swoich eksperymentach badacze stosują różne warianty transgenów różniące się długością i rodzajem ciągu powtórzeń. Autorzy poszukują w ten sposób zależności między tymi dwiema zmiennymi a toksycznością badanego transkryptu. Badacze starają się zapewnić równy poziom ekspresji poszczególnych transgenów, chcąc w ten sposób pokazać, że obserwowane przez nich fenotypy wynikają z obecności patogennego ciągu powtórzeń, a nie z różnic w poziomie ekspresji poszczególnych transkryptów (Hsu *et al.*, 2011; Mykowska *et al.*, 2011; Shieh and Bonini, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Dla badań toksyczności RNA oprócz odpowiedniego promotora, do uzyskania patogennego fenotypu kluczowa jest też długość ciągu powtórzeń CAG. Dobrze obrazuje to model *C. elegans*, gdzie w 3' UTR genu GFP ekspresji ulegał ciąg powtórzeń CAG o różnej długości (0, 5, 30, 83, 125, 200). Większość nicieni z ekspresją ciągu 200 CAG nie wykluła się z jaj, natomiast reszta z nich żyła zaledwie 5 dni. Nicienie z ekspresją ciągu 125 CAG żyły krócej, wykazywały zaburzenia funkcji mięśni, wynikające z tego nieskoordynowane ruchy i mniej liczne potomstwo. Nicienie z ekspresją ciągu 86 CAG wykazywały jedynie krótszą długość życia. Obserwacje te świadczą o związku między toksycznością RNA a długością ciągu CAG (Wang *et al.*, 2011). Co więcej, wyraźnie da się zauważyć, że dla tego organizmu modelowego istnieje przedział w jakim powinna się mieścić liczba powtórzeń. Zbyt długi ciąg CAG jest praktycznie letalny dla tych zwierząt.

Tabela 1. Modele wykorzystywane do badania patogenicznych właściwości zmutowanego RNA.

Model/ Długość powtórzeń	Kontekst genetyczny	Translacja	Ekspresja	Wnioski	Referencja
<i>C. Elegans</i> 5, 30, 83, 125, 200 CAG	3'UTR genu GFP	nie	mięśnie	Śmiertelność wprost proporcjonalna do długości ciągu CAG	Wang et al. 2011
<i>D. Melanogaster</i> 78 CAG i 78 CAG/CAA	C-końcowy fragment ataksyny-3	tak	oko, układ nerwowy	RNA z długimi ciągami CAG powoduje neurodegenerację	Li et al. 2008
0, 100 CAG i 250 CAG	3'UTR dsRED	nie			
84 CAG i 81 CAG/CAA	Pełnej długości ataksyna-3	tak			
<i>D. Melanogaster</i> 93CAG i 114CAA	3'UTR niespecyficznego sekwencji	nie	oko, układ nerwowy	RNA zawierające długie, nieulegające translacji ciągi CAG zaburza ścieżkę sygnałową Akt/Gsk3-β	van Eyk et al. 2011
93CAG i 94CAA	nie specyficzna sekwencja	tak			
<i>D. Melanogaster</i> 27, 78 CAG i 78CAG/CAA	C-końcowy fragment ataksyny-3	tak	oko	Ścieżka eksportu RNA, w której uczestniczy NXF1/U2AF65 jest zaangażowana w efekty wywołane przez RNA z długim ciągiem CAG	Tsoi et al. 2011
<i>D. Melanogaster</i> 0, 100, 250CAG i 105 CAG/CAA	3'UTR genu dsRED	nie	układ nerwowy	Ekspresja RNA zawierającego 100 CAG wpływa na zmianę ekspresji 160 genów	Shieh et al. 2011
<i>D. Melanogaster</i> 100 CAG	5' UTR genu <i>cheerio</i>	nie	oko, układ nerwowy, powszechna	Koekspresja transkryptów z ciągami CAG i CUG prowadzi do neurodegeneracji, w której pośredniczy mechanizm interferencji RNA	Lawlor et al. 2011
<i>D. Melanogaster</i> 78CAG i 78CAG/CAA	C-końcowy fragment ataksyny-3	tak	oko	Obecność zmutowanego RNA prowadzi do apoptozy przez indukcję ścieżki stresu jądrowego	Tsoi et al. 2012
<i>D. Melanogaster</i> 4x100CUG, 4x100CAG lub 4x100CAA	5' UTR genu GFP	nie	powszechna	Ekspresja RNA z ciągami CAG lub CUG, ale nie CAA, powoduje defekty morfologiczne	Lawlor et al. 2012
<i>M. Musculus</i> 23 i 200 CAG	3' UTR genu EGFP	nie	mięśnie szkieletowe	Ekspresja długich ciągów CAG powoduje zmiany miopatyczne	Hsu et al. 2011
SK-N-MC 69 CAG	Pełnej długości ataksyna 3 w fuzji z EGFP	tak	CMV, stabilna linia	Ekspresja długich, nieulegających translacji ciągów CAG powoduje zaburzenia alternatywnego splicingu podobne do tych opisanych dla ciągów CUG	Mykowska et al. 2011
SK-N-MC, HeLa 5, 30, 74 i 200CAG	3'UTR EGFP	nie	CMV, stabilne linie		
HEK293 78CAG i 78CAG/CAA	C-końcowy fragment ataksyny-3	tak	CMV, prześciowa transfekcja	Toksyczne RNA prowadzi do apoptozy przez indukcję ścieżki stresu jądrowego	Tsoi et al. 2012

Ponadto, powyższe obserwacje mogą poddawać w wątpliwość słuszność stosowania bardzo długich ciągów powtórzeń, gdyż możliwe, że mogą one wywołać efekty, które normalnie nie mają miejsca w patogenezie SCA3 (Wang *et al.*, 2011).

Zależność pomiędzy długością ciągu CAG a toksycznością RNA zaobserwowano też w modelu mysim. Był to pierwszy model, który pokazał, że nieulegające translacji powtórzenia CAG mogą być toksyczne w organizmie ssaczym. W modelu tym ciąg 200 CAG znajdował się w rejonie 3'UTR białka EGFP. Transgen ulegał ekspresji specyficznemu w tkance mięśniowej. Myszy, w przeciwieństwie do kontroli z ciągiem 23 CAG, bądź bez ciągu, wykazały zmienioną morfologię mięśni, zmiany histochemiczne i elektrofizjologię jak i zmiany behawioralne. Ponadto, w jądrach komórek mięśniowych wykryto skupienia RNA (Hsu *et al.*, 2011). Należy zaznaczyć, że skierowanie w tym modelu ekspresji ciągów powtórzeń do mięśni sprawia, że odzwierciedla on jednak bardziej sytuację mającą miejsce w DM1 niż SCA3. Jednak brak jakiegokolwiek specyficznego sekwencji flankującej sprawia, że model ten może obrazować powiązanie toksyczności RNA z długością samego ciągu CAG. Ponadto, stanowi on dowód na potencjalny udział RNA w patogenezie chorób związanych z ekspansją powtórzeń CAG (Hsu *et al.*, 2011).

Niezwykle ważnym czynnikiem w tworzonych modelach toksyczności RNA jest kontekst genetyczny, w jakim znajdują się powtórzenia CAG. Większość modeli do badania toksyczności RNA korzysta ze strategii polegającej na umieszczeniu powtórzeń CAG w 3'UTR genu reporterowego jak GFP czy DsRED aby zapobiec ich translacji, a jednocześnie móc łatwo monitorować ich ekspresję (Hsu *et al.*, 2011; Lawlor *et al.*, 2011, 2012; Shieh and Bonini, 2011). Prace badawcze skupiają się tu głównie na analizie powiązania między strukturą spinki a toksycznością RNA. W tym celu badacze porównują ze sobą długie ciągi CAG z tej samej długości ciągami CAA, które nie tworzą struktury spinki uważanej za przyczynę toksyczności RNA. Do tej pory powstało kilka takich układów modelowych, głównie w *D. melanogaster*, czego przyczyną było zapewne to, że w tym organizmie powstał jeden z pierwszych modeli mających opisywać toksyczność RNA (Shieh and Bonini, 2011; van Eyk *et al.*, 2011; Lawlor *et al.*, 2012). Powyższa tematyka badawcza jest dobrze zobrazowana przez model *D. melanogaster* z ekspresją nieulegających translacji ciągów 100, 250 CAG i 105 CAG z interupcjami CAA, które znajdowały się w 3'UTR genu DsRed. Analiza profilu ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy muszek z ekspresją ciągu 100 CAG pokazała, że dochodzi u nich do zmiany ekspresji 160 genów. Ponadto profil transkryptomu muszek z ciągiem z interupcjami był bardziej podobny do muszek bez powtórzeń, niż tych z ekspresją ciągu bez interupcji. Jednym z genów ze zmienioną ekspresją był Hsp70. Okazało się, że jego

nadekspresja mogła osłabić patogenny fenotyp (polegający na braku wspinaczki po ścianach naczyń hodowlanego) u muszek z ekspresją 250 CAG. Ponadto, nadekspresja Orb2 (ang. translation regulator orb2, biorącego udział w takich procesach jak plastyczność synaptyczna, uczenie się i pamięć) lub Tpr2 (ang. Tetratricopeptide repeat protein 2, białko pomagające białkom opiekuńczym w pełnieniu ich funkcji) znosiła inny aspekt fenotypu tych muszek, objawiający się złą pozycją skrzydeł (Shieh and Bonini, 2011). Innym modelem obrazującym różnice między RNA z powtórzeniami tworzącymi strukturę a tymi, które są ich pozbawione, jest model *D. melanogaster* z powszechną ekspresją transgenów złożonych z czterech insercji ciągów: 4x100 CUG, 4x100 CAG i 4x100 CAA nieulegających translacji. Muszki z ekspresją ciągów CAG lub CUG miały zmniejszoną przeżywalność i posiadały defekty morfologiczne, a przy podniesionej ekspresji wykazywały śmiertelność, co nie było z kolei obserwowane u muszek z ekspresją ciągów CAA (Lawlor *et al.*, 2012). W powyższych badaniach widać było wyraźne różnice zarówno w transkryptomie jak i fenotypie muszek z ekspresją nieulegających translacji ciągów CAG i CAA. Jedynym wyjaśnieniem przytoczonych powyżej obserwacji wydaje się być struktura spinki tworzona przez powtórzenia CAG. Wzmacnia to hipotezę odnośnie struktury, jako przyczyny toksyczności RNA.

W innych systemach eksperymentalnych badających rolę RNA w patogenezie SCA3 zmutowane ciągi powtórzeń znajdują się w otwartej ramce odczytu pełnej długości ataksyny-3 lub jej C-końcowego fragmentu. Wtedy powtórzenia ulegają zarówno transkrypcji jak i translacji (Li *et al.*, 2008; Tsoi *et al.*, 2011, 2012). Zaletą takiego podejścia jest zachowanie odpowiedniego kontekstu genetycznego, jednak powoduje to, że interpretacja wyników odnośnie toksyczności RNA jest niezwykle trudna. Z takich eksperymentów badacze wyciągają wnioski na podstawie porównań z modelami z ekspresją samych ciągów nieulegających translacji lub ze znajdującymi się w kontekście genetycznym ataksyny-3 ciągami CAG z interupcjami CAA, które zaburzają strukturę spinki. Za przykład może tu posłużyć jeden z pierwszych modeli toksyczności RNA, stworzony w *D. melanogaster*, gdzie ekspresji w oku lub układzie nerwowym ulegał C-końcowy fragment ataksyny-3 (do 43 aa za ciągiem poliglutaminowym), zawierający ciąg 78 CAG lub 78 CAG z interupcjami CAA. Ekspresja fragmentu ataksyny-3 z ciągiem 78 CAG bez interupcji prowadziła do silnego zaniku neuronów fotoreceptorów i pigmentacji oka. Natomiast muszki z ekspresją ciągu, zawierającego interupcje wykazywały słabszy i wolniejszy fenotyp, polegający na zaniku pigmentacji oka i minimalnym zaniku neuronów. Analogiczne wyniki dała ekspresja powyższych ciągów powtórzeń w kontekście pełnej długości ataksyny (Li *et al.*, 2008). Dla wszystkich badanych linii muszek wykazano podobną ekspresję białka, zatem obserwowane

zmiany nie wynikały z różnic w jego poziomie. W celu potwierdzenia swoich obserwacji badacze stworzyli też model, w którym dochodziło do ekspresji nieulegających translacji ciągów 100 i 250 CAG, znajdujących się w 3'UTR genu DsRED. Ekspresja powyższych ciągów dawała nie tylko podobny, ale nawet silniejszy fenotyp, zapewne przez długość ciągu, objawiający się zanikiem siatkówki, neurodegeneracją i śmiercią. Ponadto, ekspresja nieulegających translacji ciągów CAG z interupcjami CAA nie powodowała żadnych toksycznych efektów. Reasumując, zaburzenia struktury spinki w transkrypcie zmutowanej ataksyny-3 prowadziły do osłabienia fenotypu SCA3 w modelu *D. melanogaster*, natomiast ekspresja nieulegających translacji zmutowanych ciągów CAG wywoływała neurodegenerację (Li *et al.*, 2008).

Podobny kontekst genetyczny w jakim ekspresji ulegały długie ciągi CAG jak i sposób identyfikacji toksyczności RNA zastosowano w modelach komórkowych. Za pomocą wektorów lentiwirusowych stworzono komórki SK-N-MC z ekspresją pełnej długości ataksyny-3 z ciągiem 69 Q. Transgen ulegał tu zarówno transkrypcji jak i translacji. Komórki te, jak opisano wcześniej, wykazywały zmiany w alternatywnym splicingu genów zależnych od MBNL1. Stworzono też linie SK-N-MC i HeLa z ekspresją ciągów zawierających 5, 30, 74 i 200 powtórzeń CAG nieulegających translacji i znajdujących się w 3'UTR genu eGFP (ang. enhanced green fluorescent protein, białko wzmocnionej zielonej fluorescencji). W komórkach z ekspresją ciągów 74 i 200 CAG dochodziło do zaburzenia splicingu genów SERCA1 i CLCN1 zależnych od MBNL1, a więc obserwowano u nich analogiczne zmiany jak w komórkach, w których dochodziło do ekspresji pełnej długości ataksyny-3 z ciągiem 69 Q. Sugeruje to, że w obserwowane zmiany może być zaangażowany transkrypt RNA (Mykowska *et al.*, 2011). Wyniki otrzymane w powyższych modelach nie pozwalają jednak na jasne określenie roli toksycznego RNA w SCA3. Natomiast sugerują, że może on potencjalnie brać udział w patogenezie tej choroby (Li *et al.*, 2008; Mykowska *et al.*, 2011). Z kolei grupa Tsoi w swoich dwóch pracach, opisujących indukcję stresu jąderkowego (Tsoi *et al.*, 2012) i wpływ ścieżki eksportu jąderkowego na toksyczność RNA (Tsoi *et al.*, 2011) porównała efekty ekspresji C-końcowego fragmentu zmutowanej ataksyny-3 tylko do białka normalnego i białka, zawierającego ciągi z interupcjami CAA. Zabrakło w tym układzie modelu z ciągami nieulegającymi translacji, do którego można by porównać otrzymane wyniki. Taki układ niestety stwarza miejsce do nadinterpretacji danych i choć prezentowane w powyższych pracach wyniki wydają się być spójne, powinno się je potwierdzić dodatkowymi eksperymentami.

Jeden ze stworzonych do tej pory modeli muszki owocowej wydaje się być sprzeczny z fenotypami obserwowanymi u innych. W modelu tym eksprymowane były ciągi 93CAG i 114 CAA, które nie ulegały translacji przez wprowadzenie kodonu stop przed ciągiem. W modelach tych nie zaobserwowano żadnego fenotypu w oku. Neurodegeneracja była obserwowana tylko w muszkach z ekspresją ciągów ulegających translacji. Dopiero sztuczne zaburzenia w postaci nadekspresji białka Sgg (odpowiedzialne za prawidłowy rozwój muszki) spowodowały rozwinięcie się fenotypu w modelach z ekspresją ciągów nieulegających translacji. Obserwowano zanik pigmentacji oka, który był ostrzejszy dla muszek z ekspresją ciągów CAG w porównaniu z tymi z ekspresją ciągów CAA (van Eyk *et al.*, 2011). Niestety trudno wskazać na przyczyny tego fenotypu, może on być na przykład spowodowany nietypową mutacją.

Pomimo wielu badań kwestia toksyczności RNA i jego udziału w patogenezie SCA3 pozostaje niewyjaśniona. Główną tego przyczyną jest z pewnością wspomniana wcześniej kwestia nakładania się na siebie toksyczności białka i RNA. Stworzone do tej pory modele SCA3 nie umożliwiają ich jasnego oddzielenia. W modelach z ekspresją ciągów nieulegających translacji przez umieszczenie ich w 3'UTR genu reporterowego nie obserwuje się co prawda efektów toksyczności białka, natomiast są one pozbawione bardzo ważnego kontekstu genetycznego. W dobrym modelu, starającym się określić toksyczność RNA, ekspresja patogennego ciągu CAG powinna zachodzić w kontekście pełnej długości ataksyny-3, ponieważ sekwencje flankujące ciągi CAG mogą wpływać na stabilność struktury spinki tworzonej przez powtórzenia, co wydaje się istotne z punktu widzenia toksyczności transkryptu (Michlewski and Krzyzosiak, 2004; de Mezer *et al.*, 2011; Fiszer and Krzyzosiak, 2013). Jednak problemem w stworzonych do tej pory modelach eksprymujących powtórzenia CAG w kontekście genetycznym ataksyny-3 jest to, że dochodzi w nich zarówno do transkrypcji jak i translacji, co stwarza sytuację, w której nakłada się na siebie toksyczność białka i RNA. Dodatkowo porównywanie tych modeli do takich z ciągiem nieulegającym translacji lub ciągiem z interrupcjami CAA nie umożliwia wysnucia klarownych i jednoznacznych wniosków. Ponadto przedstawione układy modelowe nie są pełne; żadne z badań nie prezentuje zestawu modeli obrazujących: toksyczność RNA, toksyczność białka i toksyczność obydwu tych komponentów. Stąd, aby odpowiedzieć na pytanie jak RNA przyczynia się do patogenezy SCA3 potrzebne jest stworzenie takich modeli (Fiszer and Krzyzosiak, 2013).



### 2. Cel pracy

SCA3 jest jedną z najpowszechniej występujących ataksji i należy do grupy chorób poliQ. Jeszcze do niedawna uważano, że jedynym patogennym czynnikiem w SCA3 jest toksyczne białko z domeną poliQ. Tymczasem coraz więcej doniesień sugeruje, że toksyczny może być również transkrypt, zawierający długi ciąg powtórzeń CAG. Pomimo licznych badań złożony patomechanizm SCA3 pozostaje słabo poznany, skutkiem czego jest brak skutecznej terapii dla tej ciągle nieuleczalnej choroby. Większość z przeprowadzonych dotychczas badań została wykonana na modelach komórkowych, w których nakładały się na siebie efekty wywołane przez zmutowane białko i transkrypt. Takie podejście uniemożliwiało określenie faktycznej roli zmutowanego RNA w rozwoju SCA3, w wyniku czego stanowi ona niewyjaśniony jak dotąd aspekt patogenezы chorób poliQ.

Głównym celem niniejszej pracy było poszukiwanie nowych markerów toksyczności RNA i wytypowanie potencjalnych ścieżek patogenezы przez jakie może działać zmutowany transkrypt ataksyny-3. Do jego realizacji niezbędne było skonstruowanie nowych modeli komórkowych, umożliwiających rozróżnienie toksyczności RNA od toksyczności białka. Powyższe cele zostały osiągnięte przez realizację następujących zadań szczegółowych:

- Przygotowanie konstruktów genetycznych do wyprowadzenia stabilnych linii komórkowych, zawierających różne warianty ataksyny-3.
- Wyprowadzenie stabilnych modeli SCA3 w linii komórkowej neuroblastoma SH-SY5Y przy użyciu systemu Flp-In T-REx.
- Charakterystyka molekularna otrzymanych modeli SCA3.
- Określenie profilu ekspresji genów wybranych modeli SCA3 z użyciem głębokiego sekwencjonowania RNA.
- Określenie zmian w poziomie białek wybranych modeli SCA3 przy użyciu proteomiki ilościowej.
- Określenie nowych ścieżek patogenezы SCA3 przez które może działać toksyczny transkrypt w oparciu o wyniki globalnych analiz transkryptomycznych i proteomicznych.

### 3. Materiały i Metody

#### 3.1. Materiały

##### 3.1.1 Enzymy

*NotI* FastDigest (Thermo Scientific)

*NheI* FastDigest (Thermo Scientific)

*Eco0109I* FastDigest (Thermo Scientific)

*BsmBI* FastDigest (Thermo Scientific)

*HindIII* FastDigest (Thermo Scientific)

*XhoI* FastDigest (Thermo Scientific)

Polimeraza DNA *Pfu* 2,5 U/μl (Thermo Scientific)

Polimeraza DNA GoTaq Flexi 5 U/μl (Promega)

Ligaza DNA faga T4 1 U/μl (Promega)

Trypsyna-EDTA 10 x stężona (Sigma-Aldrich)

##### 3.1.2 Ważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne

Agaroz (Bioshop)

Akrylamid/Bisakrylamid w stosunku 29:1 (Bioshop)

Aminokwasy, 100x stężone (Sigma)

Ampicylina (Bioshop)

Bio-Trypton (Bioshop)

Blastocydyna (Thermo Scientific)

Błękit bromofenolowy (Fluka)

Błękit metylenowy (Sigma)

Bromek etydyny (Merck)

BSA (surowicza albumina wołowa, ang. bovine serum albumin) (Cell signaling Technology)

Cytrynian sodu (Chempur)

Chlorek sodu (Chempur)

Chloroform cz.d.a. (POCh)

Doksycyklina (Sigma)

EDTA (POCh)

Ekstrakt drożdżowy (Bioshop)

### 3. Materiały i Metody

Etanol (Millipore)

FBS (płodowa surowica bydlęca, ang. fetal bovine serum) (PAA Laboratories)

Ficoll (Sigma)

Formaldehyd (Sigma)

Formamid (Ambion)

Higromycyna B (Invitrogen)

Izopropanol cz.d.a. (POCh)

Kwas borowy (Chempur)

Kwas octowy (Chempur)

Kwas retinowy (Sigma)

L-glutamina (Gibco)

Lipofektamina 2000 (Invitrogen)

Medium hodowlane DMEM (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco)

Medium hodowlane DMEM/F12 (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco)

Medium hodowlane MEME (ang. Minimum Essential Medium Eagle) (Sigma)

Mieszanina dNTP o całkowitym stężeniu 40 mM (DNA Gdańsk)

Mocznik (Chempur)

MOPS (Bioshop)

Nadsiarczan amonu (Sigma)

Octan sodu (POCh)

Paraformaldehyd (Sigma)

Poli-L-lizyna (Millipore)

SDS (Bioshop)

Tricyna (Sigma)

Trietanolamina (Roth)

Tris (Sigma)

TEMED (Bioshop)

TRI reagent (Sigma)

Triton X-100 (Bioshop)

Roztwór Antybiotyk/Antymykotyk 100x stężony (penicylina 10 000 U/ml, streptomycyna 10 mg/ml, amfoterycyna B 25 µg/ml) (Sigma)

### 3. Materiały i Metody

Roztwór penicyliny i streptomycyny 100x stężony (penicylina 10 000 U/ml, streptomycyna 10 mg/ml) (Sigma)

Roztwór zamykający SlowFade™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen)

Substrat dla peroksydazy chrzanowej WesternBright Quantum substrate (Advansta)

Wodorotlenek sodu (POCh)

#### 3.1.3 Przeciwciała

Tabela 2. Wykaz stosowanych przeciwciał.

<b>Przeciwciała I-rzędowe</b>			
<b>Nazwa</b>	<b>Gospodarz</b>	<b>Użyte rozcieńczenie</b>	<b>Producent</b>
anty-ataksyna-3	królik	1:1000 (5% mleko) 1:200* (1% BSA)	Sigma
anty-GAPDH	mysz	1:10 000 (5% mleko)	Millipore
anty-Winkulina	królik	1:1000 (5% BSA)	Cell Signaling Technology
anty-PoliQ	mysz	1:1000 (5% mleko)	Millipore
anty-cięta kaspaza-3	królik	1:1000 (5% mleko) 1:300* (1% BSA)	Cell Signaling Technology
anty-MAP2	królik	1:100* (1% BSA)	Cell Signaling Technology
anty-CHOP	mysz	1:1000 (5% mleko)	Cell Signaling Technology
<b>Przeciwciała II-rzędowe</b>			
anty-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową	osioł	1:1000 (5% mleko) 1:10 000** (5% mleko)	Jackson ImmunoResearch
anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową	osioł	1:1000 (5% mleko)	Jackson ImmunoResearch
anty-królicze sprzężone z fluoroforem Alexa594	osioł	1:1000* (1% BSA)	Jackson ImmunoResearch

\* - stężenia użyte w barwieniach *in situ*, \*\* - stężenie użyte do detekcji przeciwciała anty-GAPDH

#### 3.1.4 Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji plazmidów na średnią skalę – Pure Yield Plasmid Midiprep system (Promega)

- Zestaw do izolacji plazmidów na małą skalę – Plasmid mini (A&A Biotechnology)

- Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego – Gel/PCR ME mini kit (Syngen)

- Zestaw do izolacji RNA - Direct-zol™ MiniPrep (Zymo Research)

- Zestaw do mutagenazy ukierunkowanej - QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)

- Zestaw do radioaktywnego znakowania sondy - DECAprime™ II DNA Labeling Kit (Thermo Scientific)

- Kolumnienki do oczyszczania oligonuklotydów - GE-Healthcare MicroSpin G-25 columns (Thermo scientific)

### 3. Materiały i Metody

- Zestaw do odwrotnej transkrypcji - High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific)
- Zestaw do analizy ekspresji genów przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) Supermix do qPCR - SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)
- Zestaw do oznaczania stężenia białka metodą BCA - Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible (Thermo Scientific)

#### *3.1.5 Roztwory i bufony*

APS 10%

EDTA 0,5 M, pH 8.0

SDS 10%

Tris 1,5 M, pH 8.8

Tris 1 M, pH 6.8

25 mM glicyna, pH 2.0

CaCl<sub>2</sub> 2,5 M

Roztwór Ponceau S do barwienia białek na membranę

Ponceau S 0,5%

Kwas octowy 1%

Medium LB (ang. Luria-Bertani) do hodowli bakterii 1L, pH 7.0

Ekstrakt drożdżowy 5g

NaCl 10g

Bio-Trypton 10g

SSC, 20x stężony

Chlorek sodu 3 M

Cytrynian trisodowy 300 mM

TBE, 10x stężony, pH 8.3

Tris 1 M

Kwas borowy 1 M

EDTA 20 mM

TAE, 5x stężony, pH 8.0

Tris 200 mM

EDTA 5 mM

Kwas octowy 95 mM

### 3. Materiały i Metody

Bufor płuczący do analiz typu Northern

SSC	1x
SDS	0,1%

NBC, 10x stężony

Kwas borowy	0,5 M
Octan sodu	10 mM
NaOH	50 mM

MOPS, 10x stężony, pH 7.0

MOPS	0,2 M
Octan sodu	50 mM
EDTA	10 mM

TT, 50x stężony

Tricyna	1,5 M
Trietanolamina	1,5 M

Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym w buforze TT

50x TT	2,1 x
EDTA	1 mM
Błękit bromofenolowy	0,04%

Bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym w buforze NBC

Ficoll	15%
EDTA	0,1 M
Błękit bromofenolowy	0,25%

Bufor Laemmli do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym, 10x stężony

Tris	250 mM
Glicyna	1,92 M
SDS	1%

Bufor do elektrotransferu, 1x stężony

Tris	25 mM
Glicyna	192 mM
Metanol	20%

Bufor PB do izolacji białek z komórek, 1x stężony

Tris	60 mM
SDS	2%
Sacharoza	10%
PMSF	2 mM

Bufor obciążający do elektroforezy białek, 3x stężony

Tris pH 6.8	150 mM
SDS	6%
$\beta$ -merkaptoetanol	16%
glicerol	30%
błękit bromofenolowy	3%

TBS, 10x stężony, pH 7.4

Tris	0,2 M
NaCl	1,5 M

TBS-T, 1x stężony, pH 7.4

Tris	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1%

Bufory dostępne komercyjnie

Bufor do hybrydyzacji typu Northern PerfectHyb plus Hybridization Buffer (Sigma)

Bufor do ligazy T4, 10x stężony (Promega)

Bufor do polimerazy GoTaq Flexi, 5x stężony (Promega)

Bufor do polimerazy *Pfu* zawierający magnez, 10x stężony (Thermo Scientific)

Bufor do trawienia DNA za pomocą enzymów restrykcyjnych Fast digest buffer, 10x stężony (Thermo Scientific)

Bufor hybrydyzacyjny do smFISH (Stellaris)

Bufor obciążający do elektroforezy RNA w żelu agarozowym, RNA Gel Loading Dye, 2x stężony (Thermo Scientific)

Bufor PBS (Bioshop)

Bufor płuczący A do smFISH, 5x stężony (Stellaris)

Bufor płuczący B do smFISH (Stellaris)

Bufor RIPA do izolacji białek z komórek (Sigma)

#### 3.1.6 Związki promieniotwórcze

dCTP [ $\alpha$ - $^{32}$ P] 3000 Ci/mmol (Hartman Analitics)

#### 3.1.7 Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych i białek

Marker długości DNA - 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

Marker długości RNA - RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Scientific)

Marker wielkości białek - Pagaruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

#### 3.1.8 Żele

##### **Żele agarozowe do analizy produktów PCR oraz izolacji DNA po cięciu restrykcyjnym**

1% agarozą w buforze TBE z bromkiem etydyny (0,5  $\mu$ g/ml)

1% agarozą w buforze TAE z bromkiem etydyny (0,5  $\mu$ g/ml)

##### **Żele agarozowe do analiz typu Northern blot**

1% agarozą w buforze MOPS z dodatkiem 1,85% formaldehydu

1% agarozą w buforze NBC z dodatkiem 1,85% formaldehydu

1% agarozą w buforze TT z dodatkiem 1,2% formaldehydu

##### **Żel poliakrylamidowy denaturujący do elektroforezy białek**

Żel rozdzielający:

Akrylamid/Bisakrylamid	10%
Tris pH 8.8	0,375 M
SDS	0,1%
APS	0,1%
TEMED	0,4%

Żel zagęszczający:

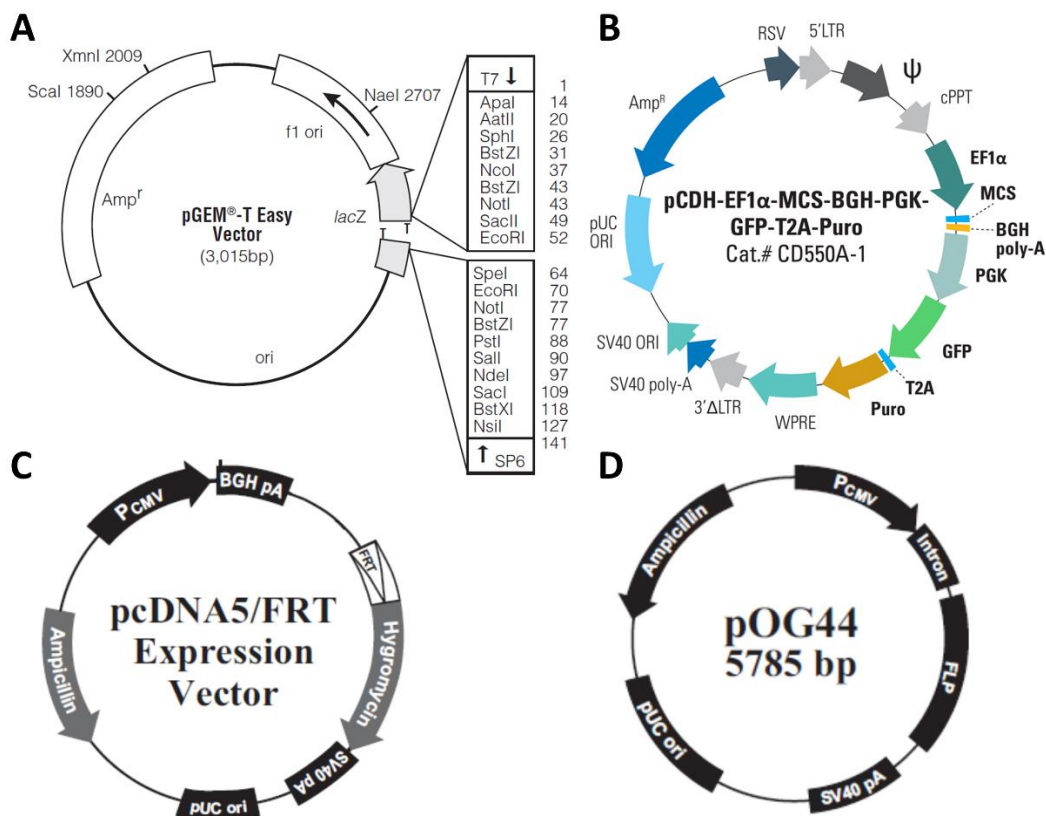
Akrylamid/Bisakrylamid	5%
Tris pH 6.8	0,125 M
SDS	0,1%
APS	0,1%
TEMED	0,1%



#### 3.1.9 Konstrukty genetyczne

W niniejszej pracy zastosowano następujące wektory, których struktury genetyczne zostały przedstawione na rycinie 7:

- plazmid pGEM® - T Easy zawierający sekwencję kodującą genu ludzkiej ataksyny-3 z 69 powtórzeniami CAG (ATXN3 69 CAG), stworzony wcześniej w ZBM (Ryc. 7A)
- plazmid pCDH-EF1 $\alpha$ -MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro służący do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych w systemie lentiwirusowym (Ryc. 7B) (SBI)
- plazmid pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO służący do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych w systemie Flp-In T-REx (Ryc. 7C) (Thermo Scientific)
- plazmid pOG44 kodujący rekombinazę flipazę, która przeprowadza miejscowo-specyficzną rekombinację między miejscami FRT w systemie Flp-In T-REx (Ryc. 7D) (Thermo Scientific)



**Rycina 7. Schematy przedstawiające strukturę wektorów wykorzystanych w niniejszej pracy. A - pGEM®- T Easy (Promega). B - pCDH-EF1 $\alpha$ -MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro (SBI). C - pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO (Thermo Scientific). D - pOG44 (Thermo Scientific).**



<b>GAPDH F</b>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
<b>GAPDH R</b>	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<b>NSE F</b>	TGCACAGGCCAGATCAAGAC
<b>NSE R</b>	CCAGGCAAGCAGAGGAATCA
<b>SYP F</b>	GGACATGGACGTGGTGAATC
<b>SYP R</b>	AAGATGGCGAAGACCCATTG
<b>SYN1 F</b>	GTTTGCCCAGATGGTTCGAC
<b>SYN1 R</b>	CAACCTTGACCTTGCCCATC
<b>SNAP25 F</b>	AGTTGGCTGATGAGTCGCTG
<b>SNAP25 R</b>	TCATGCCTTCTTCGACACGA
<b>ATF4 F</b>	TTAAGCCATGGCGCTTCTCA
<b>ATF4 R</b>	GGTCGAAGGGGGACATCAAG
<b>CHOP F</b>	GATCCAACCTGCAGAGATGGC
<b>CHOP R</b>	TGATTCTTCTCTTCATTTCCAGG
<b>Grp78 F</b>	GAACGTCTGATTGGCGATGC
<b>Grp78 R</b>	TCAACCACCTTGAACGGCAA
<b>EDEM F</b>	TCTCCTCTACCAGGCAACCA
<b>EDEM R</b>	AGCTCTCCATCCGGTCTTCT

#### *3.1.11 Sondy do wizualizacji pojedynczych cząsteczek RNA metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ*

- zestaw sond skierowanych na transkrypt ataksyny-3 i zaprojektowany za pomocą oprogramowania udostępnianego przez firmę Stellaris, sondy były sprzężone z fluoroforem Quasar® 670 (Stellaris)

- zestaw sond skierowanych na transkrypt GAPDH: VSMF-2148-5, dostępny komercyjnie, sondy były sprzężone z fluoroforem CAL Fluor® Red 590 Dye (Stellaris)

#### *3.1.12 Materiał biologiczny*

##### **Komórki bakteryjne**

Do propagacji plazmidów zawierających transgeny ataksyny-3 z różnymi długościami ciągu poliglutaminowego stosowano bakterie Sure 2 (Agilent Technologies), przeznaczone do klonowania DNA zawierającego niestabilne struktury drugorzędowe. Do namnażania pozostałych plazmidów wykorzystano bakterie DH5 $\alpha$  (Thermo Scientific),

##### **Linie komórkowe**

W badaniach wykorzystano komórki HEK293T (ATCC) i Flp-In T-REx SH-SY5Y host (otrzymane dzięki uprzejmości prof. Jamesa Connora i dr Sanga Lee, z Penn State Cancer Institute).

#### 3.1.13 Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe

- Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)
- Aparat do elektroforezy pionowej Mini-Protean®Tetra (Bio-Rad)
- Aparat do elektroforezy poziomej (Cleaver Scientific)
- Aparat do transferu mokrego Mini Trans-Blot® (Bio-Rad)
- Ciepłarka do hodowli bakteryjnych (Mettler)
- Ciepłarko-wytrząsarka Max Q Mini 4000 (Barnstead)
- Inkubator bakteryjny (Mettler)
- Inkubator do komórek eukariotycznych (Heraeus, HERACell)
- Piecyk hybrydacyjny ProBlot (Labnet)
- Kasetka oraz ekran do autoradiografii (Amersham Biosciences)
- Komora laminarna do pracy z bakteriami (Aura vertical S.D.4.)
- Komora laminarna do pracy z komórkami eukariotycznymi (Heraeus, HERASafe KS 15)
- Licznik scyntylacyjny (HIDEX, Triathler)
- Membrana nylonowa do analiz typu Northern Amersham Hybond™-N<sup>+</sup> (GE Healthcare)
- Membrana nitrocelulozowa do analiz typu Western Amersham™Protran™0,45 µm NC (GE Healthcare)
- Mikroskop optyczno-fluorescencyjny IX-70 (Olympus)
- Mikroskop konfokalny Leica TCS SP5 (Leica microsystems)
- Neon™ Transfection System (Thermo Scientific)
- pH-metr Seven Easy (Mettler Toledo)
- Skaner laserowy FLA 5100 (Fujifilm)
- Sonikator Bioruptor®Pico (Diagenode)
- Spektrofotometr DS-11 (Denovix)
- System dokumentacji żeli G:box (Syngene)
- Termocykler T100 (Bio-Rad)
- Termocykler do qPCR CFX Connect™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Termomikser TS-100 (Biosan)
- UV crosslinker CL-1000 (UVP)
- Wirówka (Eppendorf mini spin)
- Wirówka (Eppendorf 5810R)
- Zasilacz do elektroforezy PowerPac™Basic (Bio-Rad)

#### 3.1.14 Programy komputerowe i bazy danych

Cytoscape – wizualizacja danych proteomicznych i transkryptomycznych

<https://cytoscape.org/>

ClueGo i CluPedia – wtyczki Cytoscape, wizualizacja wyników z programu Enrichr

Enrichr – analizy ontologiczne wyników głębokiego sekwencjonowania

<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/#>

ExPASy compute pI/Mw tool – obliczenia mas białek

[https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)

ExPASy translate tool – analiza sekwencji ataksyny-3 pod kątem alternatywnych kodonów start

<https://web.expasy.org/translate/>

GeneSys – analiza żeli agarozowych i membran w metodzie Western blot

Genevonn – wykonanie diagramów Venna

<http://genevonn.sourceforge.net/>

GOIorize – wtyczka Cytoscape, analiza ontologiczna wyników iTRAQ

Image Reader – odczyt membran w metodzie Northern blot

I-Tasser – modelowanie sekwencji białek

<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

Jamovi – analiza statystyczna danych

<https://www.jamovi.org/>

LAS X – analiza zdjęć mikroskopowych

MultiGauge – analiza membran w metodzie Northern blot

MFold, RNAfold – przewidywanie struktur RNA

<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>

Primer-BLAST – projektowanie starterów do PCR

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>

PyMOL – wizualizacja wymodelowanych sekwencji białek

<https://pymol.org/2/>

SnapGene Viewer – analiza wyników sekwencjonowania

<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>

String – analiza danych proteomicznych

<https://string-db.org/>

#### 3.2 Metody

##### 3.2.1 Przygotowanie konstruktów genetycznych

###### 3.2.1.1 Konstrukcja transgenów ataksyny-3 z ciągami 20 CAA, 20 CAG lub 20 CAG z interupcjami CAA

Transgeny ataksyny-3 były przygotowywane przez wklonowanie wstawek zawierających odpowiednie ciągi powtórzeń do konstrukt ATXN3 69 CAG. Konstrukt ten był trawiony za pomocą enzymów restrykcyjnych *Eco0109I* i *BsmBI* w celu wycięcia ciągu zawierającego 69 powtórzeń CAG i uzyskania końców komplementarnych do wstawek. Całą objętość reakcji trawienia rozdzielono w 1% żelu agarozowym w buforze TAE. Fragment odpowiadający zlinearyzowanemu wektorowi wycięto i oczyszczono za pomocą zestawu Gel/PCR ME mini kit według zaleceń producenta. Ligację wektora z wstawką zawierającą ciągi prowadzono przy sześciokrotnym nadmiarze molarnym wstawki.

#### Dupleksowanie

Oligonukleotydy dupleksowano parami w wodzie:

2 µl	A (ze stężenia 10 µM)
2 µl	B (ze stężenia 10 µM)
<u>46 µl</u>	<u>H<sub>2</sub>O</u>
50 µl	

Tak przygotowaną reakcję wstawiano do zlewki z zagotowaną wodą i pozostawiano aż do osiągnięcia temperatury pokojowej.

#### Trawienie wektora ATXN3 69 CAG

5 µl	wektora (1 µg)
2 µl	buforu FastDigest, 5x stężonego
1 µl	<i>Eco0109I</i>
1 µl	<i>BsmBI</i>
1 µl	DTT ze stężenia 20 mM
<u>10 µl</u>	<u>H<sub>2</sub>O</u>
20 µl	

Trawienie prowadzono przez 50 minut w 37°C, następnie enzymy inaktywowano przez 10 min. w 65°C.

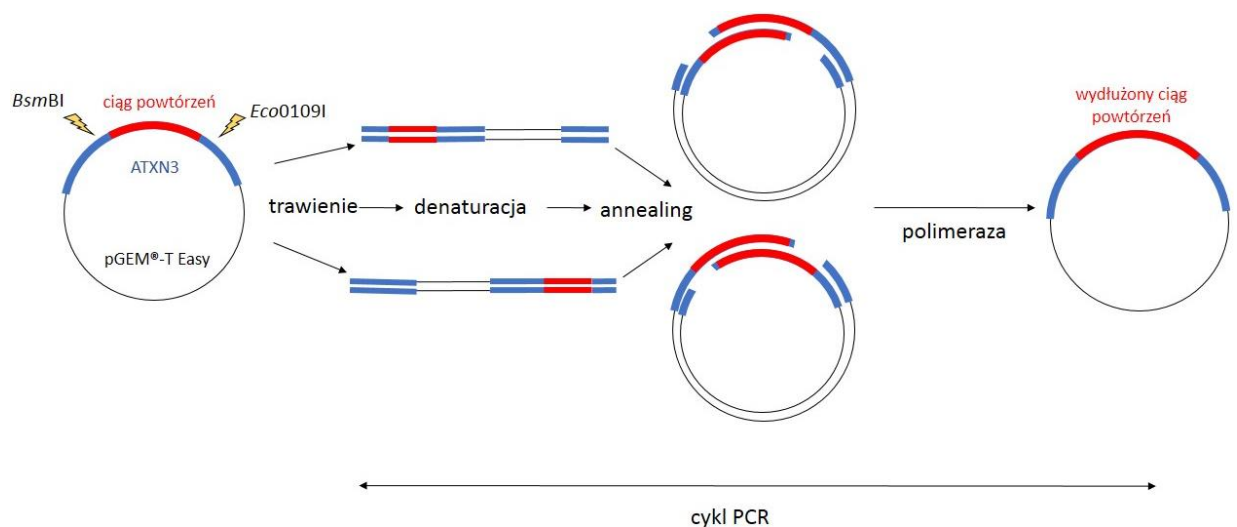
#### Ligacja

2  $\mu$ l trawionego wektora (50 ng)  
1  $\mu$ l mieszaniny po dupleksowaniu rozcieńczonej 41x (~5,6 ng)  
1  $\mu$ l buforu do ligacji, 10x stężonego  
1  $\mu$ l ligazy DNA faga T4  
5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
10  $\mu$ l

Przygotowanymi w ten sposób wektorami transformowano kompetentne bakterie DH5 $\alpha$  w celu namnożenia plazmidów. Na jedną transformację brano całość reakcji ligacji i 100  $\mu$ l bakterii.

#### *3.2.1.2 Konstrukcja transgenów ataksyny-3 z ciągami 120 CAA, 120 CAG lub 120 CAG z interupcjami CAA*

Transgeny ataksyny-3 z ciągami zawierającymi 120 powtórzeń były przygotowywane za pomocą metody SLIP (*ang. Synthesis of Long Iterative Polynucleotide*), która umożliwia wydłużanie już istniejących ciągów powtórzeń (Takahashi *et al.*, 1999). W metodzie SLIP (Ryc. 8) podczas cyklu PCR wydłużanie ciągu powtórzeń jest przeprowadzane przez polimerazę *Pfu*. Gdy sekwencje ciągów powtórzeń produktów różnych trawień niedokładnie do siebie hybrydują powstają przerwy, w których może działać polimeraza. W pierwszej kolejności usuwane są przez nią niesparowane nukleotydy tuż przy ciągu powtórzeń a następnie wydłużany jest koniec 3'. W rezultacie dochodzi do elongacji sekwencji powtórzeń. Jako konstrukty wyjściowe wykorzystano otrzymane wcześniej transgeny ataksyny-3. Dany konstrukt był trawiony równolegle w oddzielnych probówkach za pomocą enzymów restrykcyjnych *Eco0109I* i *BsmBI* (Thermo Scientific). Następnie, produkty trawień łączono i poddawano jednemu cyklowi PCR, po czym transformowano nimi kompetentne bakterie DH5 $\alpha$ .



**Rycina 8. Metoda SLIP, opis w tekście (Takahashi *et al.*, 1999; Figura *et al.*, 2015).**

### 3. Materiały i Metody

#### Trawienie za pomocą *BsmBI*

5 µl wektora (500 µg)  
2 µl buforu FastDigest, 5x stężonego  
1 µl *BsmBI*  
1 µl DTT (20 mM)  
11 µl H<sub>2</sub>O  
20 µl

#### Trawienie za pomocą *Eco0109I*

5 µl wektora (500 µg)  
2 µl buforu FastDigest, 5x stężonego  
1 µl *Eco0109I*  
12 µl H<sub>2</sub>O  
20 µl

Trawienie prowadzono przez 40 minut w 37°C, następnie enzymy inaktywowano przez 10 min. w 65°C.

#### SLIP PCR

Skład mieszaniny:

4 µl trawienia *BsmBI*  
4 µl trawienia *Eco0109I*  
2,5 µl buforu z magnezem  
1 µl dNTP  
1 µl polimerazy *Pfu*  
12,5 µl H<sub>2</sub>O  
25 µl

Program:

95°C 5 min.  
50°C 10 min.  
72°C 3 min.  
4°C ∞

#### *3.2.1.3 Konstrukcja transgenów ataksyny-3 nieulegających translacji*

Transgeny ataksyny-3 nieulegające translacji zostały przygotowane za pomocą mutagenazy ukierunkowanej z użyciem zestawu QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Zamieniono kodon start (ATG) na stop (TAG) i wprowadzono kodon stop (TAA) przed ciągiem powtórzeń. Do zamiany kodonu start na stop wykorzystano startery Mutstart F i Mutstart R, natomiast do wprowadzenia kodonu stop przed ciągiem wykorzystano startery Mutciąg F i Mutciąg R (Tab. 2). Po przeprowadzeniu syntezy zmutowanych nici DNA mieszaninę reakcyjną poddano działaniu *DpnI* aby pozbyć się plazmidu służącego za matrycę. Następnie 4 µl mieszaniny reakcyjnej użyto do transformacji bakterii DH5α.

Zamiana kodonu start na stop:

AATAAACATGGAGTCCA -> AATAAACTAGGAGTCCA

Wprowadzenie kodonu stop przed ciągiem:

TTTGAAAAACAGCAGCA -> TTTGAATAACAGCAGCA



### 3. Materiały i Metody

Skład mieszaniny do mutagenезy ukierunkowanej:

5 µl bufor reakcyjny, 10x stężony  
1 µl matrycy (30 ng)  
1,25 µl starter F (125 ng)  
1,25 µl starter R (125 ng)  
1 µl dNTP  
3 µl QuickSolution  
37,5 µl H<sub>2</sub>O  
50 µl + 1 µl polimerazy *PfuUltra*

Program:

95°C 1 min.  
95°C 50 s.  
60°C 50 s.  
68°C 1min./kb plazmidu  
18 cykli  
68°C 7 min.  
4°C ∞

#### 3.2.1.4 Przeklonowanie transgenów ataksyny-33 do wektorów służących do wyprowadzenia stabilnych linii komórkowych

Transgeny ataksyny-3 były przeklonowywane do wektorów pCDH-EF1 $\alpha$ -MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro i pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO. W celu umożliwienia wklonowania otrzymanych transgenów do wektora pCDH-EF1 $\alpha$ -MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro plazmid ATXN3 69 CAG został uprzednio poddany mutagenезie ukierunkowanej w celu otrzymania kompatybilnych miejsc restrykcyjnych. Z użyciem starterów MutNheI F, MutNheI R i zestawu QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit miejsce restrykcyjne *NotI* znajdujące się przed sekwencją transgeny zmutowano na miejsce *NheI*.

Zamiana miejsca *NotI* na *NheI*:

CGCCATGGC**G**GCCGCGGG -> CGCCATGGC**T**AGCCGCGG

Skład mieszaniny jak i program są analogiczne jak w punkcie 4.2.1.3.

Natomiast w celu uzyskania kompatybilnych miejsc restrykcyjnych w wektorze pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO wycięto z niego oryginalne miejsce wielokrotnego klonowania (MCS, ang. multiple cloning site) za pomocą enzymów restrykcyjnych *HindIII* i *XhoI*. Następnie, całą objętość reakcji trawienia rozdzielono w 1% żelu agarozowym w buforze TAE. Fragment odpowiadający zlinearyzowanemu wektorowi wycięto i oczyszczono za pomocą zestawu Gel/PCR ME mini kit według zaleceń producenta. Ligację wektora ze wstawką powstałą ze zdupleksowanych oligonuklotydów MCS F i MCS R reprezentujących nowy MCS (Tab. 2) prowadzono przy sześciokrotnym nadmiarze molarnym wstawki.

#### Trawienie wektora pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO

5  $\mu$ l wektora (1  $\mu$ g)  
2  $\mu$ l buforu FastDigest, 5x stężonego  
1  $\mu$ l *XhoI*  
1  $\mu$ l *HindIII*  
11  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
20  $\mu$ l

Trawienie prowadzono przez 50 minut w 37°C, następnie enzymy inaktywowano przez 10 min. w 65°C.

Dupleksowanie było przeprowadzone analogicznie jak w punkcie 3.2.1.1

#### Ligacja

2  $\mu$ l trawionego wektora (50 ng)  
1  $\mu$ l mieszaniny po dupleksowaniu rozcieńczonej 5x (~4,7 ng)  
1  $\mu$ l buforu do ligacji  
1  $\mu$ l ligazy DNA faga T4 (Promega)  
5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
10  $\mu$ l

Przygotowanymi w ten sposób wektorami transformowano bakterie DH5 $\alpha$  w celu namnożenia plazmidów. Po otrzymaniu konstruktów o kompatybilnych miejscach restrykcyjnych wektory pCDH-EF1 $\alpha$ -MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro, pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO, jak i plazmidy zawierające wstawki były trawione za pomocą enzymów restrykcyjnych *NotI* i *NheI*. Reakcje trawienia były rozdzielane na 1% buforze TEA. Następnie, wycinano fragmenty odpowiadające pociętemu wektorowi lub transgenowi ataksyny-3 i oczyszczano za pomocą kitu Gel/PCR ME mini kit według zaleceń producenta. Ligację transgeny i wektora prowadzono przy trzykrotny nadmiarze molarnym transgeny.

#### Trawienie wektorów i plazmidów z transgenami ataksyny-3

5  $\mu$ l wektora (1  $\mu$ g)  
2  $\mu$ l buforu FastDigest, 5x stężonego  
1  $\mu$ l *NheI*  
1  $\mu$ l *NotI*  
11  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
20  $\mu$ l

Trawienie prowadzono przez 50 minut w 37°C, następnie enzymy inaktywowano przez 10 min. w 80°C.

#### Ligacja

2  $\mu$ l trawionego wektora (50 ng)  
4  $\mu$ l wstawki (54 ng dla transgenów z 20 i 63 ng dla transgenów z 120 powtórzeniami)  
1  $\mu$ l buforu do ligacji  
1  $\mu$ l ligazy DNA faga T4  
2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
10  $\mu$ l

Przygotowanymi w ten sposób wektorami transformowano według protokołu producenta chemokompetentne bakterie SURE2 w celu namnożenia plazmidów.

#### *3.2.1.5 Przygotowanie chemokompetentnych bakterii DH5 $\alpha$*

Szczep DH5 $\alpha$  hodowano przez noc. Po tym czasie 1 ml hodowli zaszczerpiono 100 ml LB i hodowano bakterie do osiągnięcia OD<sub>600</sub>=0.5 (ok. 2 godziny). Następnie hodowlę zwirowano przez 5 minut przy 6000 rpm w 4°C a osad zawieszono w 16 ml zimnego 10 mM NaCl. Bakterie ponownie zwirowano przez 5 minut przy 6000 rpm w 4°C i zawieszono osad w 16 ml zimnego 50 mM CaCl<sub>2</sub>, po czym inkubowano 20 min. na lodzie. Po tym czasie bakterie zwirowano przez 5 minut przy 6000 rpm w 4°C, następnie osad zawieszono w 4 ml zimnego 50 mM CaCl<sub>2</sub> i dodano 1,2 ml sterylnego glicerolu (do 30%). Bakterie następnie rozporcjonowano po 100  $\mu$ l i zamrożono w -70°C.

#### *3.2.1.6 Transformacja bakterii chemokompetentnych metodą szoku termicznego*

Po rozmrożeniu na lodzie porcji komórek chemokompetentnych dodano do nich plazmidowego DNA i inkubowano przez 30 min. w lodzie. Następnie, bakterie poddano szokowi termicznemu poprzez inkubację w 42°C przez 45s.-1,5 min. Po tym czasie pozostawiono je na 3 min. w lodzie. Do bakterii dodano 500  $\mu$ l medium LB i hodowano przez 1 godzinę w 37°C z wytrząsaniem. Po tym czasie bakterie wysiano na przygotowane wcześniej płytki hodowlane z zawierającym ampicylinę (100  $\mu$ g/ml) zestaloną LB. Inkubowano w 37°C w inkubatorze przez noc.

#### *3.2.1.7 Sprawdzanie długości ciągu powtórzeń za pomocą kolonijnej PCR*

PCR kolonijny był używany do analizy wyników metody SLIP w celu identyfikacji klonów z wydłużonym ciągiem powtórzeń. Za jego pomocą sprawdzano też czy długość ciągów

### 3. Materiały i Metody

powtórzeń nie uległa znaczącym zmianom po kolejnych etapach klonowania. PCR kolonijny polega na dodaniu do mieszaniny reakcyjnej PCR, zamiast matrycy DNA, bakterii pochodzących z pojedynczej kolonii utworzonej na płycie z zestalonym LB. Podczas wstępnej denaturacji w termocyklerze dochodzi do lizy bakterii i uwolnienia się do mieszaniny reakcyjnej plazmidów, które były w nich namnażane. Plazmidy te służą jako matryca w reakcji PCR.

#### Skład mieszaniny:

0,25  $\mu$ l STR F (ze stężenia 10  $\mu$ M)  
0,25  $\mu$ l STR R (ze stężenia 10  $\mu$ M)  
0,125  $\mu$ l mieszaniny dNTP (ze stężenia 40  $\mu$ M)  
0,25  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (ze stężenia 25mM)  
1  $\mu$ l buforu GoTaq Flexi  
0,0625  $\mu$ l polimerazy GoTaq Flexi (5u/ $\mu$ l)  
3,0625  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  
5  $\mu$ l

#### Program:

95°C 5 min.  
95°C 30 s.  
60°C 15 s.  
72°C 30 s.  
30 cykli  
72°C 7 min.  
4°C  $\infty$

#### *3.2.1.8 Izolacja plazmidowego DNA i oznaczanie jego stężenia*

Plazmidowe DNA w celu poddania sekwencjonowaniu izolowano z użyciem zestawu Plasmid mini według protokołu producenta. Z kolei plazmidowe DNA przeznaczone do transfekcji komórek izolowano za pomocą zestawu Pure Yield Plasmid Midiprep system według protokołu producenta. Po izolacji stężenie i czystość DNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 230 nm, 260 nm i 280 nm. Stopień zanieczyszczenia białkiem oceniano na podstawie stosunku wartości absorbancji A260/A280. Natomiast stopień zanieczyszczenia solami chaotropowymi i rozpuszczalnikami organicznymi oceniano na podstawie stosunku wartości absorbancji A260/A230. Do dalszych analiz stosowano plazmidowe DNA o wartości A260/A280 mieszczącej się w granicach 1,7-2,1 i wartości A260/A230 powyżej 2.

#### *3.2.1.9 Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera*

Wszystkie konstrukty genetyczne po każdym poszczególnym etapie klonowania były poddawane sekwencjonowaniu w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Sekwencjonowanie miało na celu potwierdzenie poprawności klonowanej sekwencji, sprawdzenie wprowadzanych mutacji w przypadku mutagenyzy ukierunkowanej jak i określenie dokładnej długości ciągu

powtórzeń. Wyniki sekwencjonowania analizowano za pomocą komercyjnie dostępnego programu SnapGene Viewer.

#### *3.2.2 Hodowle komórkowe i transfekcja przejściowa*

Komórki linii HEK293T były hodowane w medium DMEM z 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), 2mM L-glutaminą i 1x Antybiotykiem/Antymykotykiem. Hodowla linii SH-SY5Y była prowadzona w medium DMEM/F12 z 10% FBS, 1x aminokwasami, 1x Penicyliną/Streptomycyną i blastycydyną (5 µg/ml). W przypadku wyprowadzonych stabilnych linii SH-SY5Y medium zawierało dodatkowo higromycynę (50 µg/ml). Komórki przesiewano przy konfluencji 80-90% przy pomocy trypsyny. Komórki eukariotyczne były hodowane w inkubatorach utrzymujących temperaturę 37°C i atmosferę 5% CO<sub>2</sub>. Ekspresję transgenu indukowano poprzez dodanie doksycykliny w stężeniu 1 µg/ml. Wiązanie się doksycykliny z represorem Tet powodowało jego o zmiany konformacyjne i uniemożliwiało mu wiązanie się dłużej do Tet operatora co aktywowało transkrypcję transgenu.

Komórki HEK293T transfekowano metodą liposomową przy użyciu odczynnika lipofektamina 2000 zgodnie z protokołem załączonym przez producenta. Komórki dzień wcześniej wysiano na płytkę sześciodołkową, tak aby w dniu transfekcji ich konfluencja wynosiła 70-90%. Do transfekcji użyto po 1 µg wektorów pCDH-EF1α-MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro zawierających odpowiednie transgeny ataksyny-3. Po 5 godzinach komórkom zmieniono pożywkę na medium z antybiotykami. Analizę ekspresji transgenu z wektora przeprowadzano po 48 h od transfekcji.

#### *3.2.3 Wyprowadzenie stabilnych modeli komórkowych SCA3 za pomocą system Flp-In T-REx*

System Flp-In T-REx (Invitrogen) umożliwia utworzenie stabilnych, izogenicznych i monoklonalnych linii komórkowych, dzięki wykorzystaniu miejscowo specyficznej rekombinacji przeprowadzanej przez rekombinazę Flp. Rekombinacja, która odbywa się między miejscami FRT, gdzie jedno jest obecne w genomie komórki, a drugie w konstrukcie genetycznym, zapewnia integrację badanego genu w jedno określone miejsce w genomie. Drugą zaletą systemu jest możliwość kontrolowanej indukcji syntezy transkryptu za pomocą doksycykliny. Modele komórkowe SCA3 były generowane według protokołu producenta, który rozpoczyna się transfekcją komórek SH-SY5Y konstruktem zawierającym odpowiedni

### 3. Materiały i Metody

wariant ataksyny-3 (lub „pusty” wektor w przypadku linii kontrolnej) oraz wektorem kodującym rekombinazę Flp (pOG44). Transfekcja została przeprowadzona za pomocą systemu Neon według protokołu producenta. Do pojedynczej transfekcji wzięto 4 µg plazmidu pcDNA5™/FRT/TO z wklonowanym transgenem ataksyny-3, 16 µg plazmidu pOG44 i  $2,5 \times 10^6$  komórek. Użyto następujących parametrów urządzenia: 1,100 V, jeden puls o długości 50 ms. Po 48 godzinach od transfekcji komórki były wysiewane na medium selekcyjne z dodatkiem higromycyny. Komórki, w których doszło do rekombinacji, tworzyły z czasem pojedyncze kolonie, które następnie były osobno przenoszone za pomocą małych cylindrów na płytki 48-dołkowe, a w kolejnych etapach na płytki 24-dołkowe, 12-dołkowe, 6-dołkowe aż do formatu szalki 10 cm w celu namnożenia materiału komórkowego. Następnie w poszczególnych klonach indukowano ekspresję transgeny, którą sprawdzano za pomocą PCR z odwrotną transkryptazą (RT-PCR, ang. reverse transcriptase PCR) w przypadku transgenów nieulegających translacji lub metody Western blot w przypadku transgenów ulegających translacji. Komórki będące poprawnymi klonami zamrażano w medium DMEM/F12 z 20% FBS, 10% DMSO, 1x aminokwasami, 1x Penicyliną/Streptomycyną w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po 24 godzinach były one przenoszone do ciekłego azotu w celu przechowywania do dalszych analiz.

#### 3.2.4 Różnicowanie komórek SH-SY5Y

Do różnicowania komórek SH-SY5Y, w celu przyjęcia przez nie fenotypu neuronalnego, postanowiono zastosować zmodyfikowany protokół zaproponowany przez Shipley *et al.*, 2016. W tym celu populację komórek SH-SY5Y składającą się z komórek epitelialnych (S) i neuroblastomalnych (N) frakcjonowano, tak aby składała się wyłącznie z komórek typu N. Żeby wyselekcjonować komórki typu N wykorzystano fakt, że są one znacznie mniej adherentne od komórek typu S, dlatego pasażując komórki SH-SY5Y zbierano tylko te, które najwcześniej odklejały się od szalki podczas trypsynizacji. Po kilkunastu przeprowadzonych w ten sposób pasażach otrzymano populację komórek SH-SY5Y składającą się wyłącznie z typu N. Następnie, komórki poddano różnicowaniu w medium EMEM, z dodatkiem 2 mM L-glutaminy, 10 µM kwasu retinowego i 6% FBS inaktywowanego termicznie, którego stężenie zaniżono do 3% w 5 dniu i 1% w 7 dniu różnicowania. Medium zmieniano co dwa dni a hodowle prowadzono przez 9 dni. Ocenę efektywności różnicowania przeprowadzono przez analizę morfologii i ekspresji markerów neuronalnych: *NSE*, *SYP*, *SYN1* i *SNAP25* za pomocą PCR w czasie rzeczywistym.

#### 3.2.5 Analiza ekspresji wybranych genów

##### 3.2.5.1 Izolacja RNA i oznaczanie jego stężenia

W wyprowadzonych modelach SCA3 zaindukowano ekspresję transgenu za pomocą dodania doksycykliny (1  $\mu\text{g/ml}$ ) do medium hodowlanego. Po 72 godzinach komórki zebrano i wyizolowano z nich całkowite RNA za pomocą zestawu Direct-zol™ MiniPrep zgodnie z protokołem producenta. Po izolacji stężenie i czystość RNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 230 nm, 260 nm i 280 nm. Stopień zanieczyszczenia białkiem oceniano na podstawie stosunku wartości absorbancji A260/A280. Natomiast stopień zanieczyszczenia solami chaotropowymi i rozpuszczalnikami organicznymi oceniano na podstawie stosunku wartości absorbancji A260/A230. Do dalszych analiz stosowano RNA o wartości A260/A280 mieszczącej się w granicach 1,7-2,1 i wartości A260/A230 większej niż 2.

##### 3.2.5.2 Synteza cDNA

Syntezę cDNA wykonano za pomocą zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit według protokołu producenta. Do reakcji brano 1  $\mu\text{g}$  całkowitego RNA wyizolowanego wcześniej z komórek. Ocenę efektywności reakcji przeprowadzano przez amplifikację fragmentu genu GAPDH za pomocą standardowego PCR.

##### 3.2.5.3 Standardowy PCR

Za pomocą standardowej reakcji PCR sprawdzano poprawność i efektywność indukcji ekspresji transgenu. W tym celu amplifikowano rejon powtórzeń i fragment specyficzny dla transgenu ataksyny-3. Ponadto metody tej używano także do oceny efektywności syntezy cDNA i analizy alternatywnego splicngu genu *XBPI*. Jako matrycę wykorzystywano uzyskane wcześniej cDNA, składy miesznin reakcyjnych i programy przedstawiono poniżej:

#### PCR dla rejonu powtórzeń

##### Skład mieszaniny:

0,5 µl STR F (ze stężenia 10 µM)  
0,5 µl STR R (ze stężenia 10 µM)  
0,25 µl mieszaniny dNTP (40 µM)  
0,5 µl MgCl<sub>2</sub> (ze stężenia 25mM)  
2 µl buforu GoTaq Flexi, 5x stężonego  
0,125 µl polimerazy GoTaq Flexi (5u/µl)  
1 µl 3x rozcieńczonego cDNA  
5,125 µl H<sub>2</sub>O  
10 µl

##### Program:

95°C 5 min.  
95°C 30 s.  
60°C 15 s.  
72°C 30 s.  
25 cykli  
72°C 7 min.  
4°C ∞

#### PCR dla fragmentu specyficznego dla transgenu ataksyny-3

##### Skład mieszaniny:

0,5 µl ATXN3 egzo F (ze stężenia 10 µM)  
0,5 µl ATXN3 egzo R (ze stężenia 10 µM)  
0,25 µl mieszaniny dNTP (ze stężenia 40 µM)  
0,5 µl MgCl<sub>2</sub> (ze stężenia 25mM)  
2 µl buforu GoTaq Flexi, 5x stężonego  
0,125 µl polimerazy GoTaq Flexi (5u/µl)  
1 µl 3x rozcieńczonego cDNA  
5,125 µl H<sub>2</sub>O  
10 µl

##### Program:

95°C 5 min.  
95°C 30 s.  
55°C 15 s.  
72°C 30 s.  
25 cykli  
72°C 7 min.  
4°C ∞

#### PCR dla GAPDH

##### Skład mieszaniny:

0,5 µl GAPDH F (ze stężenia 10 µM)  
0,5 µl GAPDH R (ze stężenia 10 µM)  
0,2 µl mieszaniny dNTP (ze stężenia 40 µM)  
2 µl MgCl<sub>2</sub> (ze stężenia 25mM)  
2 µl buforu GoTaq Flexi, 5x stężonego  
0,05 µl polimerazy GoTaq Flexi (5u/µl)  
1 µl 3x rozcieńczonego cDNA  
3,75 µl H<sub>2</sub>O  
10 µl

##### Program:

95°C 5 min.  
95°C 10 s.  
60°C 10 s.  
72°C 20 s.  
30 cykli  
72°C 7 s.  
4°C ∞



PCR sprawdzający alternatywny splicing *XBPI*

Skład mieszaniny:

0,5 µl STR F (ze stężenia 10 µM)  
0,5 µl STR R (ze stężenia 10 µM)  
0,25 µl mieszaniny dNTP (ze stężenia 40 µM)  
0,8 µl MgCl<sub>2</sub> (ze stężenia 25mM)  
2 µl buforu GoTaq Flexi, 5x stężonego  
0,125 µl polimerazy GoTaq Flexi (5u/µl)  
1 µl 3x rozcieńczonego cDNA  
4,825 µl H<sub>2</sub>O  
10 µl

Program:

95°C 3 min.  
95°C 30 s.  
62°C 30 s.  
72°C 20 s.  
29 cykli  
72°C 5 min.  
4°C ∞

#### 3.2.5.4 PCR w czasie rzeczywistym (*qPCR*, ang. *quantitative PCR*)

Amplifikację uzyskanego cDNA przeprowadzono w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 5 µl dwukrotnie stężonego odczynnika Universal SYBR® Green Supermix, 0,5 µl każdego ze starterów (stężenie końcowe 0,5 µM), 1 µl cDNA rozcieńczonego 100x i 3 µl wody wolnej od nukleaz. Sekwencje starterów zaprojektowano w oparciu o bazę sekwencji nukleotydowych NCBI przy użyciu dostępnego komercyjnie programu Primer-BLAST (Tab. 3). Jako wewnętrzną kontrolę ilości cDNA w reakcji użyto starterów do amplifikacji genu GAPDH. Reakcje amplifikacji cDNA przeprowadzono używając termocyklera CFX Connect™ Real-time PCR Detection System. Poniżej przedstawiono parametry użytego programu:

Program

95°C 30 s.

95°C 15 s.

60°C 30 s.

odczyt płytki

40 cykli

Krzywa topnienia: 5 s. 65°C -> 95°C (0,5°C/s.)

Po zakończeniu reakcji wartości CT, będące odzwierciedleniem numeru cyklu, w którym ilość produktu przekraczała wartość graniczną, przeliczano na krotność zmiany, stosując wzór: krotność zmiany =  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

#### 3.2.6 Analiza RNA metodą Northern blot

##### 3.2.6.1 Elektroforeza w żelu agarozowym

W wyprowadzonych modelach SCA3 zaindukowano ekspresję transgenu za pomocą dodania doksycykliny (1 µg/ml) do medium hodowlanego. Po 72 godzinach komórki zebrano i zawieszono w 500 µl odczynnika Tri Reagent a następnie wyizolowano całkowite RNA według protokołu producenta. Do dalszych analiz brano po 10 µg RNA. Przygotowano 1% żel agarozowy z formaldehydem. W zależności od stosowanego buforu skład żelu był następujący (100 ml):

Dla buforu MOPS:

- 1 g agarozy
- 10 ml buforu 10x stężonego MOPS
- 85 ml wody
- 5 ml formaldehydu

Dla buforu NBC:

- 1 g agarozy
- 10 ml buforu 10x stężonego NBC
- 85 ml wody
- 5 ml formaldehydu

Dla buforu TT:

- 1 g agarozy
- 2 ml buforu 50x stężonego TT
- 94,74 ml wody
- 3,25 ml formaldehydu

Próby na żel przygotowano w sposób zależny od stosowanego buforu:

- MOPS: próbki RNA uzupełniono wodą do 5 µl i dodano do nich 5 µl buforu 2x RNA Gel Loading Dye, inkubowano 10 min. 70°C, a następnie 3 min. na lodzie.

- TT: próbki RNA na ostatnim etapie izolacji za pomocą odczynnika TRI Reagent zawieszono w formamidzie. Do 14 objętości buforu obciążającego TT dodano 1 objętość 37% formaldehydu. Następnie, 1 objętość tak przygotowanej mieszaniny połączono z 1 objętością RNA. Przygotowane próbki inkubowano 5 min 70°C, a następnie 2 min. na lodzie po czym dodano 1 µl bromku etydyny (ze stężenia 1 µg/µl).

### 3. Materiały i Metody

- NBC: próbki RNA uzupełniono wodą do 5  $\mu\text{l}$ , dodano kolejno 2  $\mu\text{l}$  10x stężonego NBC, 3  $\mu\text{l}$  formaldehydu i 10  $\mu\text{l}$  dejonizowanego formamidu. Próbki inkubowano przez 5 min. w 70°C, a następnie 3 min. na lodzie. Następnie dodano 2  $\mu\text{l}$  10x buforu obciążającego i 0,5  $\mu\text{l}$  bromku etydyny (ze stężenia 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Po nałożeniu próbek na żel, elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 100V przez około 3 godziny. W celu określenia długości rozdzielanego RNA stosowano marker długości RNA RiboRuler High Range RNA Ladder obejmujący zakres RNA od 200 do 6000 zasad.

#### *3.2.6.2 Transfer mokry*

Żel położono na szybie ułożonej na naczyniu zawierającym bufor 10x stężony SSC, na dwóch bibułach Whatman (jedna zanurzona w buforze i druga ułożona na niej i o wymiarach żelu), nasączonych tym samym buforem tak, aby umożliwić jego podsiąkanie. Na żelu ułożono membranę nylonową o odpowiednich wymiarach. Następnie, kolejno położono trzy bibuły Whatman o tych samych wymiarach co żel. Delikatnie gładząc pipetą serologiczną usunięto bąble powietrza powstałe między warstwami. Żel obłożono parafilmem tak aby bufor przesiąkał tylko przez niego. Przyłożono ręczniki papierowe, a całość przyciśnięto odpowiednim ciężarem. Pozostawiono na noc. Po transferze, RNA związano z membraną przez działanie światła UV - 120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  w przeznaczonym do tego aparacie UV crosslinker CL-1000 oraz 30 min. inkubację w 80°C. Aby sprawdzić efektywność transferu membranę wybarwiono w roztworze błękitu metylenowego a następnie odbarwiono w 0,5% SDS.

#### *3.2.6.3 Wyznakowanie i oczyszczanie sondy*

Sonda została wyznakowana radioaktywnie za pomocą zestawu DECAprime™ II DNA Labeling Kit według protokołu producenta. Matrycę stanowiło oczyszczone przez cięcie z żelu DNA powstałe w reakcji PCR z zastosowaniem odpowiednich starterów (Tab. 3). Sondę następnie oczyszczono za pomocą kolumnienek GE-Healthcare MicroSpin G-25, według protokołu producenta. Wyznakowanie oczyszczonej sondy zmierzono na liczniku scyntylnym. Do dalszych analiz brano sondę, jeśli jej radioaktywność była większa niż  $2 \times 10^6$  cpm.

#### 3.2.6.4 *Hybrydyzacja*

Membranę po związaniu z nią RNA umieszczono w szklanym cylindrze, a następnie inkubowano z mieszaniem w 68°C przez 1 godzinę w buforze PerfectHyb Plus. Oczyszczoną sondę zdenaturowano przez 10 min. inkubacją w 100°C i 2 min. na lodzie, a następnie dodano do cylindra z membraną i inkubowano przez noc z mieszaniem w 68°C. Następnego dnia zlano roztwór hybrydyzacyjny, a membranę płukano 3 razy po 20 min w 73°C w 1x SSC z dodatkiem 0,1% SDS z mieszaniem. Membranę następnie zawinięto w folię, włożono do kasety, nakryto ekranem do autoradiografii i pozostawiono na noc w zamkniętej kasecie.

#### 3.2.6.5 *Odczyt sygnału*

Sygnał odczytano za pomocą skanera laserowego FLA 5100 i programu Image Reader. Uzyskane wyniki analizowano w programie MultiGauge. Jako kontrola ilości nałożonego na żel RNA przeprowadzano detekcję transkryptu GAPDH. Odczytaną wcześniej membranę zalewano gotującym 0,1% SDS i inkubowano przez 30 min w 80°C z mieszaniem. Po tym przygotowywano sondę skierowaną na GAPDH a następnie przeprowadzano hybrydyzację i odczytywano sygnał, tak jak opisano to powyżej.

#### 3.2.7 *Analiza poziomu białka metodą Western blot*

##### 3.2.7.1 *Liza komórek i pomiar stężenia białka*

Komórki SH-SY5Y po indukcji ekspresji transgenu lub komórki HEK293T po transfekcji plazmidem z którego ekspresji ulegał transgen ataksyny-3 zebrano a następnie zawieszono w 100 µl 1x buforu PB i sonikowano. Proces ten przeprowadzono za pomocą sonikatora Bioruptor®Pico i z zastosowaniem następujących parametrów: 30 s. ON/30 s. OF, 3 cykle, 4°C. Stężenie białka w otrzymanych preparatach mierzono na spektrofotometrze DS-11 przy długości fali 280 nm.

##### 3.2.7.2 *Elektroforetyczny rozdział białek w warunkach denaturujących*

Elektroforetyczny rozdział białek prowadzono w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących standardowo stosując 10% żel rozdzielający i 5% żel zagęszczający. Próby na żel przygotowano dodając do otrzymanych lizatów 3x stężony bufor obciążający i inkubując 5

### 3. Materiały i Metody

min. w 95°C. Na żel nanoszono próbki o objętości odpowiadającej 20 µg białka. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez około 2 godziny przy stałym napięciu 100 V w aparacie Mini-Protean®Tetra zawierającym bufor Laemmli. W celu określenia masy molekularnej rozdzielanych białek stosowano marker wielkości białek Pageruler™ Prestained Protein Ladder, który obejmuje zakres białek od 10 kDa do 180 kDa.

#### *3.2.7.3 Transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową*

Membranę nitrocelulozową o wielkości porów 0,45 µm i bibułę Whatman przycięto do wielkości żelu. Żel po elektroforezie, gąbki jak i bibuły Whatman namaczano przez 10 min. w buforze do elektrotransferu. Membranę inkubowano najpierw 1 min. w wodzie a potem przez 10 min. w buforze do transferu. Następnie w plastikowej kasecie ułożono na sobie kolejno gąbkę, 3 bibuły Whatman, membranę nitrocelulozową, żel poliakrylamidowy, 3 bibuły Whatman i gąbkę. Tak przygotowaną kasetę umieszczono w aparacie między elektrodami, włożono wkład chłodzący i mieszadło magnetyczne a następnie zalano buforem do transferu. Transfer prowadzono przez noc w 4°C z mieszaniem i przy napięciu 30V. Efektywność procesu była sprawdzana za pomocą barwienia roztworem Ponceau S.

#### *3.2.7.4 Detekcja białek*

Po barwieniu roztworem Ponceau S membranę płukano 3x TBS-T przez 10 min. z mieszaniem aby pozbyć się zupełnie tego barwnika. Następnie, membranę inkubowano przez 1 godzinę w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w buforze TBS-T aby zablokować miejsca niespecyficzne z którymi nie są związane białka. Po tym czasie membranę płukano 3x TBS-T przez 10 min. po czym inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym przygotowanym w buforze TBS-T zawierającym 5% mleko lub 1% BSA (Tab. 2). Następnie membranę płukano 3x w TBS-T przez 10 min. i inkubowano przez 1 godzinę z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym, sprzężonym z peroksydazą chrzanową i przygotowanym jak wyżej. Po tym czasie membranę płukano 3x w TBS-T przez 10 min. a następnie przeprowadzano detekcję białek przy pomocy substratu dla peroksydazy chrzanowej WesternBright Quantum. Sygnał odczytano za pomocą systemu G:box.

### 3. Materiały i Metody

#### 3.2.7.4 Przygotowanie membrany do ponownej detekcji

Odczytaną wcześniej membranę płukano najpierw 2x w TBS-T przez 10 min. a następnie inkubowano 2x 30 min. w 25 mM roztworze glicyny pH 2.0 w celu usunięcia związanych uprzednio przeciwciał. Następnie membranę płukano 2x w TBS-T przez 10 min. i blokowano przez 1 godzinę w roztworze 5% mleka w buforze TBS-T. Po tym czasie membranę inkubowano z kolejnym przeciwciałem pierwszorzędowym. Inkubację z przeciwciałem drugorzędowym i detekcją białek z użyciem substratu dla peroksydazy chrzanowej przeprowadzono w ten sam sposób jak opisano powyżej.

#### 3.2.8 Barwienia *in situ*

##### 3.2.8.1 Immunofluorescencja

Komórki SH-SY5Y hodowano na szkiełkach pokrytych poli-lizyną. Po odpowiednim czasie, komórki przepłukano roztworem PBS i inkubowano przez 30 min. w 4% roztworze paraformaldehydu. Następnie komórki przepłukano trzy razy po 5 min. PBS z mieszaniem a następnie permeabilizowano przez 10 min. inkubację w 0,5% Tritonie X-100 w PBS. Przepłukano trzy razy po 5 min. PBS z mieszaniem i blokowano w 1% roztworze BSA w PBS przez jedną godzinę. Przepłukano trzy razy po 5 min. PBS z mieszaniem. Inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi rozcieńczonymi w PBS z dodatkiem 1% BSA. Przepłukano trzy razy po 5 min PBS z mieszaniem. Inkubowano w 4°C w ciemności przez 1 godzinę z odpowiednimi przeciwciałami II-rzędowymi rozcieńczonymi 1:1000 w PBS z dodatkiem 1% BSA. Przepłukano trzy razy po 5 min PBS z mieszaniem. Na szkiełko podstawowe nakropiono krople SlowFade™ Diamond Antifade Mountant with DAPI, położono na nie szkiełka a następnie ich brzegi zabezpieczono lakierem bezbarwnym. Preparaty obserwowano pod mikroskopem konfokalnym Leica TCS SP5. Analizy otrzymanych obrazów wykonano w programie LAS X.

##### 3.2.8.2 Wizualizacja pojedynczych cząsteczek RNA za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

Pojedyncze cząsteczki transkryptu analizowano za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (smFISH, ang. single molecule fluorescence *in situ* hybridization) według protokołu

### 3. Materiały i Metody

dostarczonego przez firmę Stellaris. W tym celu komórki SH-SY5Y hodowano na szkiełkach pokrytych poli-l-lizyną. Po odpowiednim czasie przepłukano je PBS i inkubowano przez 10 min. w 4% roztworze paraformaldehydu. Przepłukano trzy razy po 5 min. PBS z mieszaniem a następnie inkubowano w 100% etanolu przez noc w  $-20^{\circ}\text{C}$ . Następnego dnia szkiełka przepłukano PBS po czym inkubowano 5 min. w buforze A (1x stężony bufor A do smFISH, 10% dejonizowany formamid) w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Następnie, szkiełka inkubowano przez noc w  $37^{\circ}\text{C}$  w buforze hybrydazyjnym (na świeżo dodano do niego dejonizowany formamid do stężenia 10%) z sondami o stężeniu  $0,125\ \mu\text{M}$ , skierowanymi na transkrypty ataksyny-3 i GAPDH. Następnego dnia szkiełka inkubowano z buforem A przez 25 min. w  $37^{\circ}\text{C}$  z mieszaniem. Po tym czasie szkiełka płukano przez 5 min w buforze B w temperaturze pokojowej z mieszaniem. Na szkiełko podstawowe nakropiono krople roztworu zamykającego SlowFade™ Diamond Antifade Mountant with DAPI, położono na nie szkiełka a następnie ich brzegi zabezpieczono lakierem bezbarwnym. Preparaty obserwowano pod mikroskopem konfokalnym Leica TCS SP5. Analizy otrzymanych obrazów wykonano w programie LAS X.

#### *3.2.9 Poszukiwanie markerów toksyczności RNA użyciu sekwencjonowania RNA nowej generacji*

W wyprowadzonych modelach SCA3 zaindukowano ekspresję transgenu za pomocą dodania doksycykliny ( $1\ \mu\text{g/ml}$ ) do medium hodowlanego. Po 72 godzinach komórki zebrano i zawieszono w  $500\ \mu\text{l}$  odczynnika Tri Reagent a następnie wyizolowano całkowite RNA zestawem Direct-zol™ MiniPrep według protokołu producenta. Próbkę wyizolowanego RNA były poddawane analizie jakości materiału przy użyciu Agilent Bioanalyzer 2100 z wykorzystaniem zestawu chipów RNA 6000 Nano Kit. Do dalszych analiz brano próbki, których współczynnik RIN wynosił powyżej 9. Próbkę całkowitego RNA w ilości  $2\ \mu\text{g}$  zostały wysyłane na suchym lodzie do firmy GENEWIZ. Tam stworzono z nich biblioteki za pomocą zestawu NEBNext Ultra RNA Library Prep with rRNA depletion. Następnie, poddano je sekwencjonowaniu nowej generacji na platformie Illumina HiSeq według protokołu platformy, z zastosowaniem następujących parametrów: około 80 M odczytów z każdego końca nici DNA, długość odczytu: 150 pz. Analizy bioinformatyczne, uzyskanych w formacie FASTQ danych były prowadzone we współpracy z dr Michałem Szcześniakiem i prof. dr hab. Izabelą Makałowską (UAM). Dane otrzymane z analiz głębokiego sekwencjonowania zostały zmapowane do ludzkiego transkryptomu: Ensembl wersja 94, następnie z użyciem programu

### 3. Materiały i Metody

DESeq2 zidentyfikowano geny o zmienionej ekspresji. Do dalszych analiz brano geny których krotność zmiany ekspresji między badanymi liniami była istotna statystycznie ( $q < 0,05$ ). Analizy ontologiczne wykonano za pomocą programu Enrichr, otrzymane wyniki istotne statystycznie ( $q < 0,05$ ) zwizualizowano w programie Cytoscape za pomocą wtyczek ClueGo i CluPedia.

#### *3.2.10 Poszukiwanie markerów toksyczności RNA przy użyciu proteomiki ilościowej*

W wyprowadzonych modelach SCA3 zaindukowano ekspresję transgenu za pomocą dodania doksycykliny (1  $\mu\text{g/ml}$ ) do medium hodowlanego. Po 72 godzinach komórki zebrano i zawieszono w 100  $\mu\text{l}$  1x buforu RIPA, poddano sonikacji. Proces ten przeprowadzono za pomocą sonikatora Bioruptor®Pico i z zastosowaniem następujących parametrów: 30 s. ON/30 s. OF, 3 cykle, 4°C. Stężenia otrzymanych preparatów zmierzono za pomocą metody BCA według protokołu producenta. Następnie białko strącono za pomocą mieszaniny metanol/chloroform i zawieszono w 6M roztworze mocznika. W takiej postaci próbki na suchym lodzie zostały wysłane do Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas przy Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie gdzie zostały wykonane ilościowe analizy proteomiczne. Próbki zostały poddane redukcji, a następnie trawieniu za pomocą mieszaniny trypsin/LysC (Promega) i używając stosunku enzym-białko 1:25. Następnie przeprowadzono ich znakowanie za pomocą znaczników iTRAQ 8-plex (Sciex) i frakcjonowanie używając chromatografii odwróconej fazy w wysokim pH. Uzyskane frakcje zostały zanalizowane za pomocą systemu LC-MS. Pozyskane dane MS/MS zostały wstępnie przetworzone za pomocą oprogramowania Mascot Distiller (2.6.2, MatrixScience). Następnie używając Mascot Search Engine (MatrixScience, Mascot Server 2.5) przeszukano bazę Swissprot (2018.06, 20 435 sekwencji) w poszukiwaniu zdeponowanych tam sekwencji ludzkich białek. W ten sposób uzyskano szacunkowe wartości  $q$  dla każdego dopasowania widm peptydów z analizowanych danych. Analiza statystyczna wyników ilościowych została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania Diffprot (Malinowska *et al.*, 2012).

Dane pozyskane ze Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas IBB poddano analizie w programie STRING. Analizowano białka których krotność zmiany ilości między badanymi liniami komórkowymi wynosiła więcej niż 1,1 i była istotna statystycznie ( $q < 0,05$ ). Osobno analizowano białka o obniżonej i podwyższonej ekspresji. Następnie wyniki poddano analizie ontologicznej w programie Cytoscape z wykorzystaniem wtyczki GOlizer.



#### 3.2.11 Obliczenia statystyczne

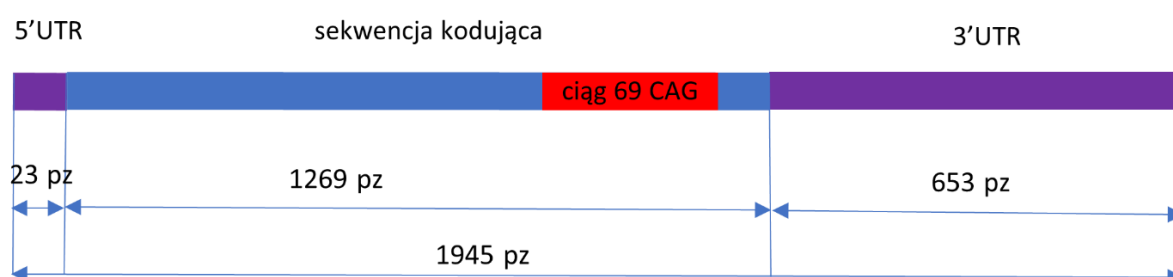
Analizy statystyczne otrzymanych danych przeprowadzono w przypadku PCR w czasie rzeczywistym i tworzenia się agregatów w komórkach nieodróżnicowanych za pomocą analizy wariancji One-Way ANOVA Kruskal-Wallis połączonej z testem post hoc Dwass, Steel, Critchlow-Fligner. Dla tworzenia się agregatów w komórkach zróżnicowanych użyto testu t studenta dla prób niezależnych. Różnice w zastosowanych testach w stosunku do danych otrzymanych z tworzenia się agregatów wynikają z tego, że w przypadku komórek nieodróżnicowanych dane dla poszczególnych grup posiadały różne wariancje, a więc nie spełniały założeń testu t-studenta. W przypadku analizy ilości sygnałów od ciętej kaspazy-3 użyto jednoczynnikowej analizy wariancji One-Way ANOVA połączonej z testem post hoc Tukey. Do analiz użyto danych z trzech powtórzeń danego eksperymentu. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano używając programu jamovi 1.0, różnice między wartościami uznawano za istotnie statystycznie gdy  $p < 0,05$ . Wyniki liczbowe przedstawiono jako wartość średnią  $\pm$  błąd standardowy.

## 4. Wyniki

### 4.1 Przygotowanie konstruktów do wygenerowania stabilnych izogenicznych modeli komórkowych SCA3

W celu określenia roli jaką odgrywa transkrypt zmutowanej ataksyny-3 w patogenezie SCA3, wygenerowano nowe modele komórkowe tej choroby z ekspresją pełnej długości transkryptów ulegających, bądź nie ulegających translacji, zawierających powtórzenia CAG o długości: patogenicznej (120 powtórzeń) i normalnej (20 powtórzeń). Model z ekspresją zmutowanego transkryptu nieulegającego translacji obrazuje potencjalną toksyczność tylko RNA, natomiast ten z ekspresją zmutowanego transkryptu ulegającego translacji odzwierciedla toksyczność zarówno białka, jak i potencjalną toksyczność RNA. Aby zobrazować toksyczność białka stworzono modele, w których motyw powtórzony CAG został zastąpiony przez takiej samej długości ciąg powtórzeń CAA. Kodon CAA podobnie jak CAG koduje glutaminę, jednak w przeciwieństwie do ciągów CAG, ciągi CAA nie tworzą w RNA struktury spinki uważanej za toksyczną. Model komórkowy z ekspresją transkryptu ataksyny-3 z ekspansją powtórzeń CAA ulegającego translacji obrazuje tylko toksyczność białka, model z ekspresją transkryptu nieulegającego translacji nie wykazuje potencjalnie toksyczności.

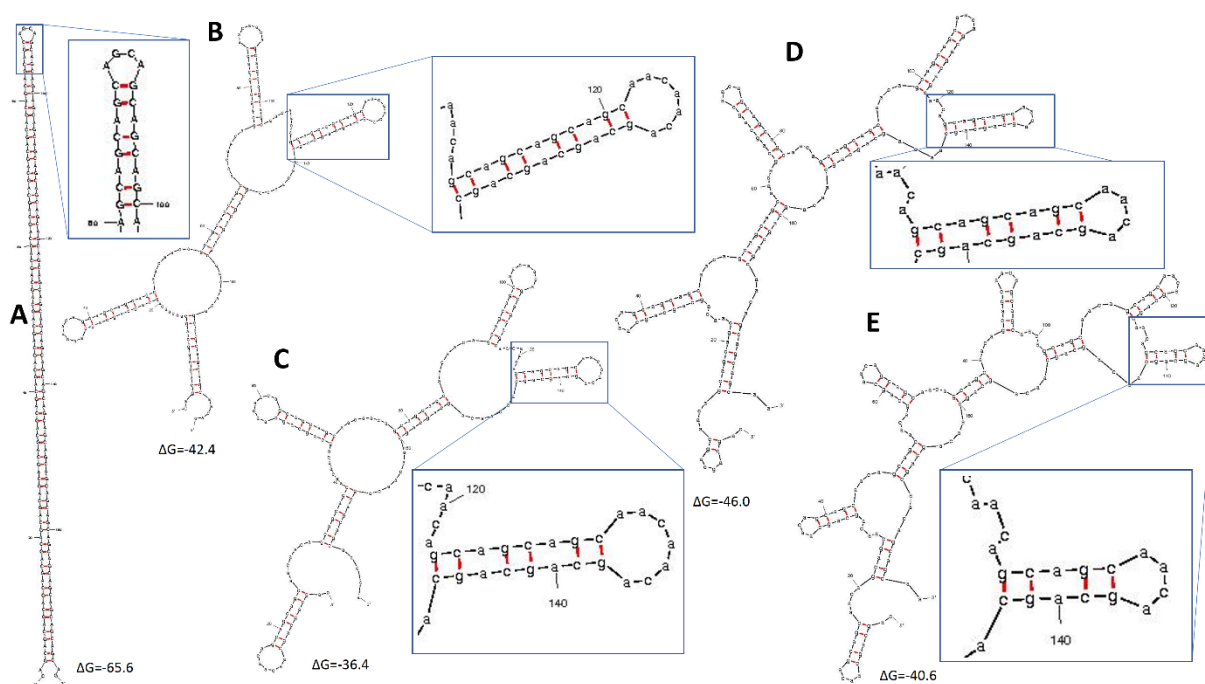
Konstruktem wyjściowym użytym do otrzymania wszystkich zaplanowanych wariantów genu ataksyny-3 był przygotowany w ZBM wektor pGEM®-T Easy zawierający cDNA kodujący ataksynę-3 z 69 powtórzeniami CAG oraz fragmenty końców 5' i 3' UTR (Ryc. 12).



Rycina 12. Schemat cDNA ataksyny-3 z 69 powtórzeniami CAG w wektorze pGEM®-T Easy.

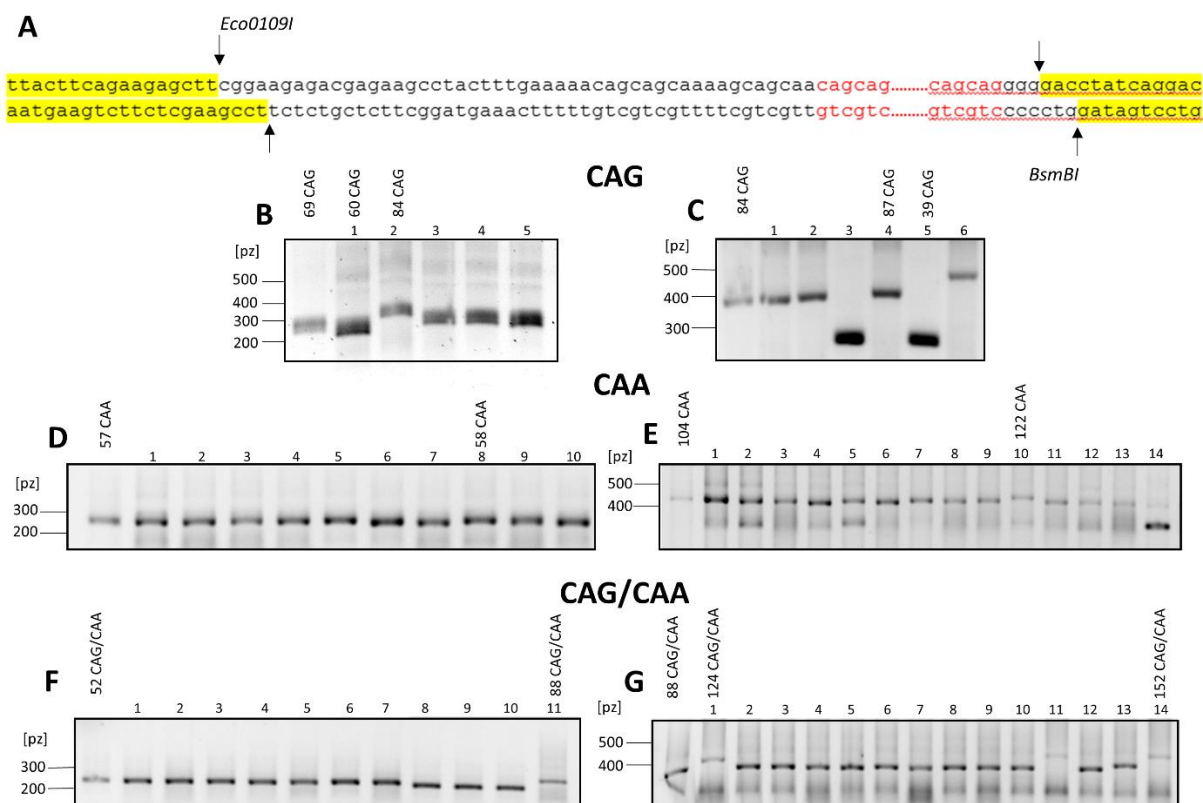
### 4.1.1 Wydłużenie ciągów powtórzeń trójnukleotydowych metodą SLIP

Transgeny ataksyny-3, zawierające 20 powtórzeń CAG lub CAA przygotowano przez wycięcie ciągu CAG z wektora ATXN3 69 CAG i ligację w to miejsce wstawek, zawierających odpowiednie ciągi powtórzeń. Transgeny zawierające 120 powtórzeń zostały otrzymane przez zastosowanie metody SLIP. Metoda ta, polegająca na poddaniu reakcji PCR produktów trawienia restrykcyjnego, umożliwia wydłużenie lub skrócenie już istniejącego ciągu powtórzeń. Konstrukcjami użytymi w tej metodzie były ATXN3 69 CAG i ATXN3 20 CAA. Zarówno kodony CAG i CAA kodują glutaminę, jednak kodon CAG jest wykorzystywany w translacji w ludzkich komórkach trzy razy częściej niż kodon CAA. Z tego powodu możliwe było, że transkrypt zawierający długi ciąg CAG kodowany przez powtórzenia CAA nie będzie ulegał wydajnej translacji i nie będzie z niego powstawało odpowiednie białko. Dlatego zdecydowano się na wygenerowanie dodatkowo transgenów ataksyny-3, w których ciąg CAG będzie zawierał interupcje CAA. W transkrypcie ataksyny drugiej, normalne warianty tego genu, zawierają ciągi CAG z interupcjami CAA (Imbert *et al.*, 1996; Pulst *et al.*, 1996; Sanpei *et al.*, 1996; Pujana *et al.*, 1999; Choudhry *et al.*, 2001). Pokazano, że interupcje CAA występujące w ciągu CAG znacząco zmieniają strukturę RNA tworzoną przez powtórzenia CAG. Jednak ograniczenia metody SLIP (wydłużeniu ulega ciąg składający się z powtarzalnych motywów) uniemożliwiają skorzystanie z tego występującego naturalnie wzoru interupcji (Sobczak and Krzyzosiak, 2005). Z tego powodu wykorzystano program Mfold do modelowania struktury kilku potencjalnych wariantów ciągu CAG z interupcjami CAA: (CAG)<sub>4</sub>(CAA)<sub>2</sub>, (CAG)<sub>3</sub>(CAA)<sub>2</sub>, (CAG)<sub>3</sub>CAA, and (CAG)<sub>2</sub>CAA (Ryc. 13). Z przeanalizowanych wariantów wybrano model D - (CAG)<sub>3</sub>CAA, ponieważ w porównaniu do innych wariantów posiada małą częstość kodonów CAA, niemal najmniejszy rozmiar powtarzającego się modułu (mniejszy jest tylko (CAG)<sub>2</sub>CAA) i wystarczająco zaburzoną strukturę spinki (Sobczak and Krzyzosiak, 2005). Wariant genu ataksyny-3 zawierający 20 CAG z interupcjami CAA (CAG/CAA - ciąg powtórzeń tworzony przez moduł (CAG)<sub>3</sub>CAA), został analogicznie otrzymany jak dla powtórzeń 20 CAG i 20 CAA.



**Rycina 13. Modelowanie RNA ciągu CAG z różnymi wzorami interupcji kodonem CAA za pomocą programu Mfold.** A-Struktura ciągu CAG. B-Wariant  $(CAG)_4(CAA)_2$ . C-Wariant  $(CAG)_3(CAA)_2$ . D-Wariant  $(CAG)_3CAA$ . E-Wariant  $(CAG)_2CAA$ ,  $\Delta G$  – energia swobodna (Zuker and Jacobson, 1998; Waugh *et al.*, 2002; Zuker, 2003; Figura *et al.*, 2015).

SLIP umożliwia szybką i efektywną elongację ciągu, jednak ilość powtórzeń o jaką się on wydłuża jest losowa i nie da się jej kontrolować. Ponadto, wydłużenie nie zawsze jest wystarczająco duże. Z tego powodu proces przygotowania transgenów z długimi ciągami powtórzeń był wieloetapowy. Konstrukty otrzymywane metodą SLIP, były dalej wydłużane, aż do otrzymania ciągów o odpowiedniej długości. Wydłużone konstrukty były identyfikowane za pomocą kolonijnego PCR. Klony, które posiadały wydłużony ciąg powtórzeń były następnie poddawane sekwencjonowaniu w celu określenia dokładnej długości ciągu. Do wydłużania ciągów CAG została zastosowana oryginalna metoda SLIP. Natomiast wydłużenie ciągów 20CAA i 20CAG/CAA zostało przeprowadzone w temperaturze hybrydyzacji 50 i 45°C. Przykładowe etapy elongacji ciągów powtórzeń CAG, CAA i CAG/CAA jak i miejsca restrykcyjne wykorzystane w metodzie SLIP przedstawiono na Ryc. 14.



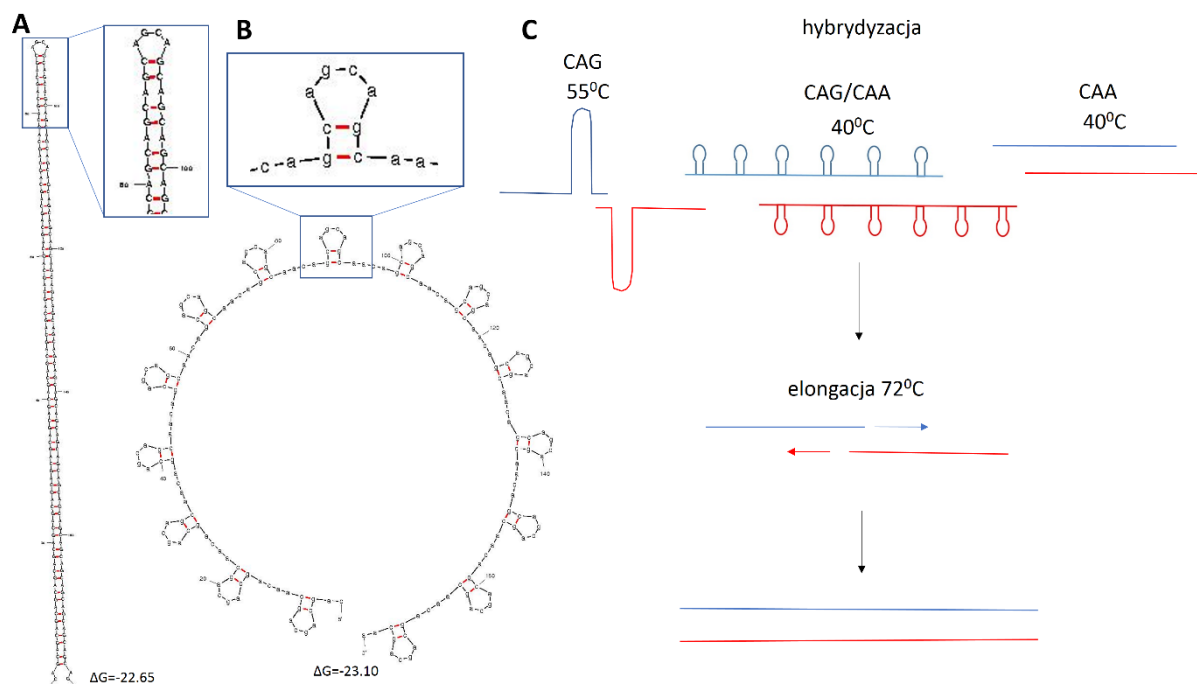
**Rycina 14. Przykładowe etapy wydłużania ciągów powtórzeń CAG, CAG/CAA i CAA, mające na celu otrzymanie ciągów z 120 powtórzeniami.** A-Miejsca restrykcyjne zastosowane w metodzie SLIP. B-Wydłużanie konstruktu ATXN3 69 CAG. C-Wydłużanie konstruktu ATXN3 84 CAG. D-Wydłużanie konstruktu ATXN3 57 CAA. E-Wydłużanie konstruktu ATXN3 104 CAA. F-Wydłużanie konstruktu ATXN3 52 CAG/CAA. G-Wydłużanie konstruktu ATXN3 88CAG/CAA. Numerami oznaczono kolejne klony, te, których ciągi zostały zsekwencjonowane, opisano dodatkowo ilością i rodzajem powtórzeń.

Sumaryczne wyniki z serii eksperymentów SLIP mających na celu wydłużanie wspomnianych powyżej ciągów powtórzeń przedstawiono w Tabeli 4. Jak pokazano wielkość wydłużenia danego ciągu jest losowa. Ponadto krótsze ciągi są mniej podatne na wydłużanie niż dłuższe ciągi powtórzeń, co jest zgodne z cechami metody SLIP. Jest to głównie związane z tym, że krótkie ciągi mają mniej możliwości do alternatywnej hybrydyzacji podczas cyklu PCR, stąd ich wydłużenie jest mniej prawdopodobne.

**Tabela 4. Wyniki serii kolejnych eksperymentów SLIP pokazujących efektywność metody dla poszczególnych rodzajów i długości powtórzeń.** długość – długość ciągu powtórzeń ↑ – liczba klonów posiadających wydłużony ciąg, ↓ – liczba klonów posiadających skrócony ciąg, suma – liczba zanalizowanych klonów. CAG, CAA, CAG/CAA – długość wydłużanego ciągu powtórzeń

CAG				CAA				CAG/CAA			
długość	↑	↓	suma	długość	↑	↓	suma	długość	↑	↓	suma
69	3	3	25	20	2	0	95	20	1	0	85
84	2	2	18	27	2	1	228	24	1	1	95
116	-	-	-	33	1	0	114	28	2	0	114
				36	1	0	114	36	4	1	114
				53	2	2	228	52	2	3	114
				58	1	2	114	88	7	2	114
				104	6	3	114	152	-	-	-
				150	-	-	-				

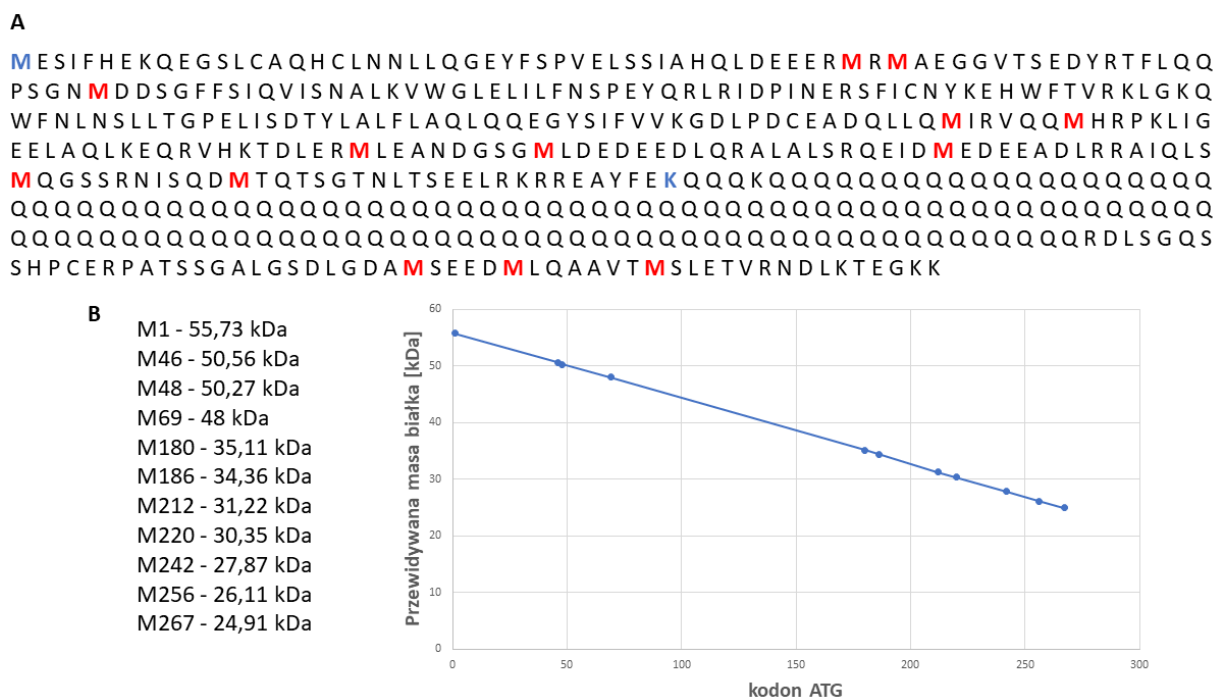
Różne rodzaje powtórzeń: CAG, CAA i CAG/CAA posiadają różne zdolności do zmiany swojej długości podczas SLIP, co może zostać zauważone przez porównanie liczby wydłużonych i skróconych klonów z liczbą wszystkich sprawdzonych klonów. Na przykład z konstruktów *ATXN3* 69 CAG za pomocą metody SLIP otrzymano 6 z 25 klonów z ciągiem o zmienionej długości, 3 o skróconym i 3 o wydłużonym ciągu. Dla konstruktów *ATXN3* 58 CAA znaleziono 3 klony o zmienionej długości ciągu spośród 114 sprawdzonych, natomiast w przypadku konstruktów 52 CAG/CAA 5 klonów z 114 sprawdzonych (Tab. 4). Ciągami najbardziej podatnymi na wydłużenie były ciągi CAG, następnie CAG/CAA, najmniej podatne były CAA. Obserwacje te mogą zostać wyjaśnione różnymi strukturami jakie przyjmują poszczególne rodzaje powtórzeń w stosowanej podczas eksperymentu temperaturze hybrydyzacji. Przewidywania struktur pokazują, że powtórzenia CAG tworzą długą strukturę spinki (Ryc. 15A), powtórzenia CAG/CAA tworzą liczne krótkie spinki oddzielone od siebie jednoniciowymi fragmentami (Ryc. 15B), natomiast powtórzenia CAA nie tworzą żadnej drugorzędowej struktury. Struktura spinki prawdopodobnie ułatwia niedokładną hybrydyzację sekwencji powtórzonych, co daje więcej możliwości dla wydłużania ciągu. Na Ryc. 15C przedstawiono wybrane hipotetyczne struktury zhybrydowanych produktów trawienia tworzonych przez trzy powyższe typy powtórzeń, co może wyjaśniać ich różnice w podatności na wydłużenie za pomocą metody SLIP.



**Rycina 15. Przewidywana struktura ciągów CAG i CAG/CAA wykonana dla 60 powtórzeń za pomocą programu Mfold i hipotetyczne zachowanie struktur tworzonych przez poszczególne rodzaje powtórzeń podczas SLIP. A – Struktura ciągów CAG w temperaturze 55°C. B – Struktura ciągów CAG/CAA w 40°C. Przedstawiono tylko struktury o najniższej energii. C – Postulowane zachowanie ciągów powtórzeń podczas SLIP. W temperaturze hybrydyzacji struktury spinek są relatywnie stabilne, z  $\Delta G = -22,65$  kcal/mol dla powtórzeń CAG i  $\Delta G = -23,15$  kcal/mol dla powtórzeń CAG/CAA. Przy temperaturze 72°C  $\Delta G$  podnosi się odpowiednio do -6,1 i 0,62, świadczy to o tym, że struktury spinek są mniej stabilne co umożliwia pracę polimerazie (Zuker and Jacobson, 1998; Waugh *et al.*, 2002; Zuker, 2003; Figura *et al.*, 2015) Na czerwono i niebieskie oznaczono produktu trawienia enzymami *BsmBI* i *Eco0109I*. Przewidywania zostały przeprowadzone dla temperatury odpowiadającej tej użytej w metodzie SLIP dla danego rodzaju powtórzeń.**

#### 4.1.2 Przygotowanie konstruktów z wariantami ataksyny-3 nieulegającymi translacji

W celu otrzymania transgenów nieulegających translacji kodon start – ATG w ataksynie-3 zmutowano na kodon stop - TAG za pomocą mutagenyzy ukierunkowanej. Ze względu na obecność alternatywnych kodonów ATG (Ryc. 16A) i możliwość powstawania z nich krótszych form ataksyny-3 z ciągiem poliQ, postanowiono wprowadzić dodatkowy kodon stop - TAA za alternatywnymi kodonami ATG tuż przed ciągiem CAG. W wyniku tego sekwencja ataksyny-3 TTTGAA~~AAA~~CAGCAGCA została zamieniona na TTTGAA~~TAA~~CAGCAGCA. Następnie wszystkie otrzymane transgeny zostały przeklonowane do wektora docelowego pCDH-EF1 $\alpha$ -MCS-BGH-PGK-GFP-T2A-Puro.

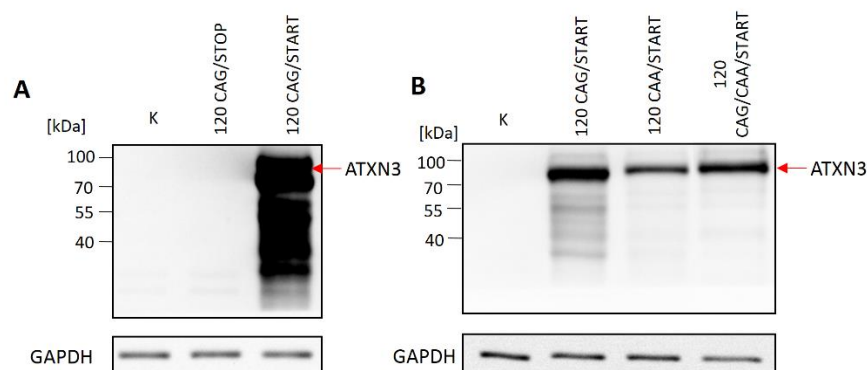


**Rycina 16. Białka powstające w wyniku kanonicznej i alternatywnej inicjacji translacji z kodonów ATG znajdujących się w zmutowanej ataksynie-3.** A - Sekwencja aminokwasowa ataksyny-3 zawierającej 120 powtórzeń CAG. Na niebiesko zaznaczono metioninę będącą pierwszym aminokwasem białka oraz lizynę, których kodony zostały zmienione na kodony stop. Na czerwono zaznaczono pozostałe metioniny, których kodony mogą służyć za alternatywne miejsca rozpoczęcia procesu translacji. B – Wykres przedstawiający zależność między masą białka, a inicjacją translacji z danego kodonu ATG (Gasteiger *et al.*, 2003).

#### 4.2. Weryfikacja otrzymanych konstruktyw w przejściowej transfekcji komórek HEK293T

Przed przystąpieniem do wyprowadzenia stabilnych linii komórkowych wygenerowane konstrukty zostały sprawdzone pod kątem ekspresji ataksyny-3 w przejściowej transfekcji komórek HEK293T. Analizę ekspresji transgeny za pomocą Western blot przeprowadzono po 48 godzinach od rozpoczęcia transfekcji. Na Ryc. 17 pokazano reprezentatywne wyniki na przykładzie konstruktyw ataksyny-3 zawierających długie ciągi powtórzeń CAG. Zaobserwowano efektywną translację białka o odpowiedniej masie w przypadku wszystkich konstruktyw ulegających translacji (Ryc. 17). Obliczona za pomocą narzędzia ExpASy masa białka zmutowanej ataksyny-3 wynosi około 55 kDa, jednak w niniejszej pracy ataksynę-3 z ciągiem 120Q obserwowano na wysokości odpowiadającej białku o masie około 80 kDa. Jak pokazują dane literaturowe może to być związane z tym, że ciąg poliQ zmienia prędkość migracji białka ataksyny-3 (Todi *et al.*, 2007). Ponadto wprowadzenie kodonu stop zamiast kodonu start oraz drugiego tuż przed ciągiem CAG zahamowało proces translacji (Ryc. 17A).





**Rycina 17. Analiza metodą Western blot poziomu białka ataksyny-3 w komórkach HEK293T transfekowanych wektorami zawierającymi odpowiednie transgeny ataksyny-3.** A – Poziom białka ataksyny-3 w komórkach transfekowanych konstruktami ATXN3 120 CAG/START i ATXN3 120 CAG/STOP. Membrana była celowo długo naświetlana w celu upewnienia się, że z konstruktów zawierających wprowadzone kodony stop nie powstaje białko ataksyny-3. B - Poziom białka ataksyny-3 w komórkach transfekowanych konstruktami ATXN3 120CAG/START, ATXN3 120 CAA/START i ATXN3 120 CAG/CAA/START. K – kontrola, komórki do których dodano tylko lipofektaminę. GAPDH zastosowano jako kontrolę ilości białka nakładanej na żel.

Translacja transgenów posiadających długi ciąg powtórzeń CAA zachodziła na nieco niższym poziomie niż w przypadku transgenów z ciągiem powtórzeń CAG/CAA (Ryc. 17B). Jednak ze względu na to, że ciąg powtórzeń CAA w przeciwieństwie do ciągu CAG/CAA nie tworzy w RNA żadnej struktury drugorzędowej, tym samym transkrypty je zawierające nie powinny wykazywać żadnej toksyczności, zdecydowano w dalszych badaniach wykorzystać transgeny z ciągiem CAA. W Tabeli 5 przedstawiono listę wszystkich otrzymanych konstruktów.

**Tabela 5. Lista otrzymanych konstruktów genetycznych z różnymi wariantami ataksyny-3.** „-” - brak obecności, „+” – obecność

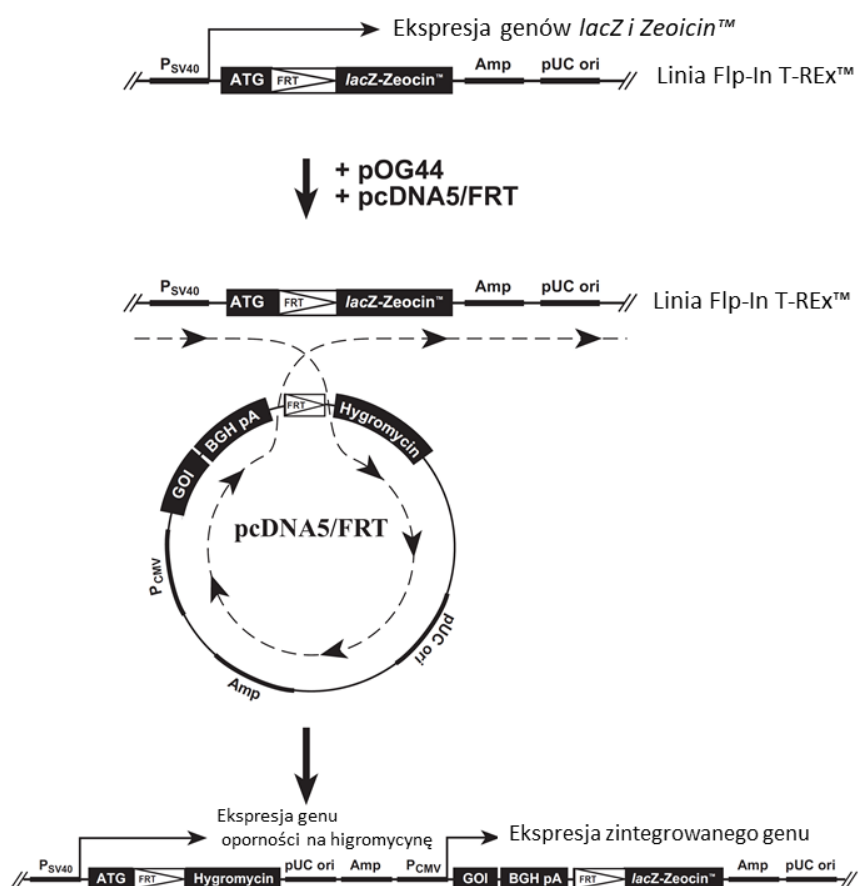
Model	Powtórzenia	Liczba powtórzeń	Transkrypt	Białko
20 CAG/START	CAG	20	+	+
20 CAG/STOP	CAG	20	+	-
120 CAG/START	CAG	120	+	+
120 CAG/STOP	CAG	120	+	-
20 CAA/START	CAA	20	+	+
20 CAA/STOP	CAA	20	+	-
120 CAA/START	CAA	120	+	+
120 CAA/STOP	CAA	120	+	-

## 4.3 Wyprowadzenie stabilnych izogenicznych modeli SCA3

## 4.3.1 Charakterystyka systemu Flp-In T-REx

Początkowo próbowano otrzymać stabilne linie komórkowe za pomocą systemu lentiwirusowego. Niestety mimo licznych prób, w tym zleceniu usługi firmie Sirion Biotech, nie udało się otrzymać aktywnych cząsteczek pseudowirusa. Z tego powodu postanowiono zmienić strategię postępowania i zastosować alternatywny system Flp-In T-REx.

System Flp-In T-REx umożliwia utworzenie stabilnych, izogenicznych i monoklonalnych linii komórkowych, dzięki wykorzystaniu miejscowo-specyficznego rekombinacji przeprowadzanej przez rekombinazę - flipazę (Flp, ang. flippase). Rekombinacja, która odbywa się między miejscami FRT, gdzie jedno jest obecne w genomie komórki, a drugie w konstrukcji genetycznej, zapewnia integrację badanego genu w jedno określone miejsce. Zapewnia to izogeniczność wygenerowanych modeli i niweluje wpływ kontekstu genetycznego na ekspresję wprowadzonego transgenu. Drugą zaletą systemu jest możliwość kontrolowanej indukcji syntezy transkryptu za pomocą doksycykliny. Schemat systemu Flp-In T-REx przedstawiono na Ryc 18.



Rycina 18. Schemat systemu Flp-In T-REx, według Invitrogen.

Do otrzymania modeli komórkowych SCA3 wybrano komórki ludzkiej linii neuroblastomy: SH-SY5Y, które zostały otrzymane ze szpiku kostnego pacjenta z nerwiakiem płodowym. Komórki linii SH-SY5Y wykazują wiele cech charakterystycznych dla komórek neuronalnych, jak aktywność hydroksylazy tyrozynowej i  $\beta$ -hydroksylazy dopaminy czy ekspresja receptorów dla neuronalnych czynników wzrostu. Z tego powodu są one powszechnie stosowanym modelem badawczym w eksperymentach dotyczących patogenezy chorób neurodegeneracyjnych w tym SCA3.

Przed przystąpieniem do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych transgeny przygotowane w wektorze pGEM® - T Easy zostały przeklonowane do wektora pcDNA5™/FRT/TO.

### *4.3.2 Wyprowadzenie stabilnych modeli SCA3 w linii komórkowej SH-SY5Y*

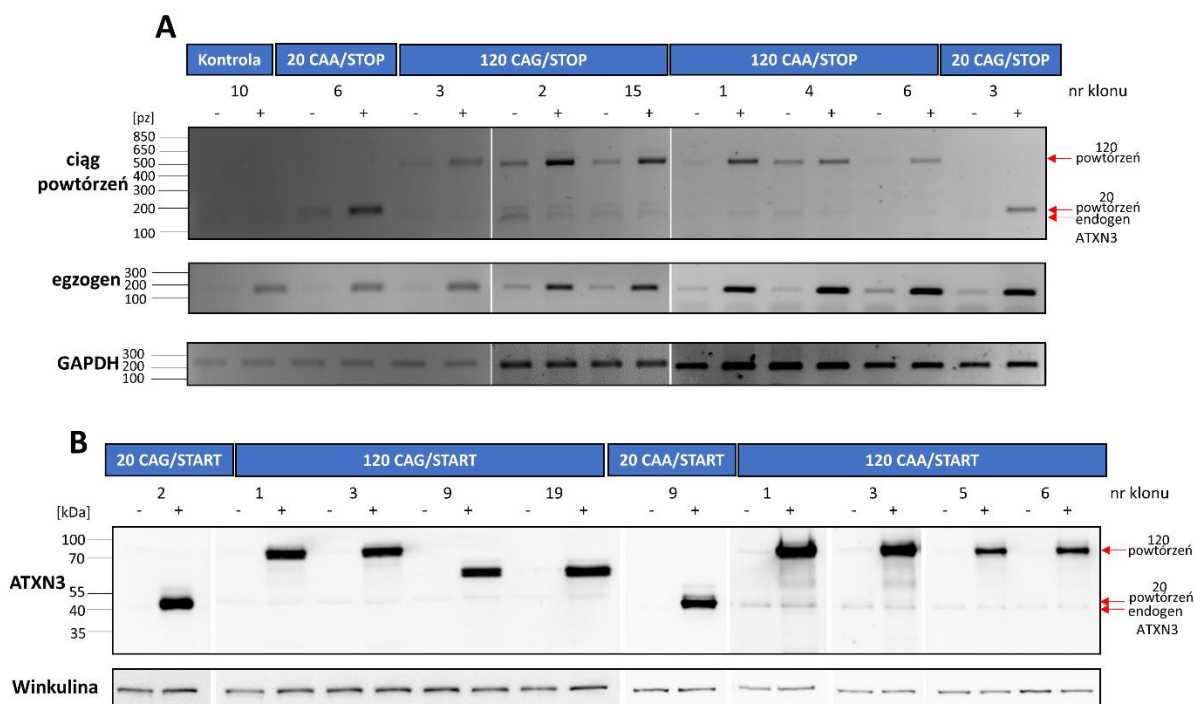
Modele komórkowe SCA3 zostały wygenerowane według protokołu producenta dla systemu Flp-in T-REx, który rozpoczynał się transfekcją komórek SH-SY5Y konstruktem, zawierającym odpowiedni wariant ataksyny-3 oraz wektorem kodującym rekombinazę Flp. Po 48 godzinach od transfekcji komórki były wysiewane na medium selekcyjne z dodatkiem higromycyny. Komórki, w których doszło do rekombinacji w miejscu FRT, z czasem tworzyły pojedyncze kolonie, które zostały następnie przeniesione do pojedynczych dołków na płytce 48-dołkowej, następnie były one propagowane aż do formatu płytki 10 cm.

Procedura generowania stabilnych modeli okazała się niezwykle trudna i długa, bowiem trwała około 15 tygodni. Komórki SH-SY5Y, w porównaniu do linii HEK293T czy HeLa, dzielą się wolniej, co około 48 godzin, dlatego w ich przypadku pierwsze kolonie pojawiały się na płytce dopiero po około 3-4 tygodniach, a nie po dwóch, jak w przypadku analogicznie otrzymanych modeli w linii HEK293T i HeLa w ZBM. Ponadto, ze względu na wolne tempo podziału komórek linii SH-SY5Y, wiele z przeniesionych klonów ulegało w trakcie hodowli degeneracji i śmierci (Tab. 6). Przyczyną tego mogły być też kolonie fałszywie pozytywne. Liczbę wszystkich przeniesionych klonów i wyprowadzonych linii przedstawiono w Tabeli 6. Jak widać spośród wielu przeniesionych kolonii tylko z nielicznych udało się wyprowadzić stabilne linie komórkowe.

Tabela 6. Liczba przeniesionych kolonii oraz ostatecznie wyprowadzonych klonów danej linii.

	kontrola	20 CAG/START	20 CAG/STOP	120 CAG/START	120 CAG/STOP	20 CAA/START	20 CAA/STOP	120 CAA/START	120 CAA/STOP
<b>Kolonie</b>	21	20	13	20	18	11	20	26	13
<b>Klony</b>	1	1	1	4	3	1	1	4	3

W celu potwierdzenia otrzymania modeli SCA3 wyprowadzone linie sprawdzono pod kątem ekspresji transgenu ataksyny-3 oraz długości ciągu ze względu na możliwość skracania niestabilnych ciągów powtórzeń w trakcie generowania linii. Analizy przeprowadzono po 48 godzinach od indukcji ekspresji ataksyny-3. Na podstawie analiz przeprowadzonych wcześniej w ZBM, jak i danych literaturowych wynika, że ten czas jest odpowiedni dla analiz ekspresji transgenu. Linie, w których ekspresji ulegały transkrypty ataksyny-3 z wprowadzonymi kodonami stop sprawdzano za pomocą standardowego PCR, natomiast linie, w których powstawało białko weryfikowano za pomocą metody Western blot. Z racji różnego tempa podziału komórek SH-SY5Y poszczególne klony były otrzymywane i analizowane w różnym czasie. Na Ryc. 19 przedstawiono zbiorcze analizy wszystkich sprawdzonych linii. Do analizy ekspresji transgenów za pomocą standardowego PCR wykorzystano dwie pary starterów, jedną amplifikującą region powtórzeń i drugą amplifikującą fragment sekwencji wektora pcDNA5™/FRT/TO. Z wykorzystaniem pierwszej pary sprawdzano długość ciągów powtórzeń a za pomocą drugiej pary sekwencję specyficzną dla transgenu.



**Rycina 19. Analizy weryfikujące zintegrowane transgeny ataksyny-3 w klonach linii SH-SY5Y wprowadzonych systemem Flp-In T-REx.** A – Analiza za pomocą standardowego PCR linii z wprowadzonymi do transgeny mutacjami stop. ciąg powtórzeń – produkty amplifikacji rejonu powtórzeń transgeny ataksyny-3 za pomocą PCR, transgen – produkty amplifikacji sekwencji specyficznej dla transgeny za pomocą PCR, GAPDH – produkty amplifikacji fragmentu genu *GAPDH* za pomocą PCR, reakcja została wykonana jako kontrola ilości matrycy branej do analiz PCR. B - Analiza Western blot linii w których z ekspresji transgeny powstawało białko. ATXN3 - poziom białka ataksyny-3, winkulina – poziom białka winkuliny, które zastosowano jako kontrola ilości białka nakładanej na żel. „-” – brak indukcji, „+” – indukcja, cyframi zostały oznaczone numery poszczególnych klonów.

Z przeprowadzonej analizy wynika, że w przypadku zarówno rejonu zawierającego ciąg powtórzeń jak, i sekwencji specyficznej dla transgeny otrzymano spodziewany i poprawny obraz dla wszystkich klonów (Ryc. 19A). Transgeny sprawdzonych klonów posiadają odpowiednią długość ciągu powtórzeń, ponadto są też widoczne różnice w intensywności produktów PCR między komórkami u których zaindukowana została ekspresja transgeny i komórkami nieindukowanymi. Z kolei, analizy Western blot potwierdziły spodziewaną masę powstającego białka w przypadku prawie wszystkich klonów w których transkrypt ulega translacji, tj. 42 kDa dla białek zawierających ciąg 20Q i 55 kDa dla (migrujących na wysokości białka o masie około 80 kDa) białek zawierających ciąg 120Q (Ryc. 19B). W klonach 9 i 19 linii 120 CAG/START powstawało białko o mniejszej masie, czego przyczyną był zapewne skrócony ciąg powtórzeń CAG. Z tego powodu obydwie klony 9 i 19 zostały odrzucone. Zarówno w analizach PCR, jak i Western blot pojawiał się sygnał w komórkach

nieindukowanych (Ryc. 19). Jest to związane z tzw. „nieszczelnością” systemu Flp-In T-REx, zjawiskiem będącym jedną z jego niewielkich wad i związanym z oddziaływaniami między Tet represorem a operatorem.

Do dalszych analiz wybrano klony: 10 dla linii kontrolnej, 2 dla 20 CAG/START, 3 dla 20 CAG/STOP, 1 dla 120 CAG/START, 2 dla 120 CAG/STOP, 9 dla 20 CAA/START, 6 dla 20 CAA/STOP, 3 dla 120 CAA/START i 1 dla linii 120 CAA/STOP, ponieważ oprócz poprawnych długości ciągu powtórzeń (transgeny nieulegające translacji) lub mas białka (transgeny ulegające translacji) wykazywały również najefektywniejszy poziom indukcji ekspresji.

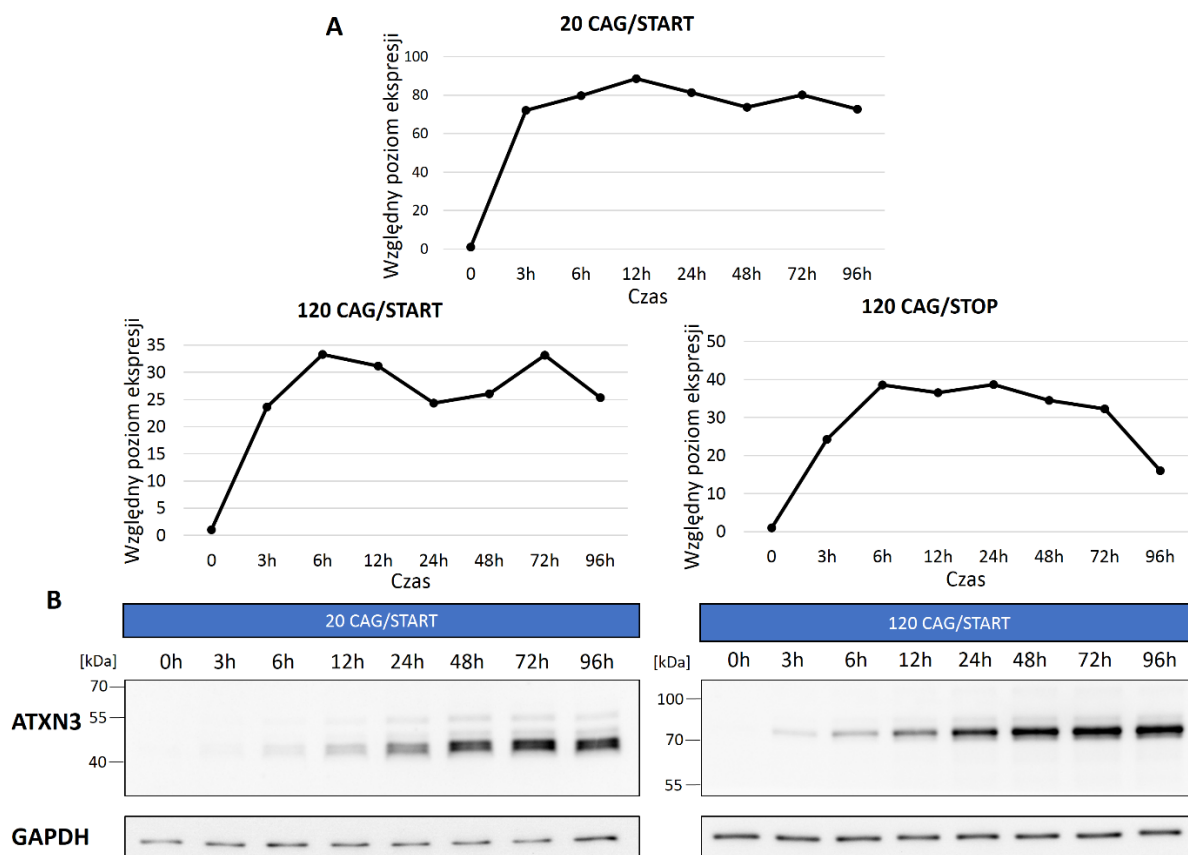
### **4.4 Charakterystyka molekularna stabilnych modeli SCA3**

Wszystkie wyprowadzone modele komórkowe, wybrane po wstępnych analizach PCR i Western blot, zostały poddane szczegółowej charakterystyce. Miała ona między innymi na celu określenie ekspresji transgeny w sposób jakościowy i ilościowy, a także analizę znanych markerów patogenezы SCA3 (agregaty białkowe, skupienia RNA, stres retikulum endoplazmatycznego i apoptoza).

#### *4.4.1 Określenie czasu po jakim poziom ekspresji transgeny osiąga wysycenie*

System Flp-In T-REx dzięki wykorzystaniu promotora CMV i Tet represora umożliwia kontrolowaną i efektywną ekspresję badanego transgeny. Jednak dla wyeliminowania wpływu poziomu ekspresji transgeny na otrzymywane wyniki kluczowe jest przeprowadzenie analiz po czasie w jakim system osiąga wysycenie. W celu określenia tego czasu w wybranych modelach SCA3 (20 CAG/START, 120 CAG/START oraz 120 CAG/STOP) za pomocą metody qPCR analizowano poziom mRNA, a za pomocą metody Western blot poziom białka ataksyny-3 w różnym czasie od indukcji ekspresji: 3, 6, 12, 24, 48, 72 i 96 godzinach, czas 0 został zastosowany jako kontrola. Reprezentatywne wyniki przedstawiono na Ryc. 20. W przypadku analizy poziomu mRNA maksymalne wysycenie systemu Flp-In T-REx obserwowano po około 6 godzinach od dodania doksycykliny dla każdej z linii, utrzymywało się ono na względnie stałym poziomie aż do 72 godzin (Ryc. 20A). Z kolei analizy Western blot pokazały, że system osiąga punkt wysycenia po 72 godzinach (Ryc 20B). Na podstawie uzyskanych wyników

kolejne analizy postanowiono wykonać na komórkach indukowanych doksyceklina przez co najmniej 72 godziny.



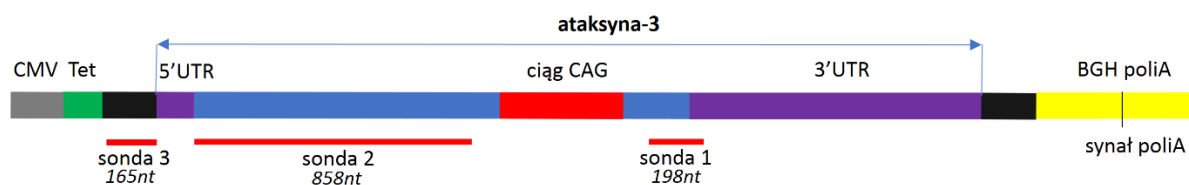
**Rycina 20. Analiza poziomu ekspresji transgeny ataksyny-3 w liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po różnym czasie od dodania doksycekliny. A – Analiza za pomocą qPCR, poziom ekspresji odnoszono do czasu 0. B – Analiza za pomocą Western blot. GAPDH zastosowano jako kontrolę nałożenia próbek na żel.**

#### 4.4.2 Analiza długości transkryptów ataksyny-3 metodą Northern Blot

W celu sprawdzenia długości powstających transkryptów ataksyny-3 całkowite RNA wyizolowane z komórek SH-SY5Y po 72 godzinach indukcji ekspresji transgeny poddano analizom Northern blot. Ze względu na to, że dane literaturowe analizujące tą metodą transkrypty ataksyny-3 zawierające długie ciągi powtórzeń są nieliczne, wymagane było opracowanie protokołu umożliwiającego wizualizację RNA zmutowanej ataksyny-3. Materiałem do badań w tych eksperymentach był RNA uzyskany z analogicznych modeli HEK293T wyprowadzonych wcześniej w ZBM. W celu wizualizacji badanych transkryptów ataksyny-3 zaprojektowano trzy różne sondy: dwie rozpoznające sekwencję ataksyny-3 oraz jedną rozpoznającą sekwencję specyficzną dla transgeny. Miejsca w których sondy przyłączają

się do transkryptu, przedstawiono poglądowo na Ryc. 21. Elektroforezę w żelu agarozowym prowadzono w trzech różnych buforach. Wykorzystano powszechnie stosowany w metodzie Northern blot bufor MOPS i jego alternatywne zamienniki: bufor TT i NBC. Bufor TT jest stosowany do wysokorozdzielczej elektroforezy długich RNA w żelu agarozowym, natomiast bufor NBC zwiększa specyficzność metody Northern blot (Ingelbrecht *et al.*, 1998; Mansour and Pestov, 2013).

Uwzględniając ogon poliA wielkość powstającego transkryptu zawierającego ciąg 20 powtórzeń powinna wynosić około 2500 nt, natomiast zawierającego ciąg 120 powtórzeń około 2800 nt. Na Ryc. 22A przedstawiono wyniki hybrydyzacji Northern blot przy zastosowaniu buforu MOPS.

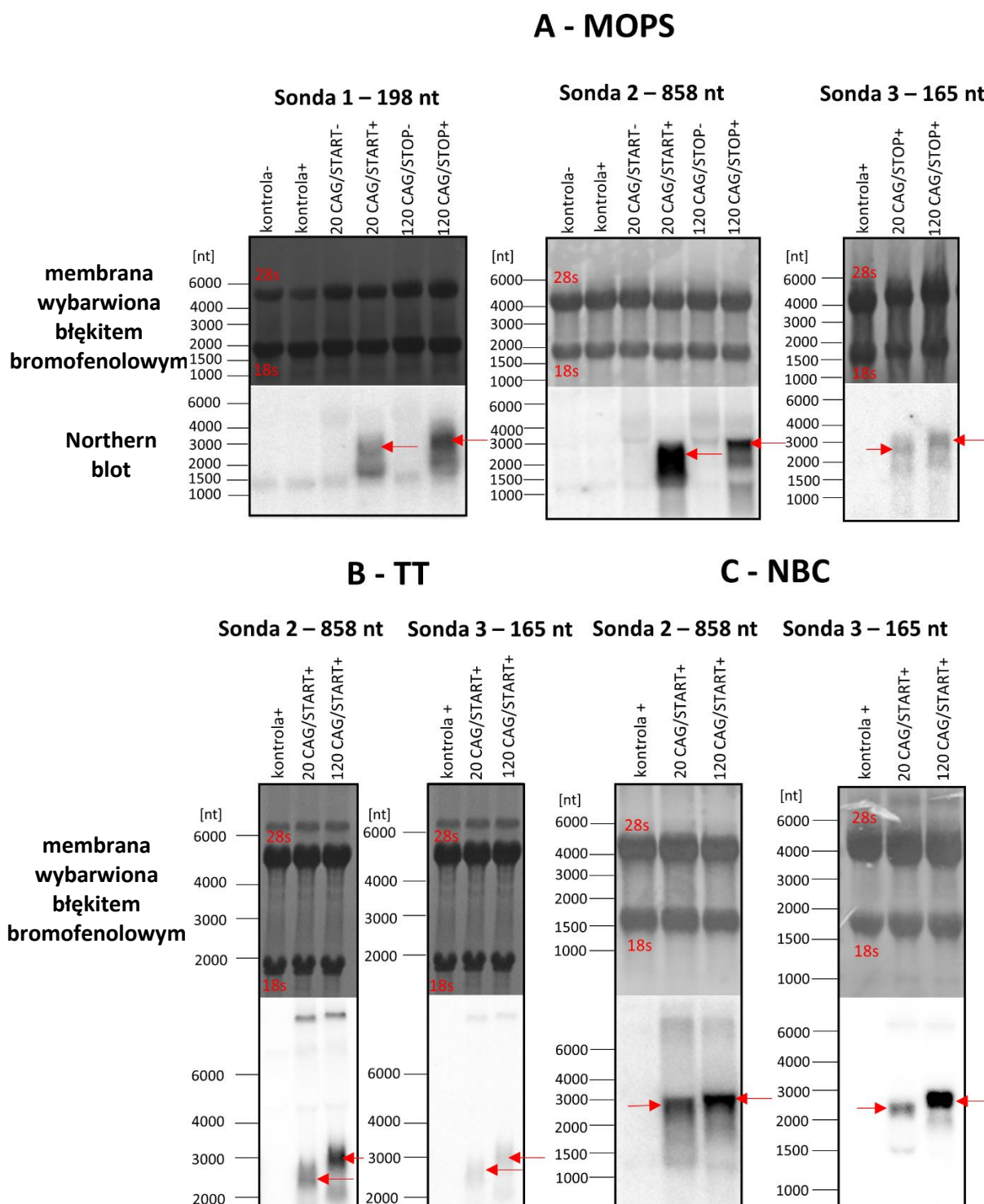


**Rycina 21. Schemat transkryptu transgenu ATXN3 z zaznaczonymi miejscami przyłączenia się sond użytych do analiz Northern blot.** Czerwonymi liniami zaznaczono poglądowo miejsca przyłączenia się sond. Poszczególne elementy transkryptu oznaczono kolorami: szarym – promotor CMV, zielonym – operator do którego przyłącza się Tet represor, czarnym – sekwencje pochodząca od plazmidu pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO, fioletowym – rejony 5' i 3' UTR ATXN3, niebieskim – cDNA ATXN3, czerwonym – ciąg CAG, żółtym – sekwencję BGH poli A pochodzącą od plazmidu pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO i zawierającą sygnał do poliadenylacji (poliA).

Jak widać, przy zastosowanych warunkach elektroforezy żadna z wykorzystanych sond nie dała sygnałów umożliwiających dokładną ocenę długości badanych transkryptów (Ryc. 22A). Ponadto, we wszystkich przypadkach pojawiały się niespecyficzne sygnały. Najgorszy obraz dała sonda 1, bowiem w przypadku linii 20 CAG/START sygnał niespecyficzny (dolny sygnał) był bardziej intensywny niż sygnał pochodzący od badanego transkryptu. Z tego powodu sonda 1 nie była wykorzystywana w kolejnych analizach. W następnych eksperymentach użyto sond 2 i 3 w buforach TT i NBC. Przy zastosowaniu buforu TT (Ryc. 22B), do rozdzału elektroforetycznego analizowanych próbek RNA, żadna z zastosowanych do hybrydyzacji sond nie dała sygnału o zadowalającej rozdzielczości. Uzyskane sygnały były nieostre i nie pozwalały na dokonanie dokładnej analizy wielkości transkryptów ataksyny-3. Natomiast, zastosowanie buforu NBC pozwoliło na otrzymanie dużo wyraźniejszych sygnałów dla badanych transkryptów (Ryc. 22C). Sonda 3 okazała się bardziej specyficzna niż sonda 2,

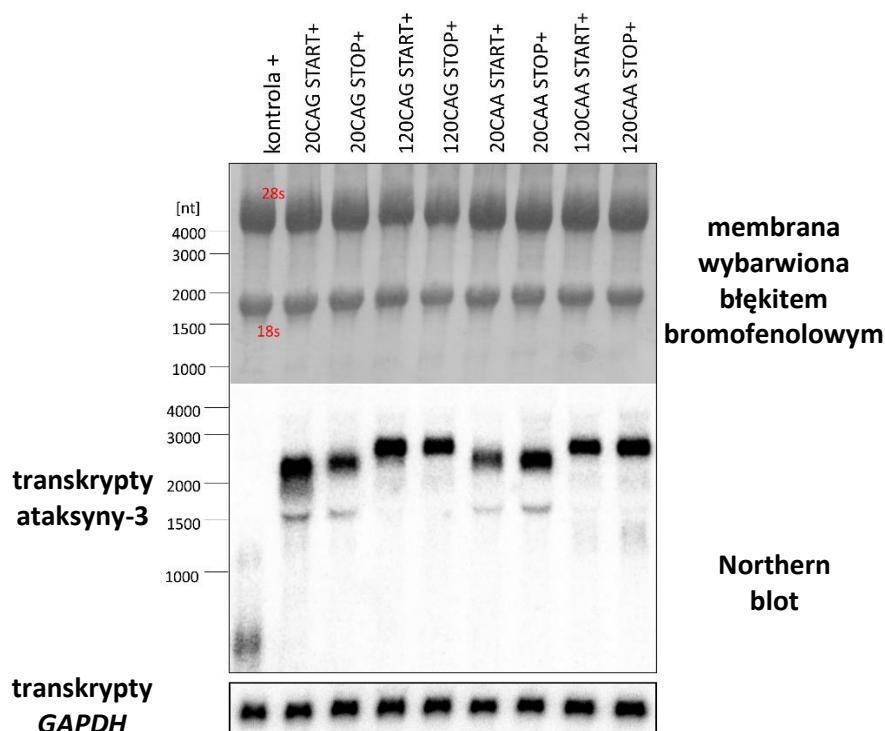


bowiem przy jej zastosowaniu uzyskane sygnały były ostrzejsze, a ponadto nie obserwowano niespecyficznego tła.



**Rycina 22. Analiza Northern blot długości transkryptów ataksyny-3 powstających w wybranych liniach komórkowych HEK293T wyprowadzonych w systemie Flp-In T-REX. A – Rozdział elektroforetyczny RNA w buforze MOPS. B – Rozdział elektroforetyczny RNA w buforze TT. C - Rozdział elektroforetyczny RNA w buforze NBC. Czerwonymi strzałkami zaznaczono sygnały pochodzące od odpowiednich transkryptów, „+” – indukcja ekspresji transgenu, „-” – brak indukcji ekspresji transgenu**

W związku z powyższym, właściwe analizy długości transkryptu w komórkach SH-SY5Y przeprowadzono stosując, do rozdziału RNA w żelu agarozowym, bufor NBC, natomiast do hybrydyzacji sondę 3. Jako kontrolę nałożenia próbek przeprowadzono detekcję transkryptu *GAPDH*. Wyniki przedstawiono na Ryc. 23. Analiza Northern blot potwierdziła poprawną długość transkryptów pochodzących z ekspresji transgenów zawierających zarówno ciąg 20 jak i 120 powtórzeń. Ponadto, w linii kontrolnej zaobserwowano sygnał odpowiadający transkryptowi o długości około 500 nt. Jest to związane z tym, że sonda 3 hybryduje do sekwencji z wektora pcDNA5™/FRT/TO, która jest obecna w transgenach ulegających ekspresji w liniach komórkowych wyprowadzonych systemem Flp-In T-REx.

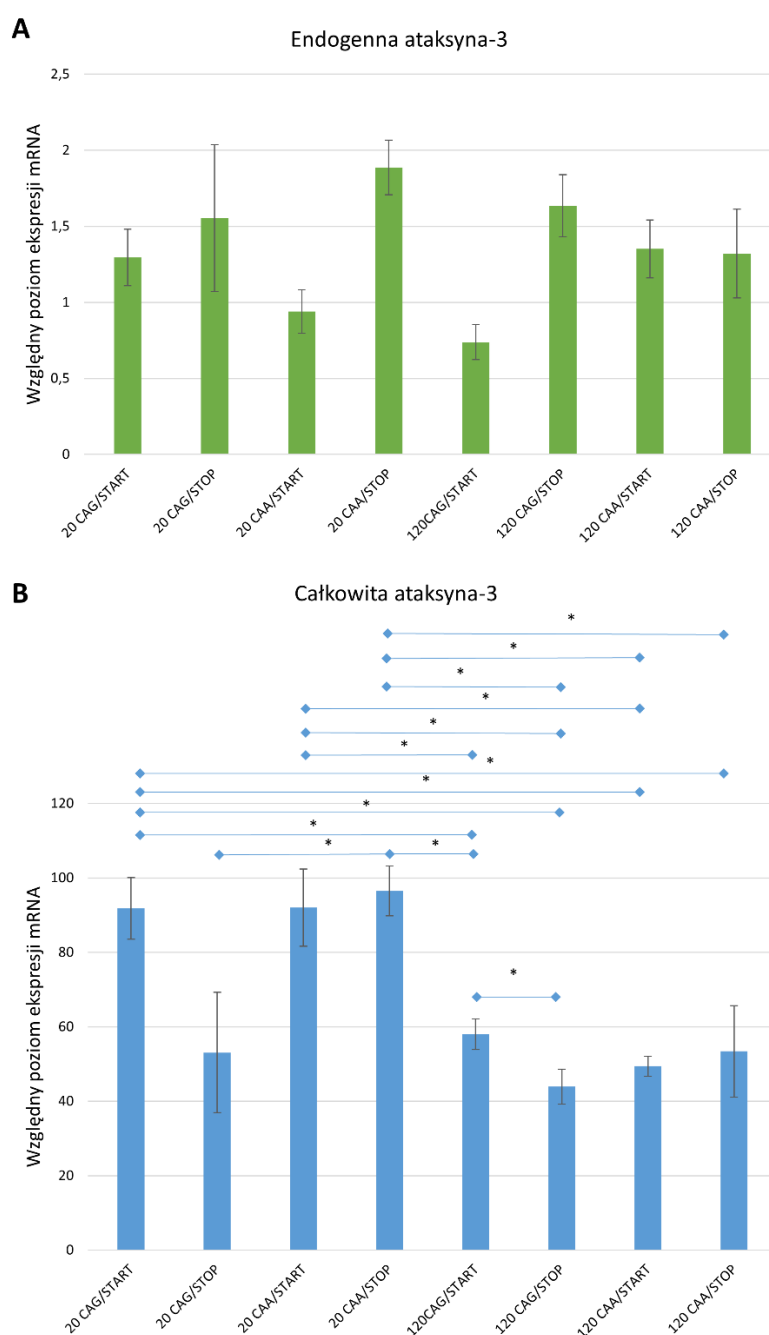


**Rycina 23. Analiza Northern blot długości transkryptów powstających w wyniku indukcji ekspresji transgenów ataksyny-3 w liniach SH-SY5Y wyprowadzonych za pomocą systemu Flp-In T-REx. „+” – indukcja ekspresji transgenu.**

### 4.4.3 Analiza poziomu ekspresji transgenu za pomocą qPCR

W celu dokładnego określenia poziomu ekspresji transgenów ataksyny-3 wyprowadzone linie komórkowe zostały poddane analizom za pomocą qPCR. Poziom ekspresji transgenów był badany po 72 godzinach od dodania doksycykliny. Ze względu na różnice w długości końców 3'UTR endogennej ataksyny-3 i transgenów było możliwe badanie całkowitego poziomu ekspresji ataksyny-3 (endogenu razem z transgenem) jak i samego endogenu. Poziom ekspresji ataksyny-3 w badanych modelach SCA3 był odnoszony do linii

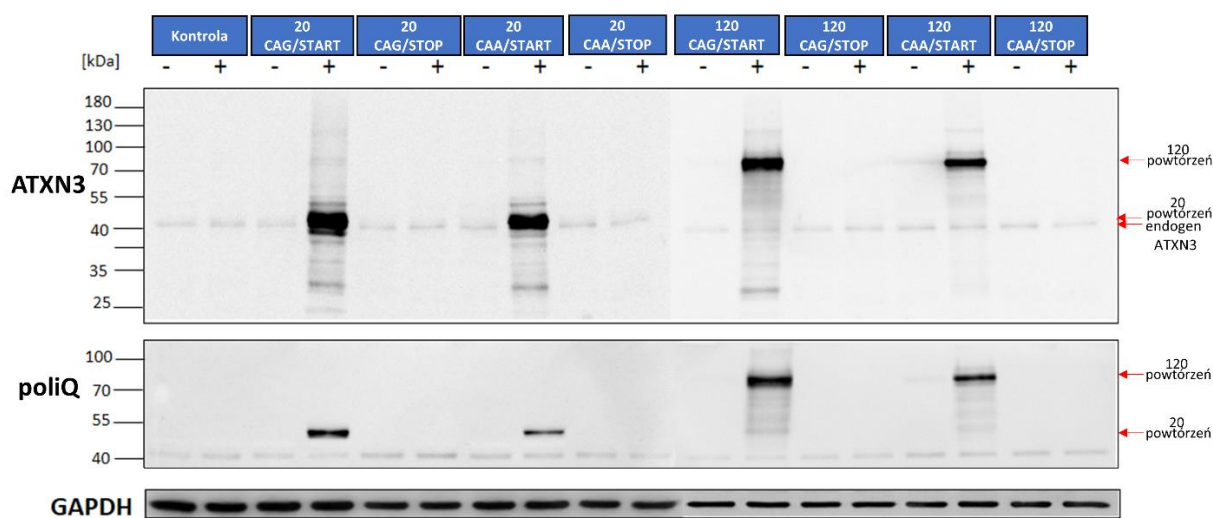
otrzymanej przy użyciu pustego wektora pcDNA5<sup>TM</sup>/FRT/TO (linia kontrolna). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji endogennej ataksyny-3 w badanych modelach (Ryc. 24A). Natomiast we wszystkich analizowanych liniach obserwowano istotne statystycznie zwiększenie poziomu ekspresji transgenu, który był co najmniej 40 krotnie wyższy w porównaniu do linii kontrolnej. (Ryc. 24B). Ponadto obserwowano, że transgeny zawierające krótki ciąg powtórzeń, oprócz 20 CAG/STOP, ulegały ekspresji na około dwa razy wyższym poziomie niż transgeny z długim ciągiem powtórzeń. Przyczyną tego może być niższa stabilność mRNA, zawierającego długie ciągi powtórzeń.



**Rycina 24. Analiza poziomu ekspresji ataksyny-3 za pomocą qPCR.** A – Względny poziom ekspresji endogennej ataksyny-3. B - Względny poziom ekspresji całkowitej ataksyny-3. \* -  $p < 0,05$

## 4.4.4 Jakościowa analiza białek powstających z ekspresji transgenu metodą Western Blot

W celu wykonania dodatkowej walidacji wyprowadzonych modeli SCA3 i zanalizowania wszystkich linii w tym samym czasie zbadano poziom białka ataksyny-3 przy pomocy metody Western blot. Analizy przeprowadzono 72 godziny po dodaniu do komórek doksycykliny. Ataksynę-3 wizualizowano za pomocą dwóch przeciwciał, jedno było skierowane na ataksynę-3 a drugie na ciąg poliQ (Ryc. 25).



**Rycina 25. Analiza poziomu ataksyny-3 w stabilnych liniach komórkowych SH-SY5Y za pomocą metody Western blot.** ATXN3 – detekcja ataksyny-3 za pomocą przeciwciała anty-ataksyna-3, poliQ – detekcja ataksyny-3 za pomocą przeciwciała anty-poliQ. „-” – brak indukcji ekspresji transgenu, „+” – indukcja ekspresji transgenu

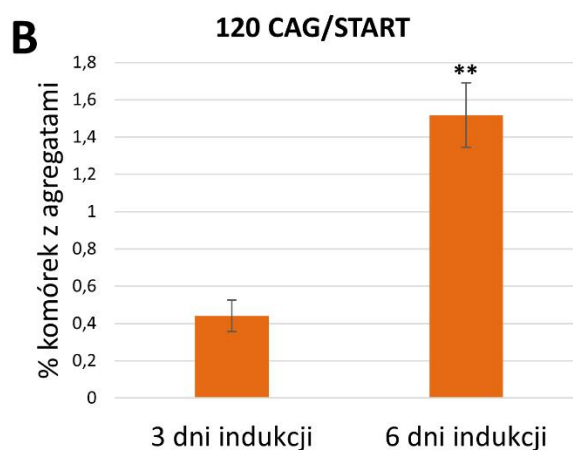
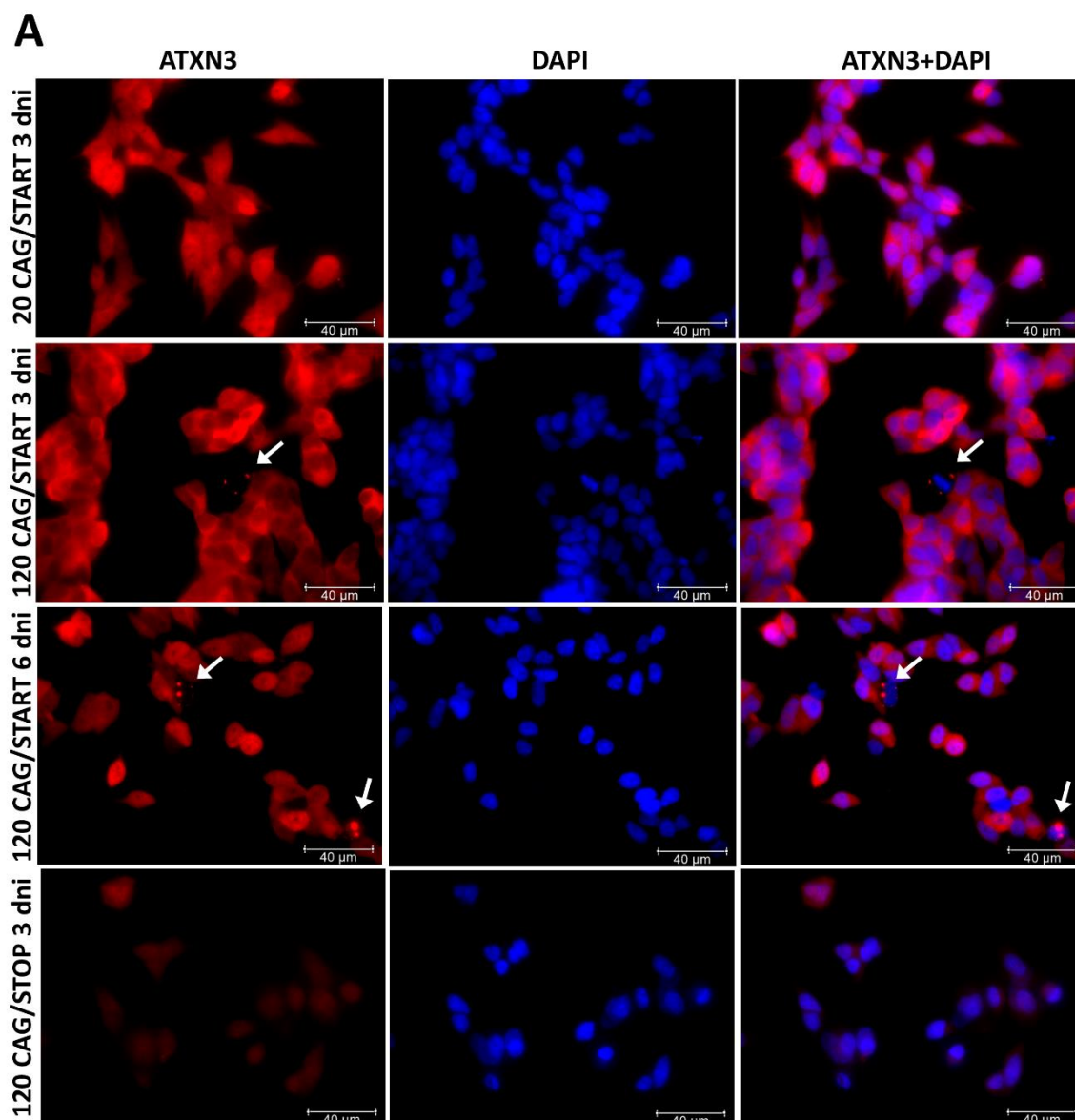
Analizy Western blot z zastosowaniem obydwu przeciwciał potwierdziły wyniki przeprowadzonych wcześniej analiz. Wszystkie powstające białka posiadały odpowiednią masę a wprowadzone do transgenów kodony stop hamowały proces translacji powstających z nich transkryptów.

## 4.4.5 Analiza znanych markerów patogenezy SCA3

Dalszym analizom zostały poddane wybrane linie: 20 CAG/START, stanowiąca w tych analizach linię kontrolną z ekspresją ataksyny-3 z normalną długością ciągu powtórzeń i linie zmutowane: 120 CAG/START odzwierciedlająca toksyczność RNA i białka oraz 120 CAG/STOP obrazująca potencjalną toksyczność RNA. Jest to kluczowy zestaw modeli umożliwiającą rozróżnienie toksyczności RNA od toksyczności białka.

### *4.4.5.1 Analiza obecności agregatów zmutowanego białka ataksyny-3*

W celu określenia czy ulegająca nadekspresji zmutowana ataksyna-3 tworzy agregaty wykorzystano metodę immunofluorescencji. Komórki zostały poddane analizom po 72 godzinach indukcji doksycykliną. Jak pokazano na Ryc. 26, we wszystkich komórkach linii 20 CAG/START i 120 CAG/START widoczny był silny sygnał, pochodzący zarówno od endogennej ataksyny-3, jak i transgenu, natomiast w linii 120 CAG/STOP obserwowany był jedynie sygnał od endogennego białka. Ponadto, ataksyna-3 we wszystkich analizowanych liniach wykazywała lokalizację jądrową i cytoplazmatyczną (Ryc. 26A). W linii 120 CAG/START zaobserwowano nieliczne komórki posiadające agregaty białkowe zmutowanej ataksyny-3 (Ryc. 26B). Ze względu na dane literaturowe wskazujące, że powstawanie agregatów białkowych jest skomplikowanym procesem, wymagającym czasu, zdecydowano wydłużyć czas ekspresji zmutowanej ataksyny-3 do 6 dni. Analizy przeprowadzone po 6 dniach indukcji doksycykliną wykazały, że procent komórek linii 120 CAG/START posiadających agregaty wzrósł 3 krotnie aczkolwiek w dalszym ciągu był on niewielki (Ryc. 26).

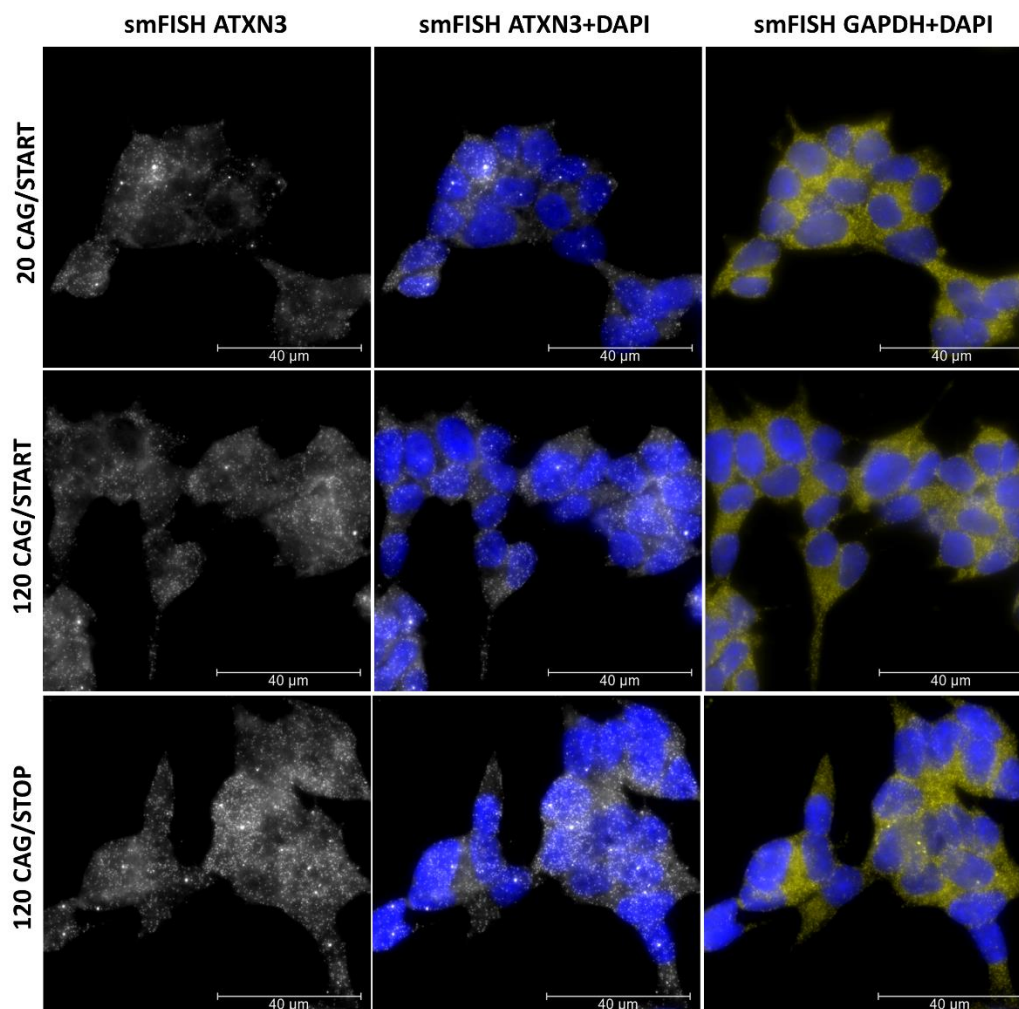


**Rycina 26. Analiza obecności agregatów ataksyny-3.** A - Wizualizacja lokalizacji białka ataksyny-3 za pomocą immunofluorescencji w liniach 20 CAG/START, 120 CAG/STOP po 3 dniach indukcji ekspresji transgenu i 120 CAG/START po 3 i 6 dniach indukcji. Białymi strzałkami zaznaczono agregaty białkowe. B - Udział procentowy komórek posiadających agregaty w linii 120 CAG/START po 3 i 6 dniach indukcji ekspresji transgenu. Na czerwono wybarwiono ataksynę-3, a na niebiesko, za pomocą DAPI, jądra komórkowe. \*\* -  $p < 0,01$

## 4.4.5.2 Analiza obecności skupień RNA tworzonych przez zmutowaną ataksynę-3

Wizualizację potencjalnie tworzonych przez zmutowany transkrypt ataksyny-3 skupień RNA przeprowadzono za pomocą smFISH. Jest to niezwykle czuła metoda pozwalająca na analizowanie pojedynczych cząsteczek RNA dzięki zastosowaniu kilkudziesięciu różnych sond skierowanych na jeden RNA.

Modele SCA3 poddano analizom smFISH po 72 godzinach indukcji ekspresji transgenu. Jak przedstawiono na Ryc. 27 badany RNA był obecny w bardzo dużej ilości cząsteczek w pojedynczej komórce oraz był zlokalizowany zarówno na terenie jądra komórkowego jak i cytoplazmy. W żadnej z analizowanych linii zawierającej zmutowany ciąg CAG nie zaobserwowano skupień RNA. Nie wykryto ich także po wydłużeniu czasu indukcji transkrypcji do 6 dni. Zidentyfikowane jasne punkty stanowiły miejsca startu transkrypcji. Jako kontrolę zastosowano występujący w dużej ilości w komórce transkrypt *GAPDH*.

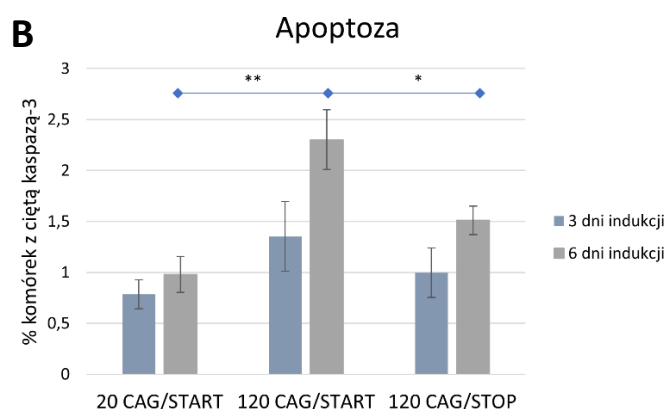
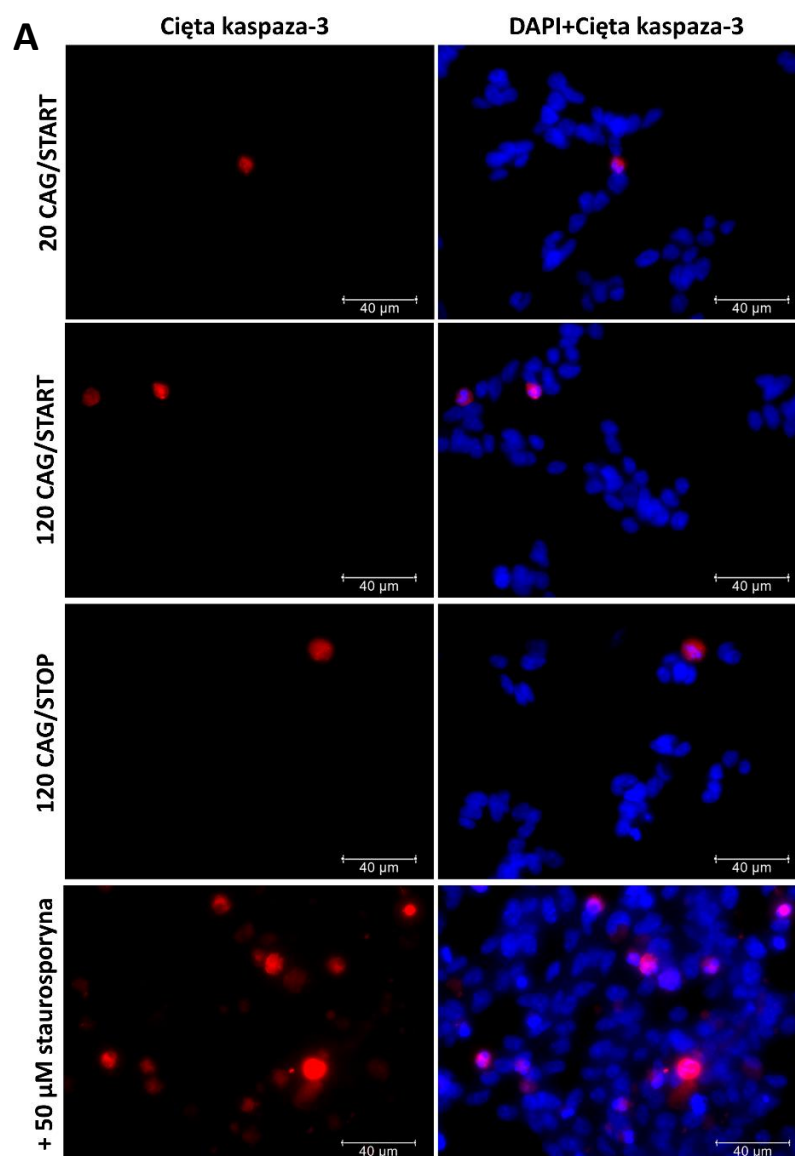


**Rycina 27.** Analiza lokalizacji transkryptu ataksyny-3 za pomocą smFISH w liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po 6 dniach indukcji ekspresji transgenu. Na biało wybarwiono transkrypty ataksyny-3, na żółto transkrypty *GAPDH*, na niebiesko, za pomocą DAPI, jądra komórkowe.

### *4.4.5.3 Analiza wpływu ekspresji transgenu na indukcję apoptozy*

Apoptoza jest programowaną śmiercią komórki, która może być indukowana w odpowiedzi na różne czynniki uszkodzające komórkę lub zaburzające jej prawidłowe funkcjonowanie, w tym przez zmutowaną ataksyną-3. Powszechnie stosowanym markerem aktywnego procesu apoptozy jest obecność ciętej kaspazy-3. Analizom poddano linie 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP. Ze względu na wyniki wykonanych analiz tworzenia się agregatów ataksyny-3, apoptozę badano po 3 i 6 dniach indukcji ekspresji transgenów. Jako kontrolę pozytywną zachodzącego procesu apoptozy użyto komórek linii 120 CAG/START traktowanych przez 24 godziny 50  $\mu$ M staurosporyną (inhibitor kinaz białkowych, który indukuje apoptozę przez aktywację kaspazy-3). Sygnał pochodzący od ciętej kaspazy-3 zidentyfikowano we wszystkich badanych liniach zarówno po 3 jak i 6 dniach indukcji, jednak był obecny tylko w niewielkiej liczbie komórek (Ryc. 28). Po 3 dniach indukcji linie nie wykazywały między sobą istotnych statystycznie różnic w ilości komórek apoptotycznych, natomiast po 6 dniach ilość sygnałów od ciętej kaspazy-3 w linii 120 CAG/START była istotnie wyższa w porównaniu do pozostałych linii (Ryc. 28B). Nie zidentyfikowano różnic między liniami 120CAG/STOP i 20CAG/START (Ryc. 28B).

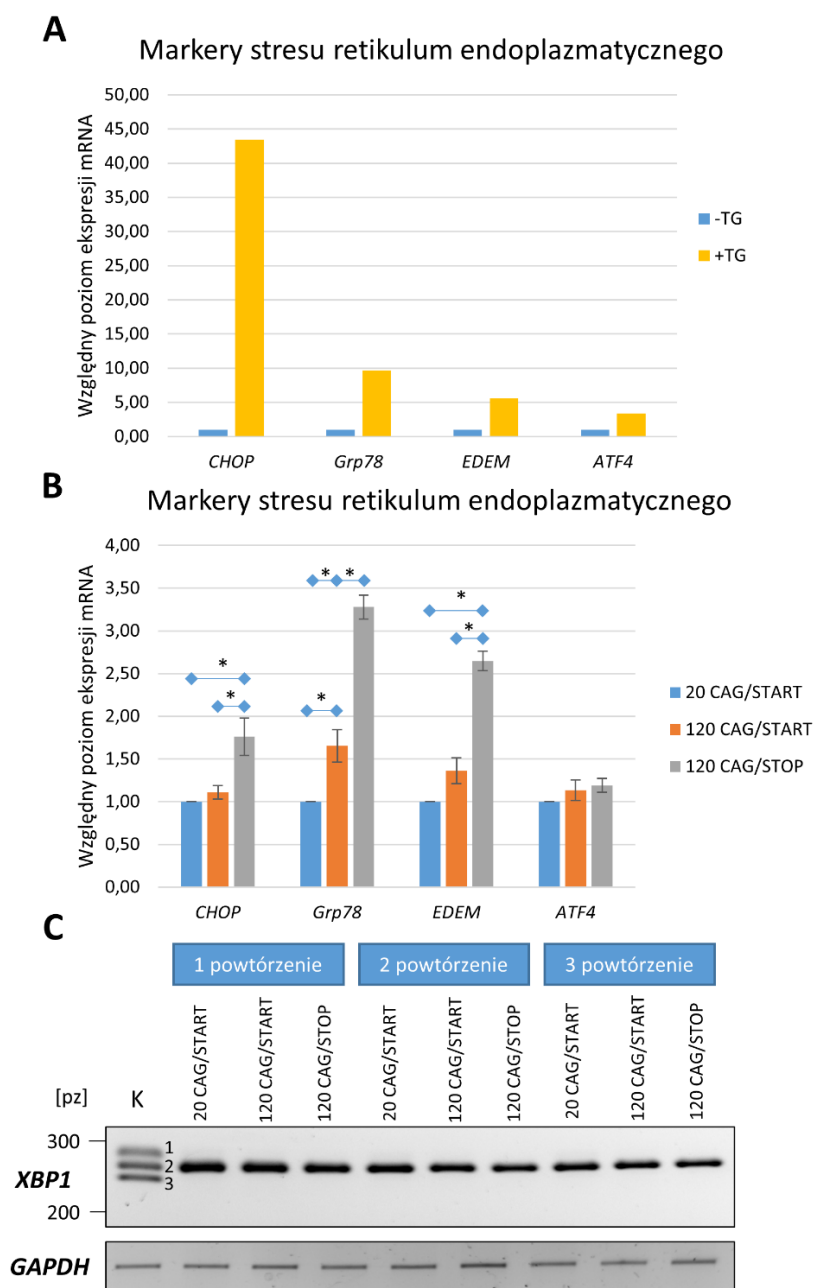




**Rycina 28. Analiza apoptozy w w liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP. A** - Wizualizacja białka ciętej kaspazy-3 za pomocą immunofluorescencji w liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po 6 dniach indukcji ekspresji transgenu. Komórki linii 120 CAG/START traktowane przez 24 godziny 50 μM staurosporyną stanowiły kontrolę pozytywną. B - Procentowy udział komórek zawierających sygnał pochodzący od ciętej kaspazy-3 po 3 i 6 dniach indukcji ekspresji transgenu. Na czerwono wybarwiono ciętą kaspazę-3, a na niebiesko, za pomocą DAPI, jądra komórkowe. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ .

### *4.4.5.4 Analiza wpływu ekspresji transgenu na indukcję stresu retikulum endoplazmatycznego*

Jednym z postulowanych patomechanizmów prowadzących do SCA3 jest indukcja stresu retikulum endoplazmatycznego w odpowiedzi na obecność nieprawidłowo sfałdowanej zmutowanej ataksyny-3. Postanowiono więc sprawdzić poziom ekspresji markerów stresu takich jak: *CHOP*, *Grp78*, *EDEM*, *ATF4* oraz alternatywny splicing genu *XBPI* w badanych modelach po 6 dniach indukcji ekspresji transgenu. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki SH-SY5Y 120 CAG/START traktowane przez 6 godzin 0,8  $\mu$ M tapsigarginą, znanego aktywatora stresu retikulum endoplazmatycznego (Ryc. 29A). Przeprowadzone analizy pokazały, że poziom ekspresji genów *CHOP*, *Grp78* i *EDEM* był istotnie statystycznie podniesiony w linii 120 CAG/STOP w stosunku do linii 20CAG/START i 120CAG/START. Ponadto, zaobserwowano wzrost transkrypcji genu *Grp78* w linii 120 CAG/START w porównaniu do linii 20CAG/START (Ryc. 29B). W badanych liniach komórkowych nie wykryto zmian w alternatywnym splicingu *XBPI* (Ryc. 29C). Podjęto także próbę określenia poziomu białka CHOP za pomocą metody Western blot, jednak dostępne komercyjnie przeciwciała okazały się niespecyficzne, co uniemożliwiło przeprowadzenie tej analizy.



**Rycina 29. Analiza markerów stresu retikulum endoplazmatycznego w liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po sześciu dniach indukcji ekspresji transgenu. A - Względny poziom ekspresji badanych genów *CHOP*, *Grp78*, *EDEM*, *ATF4* w komórkach linii 120 CAG/START nietraktowanych i traktowanych tapsigarginą. B - Względny poziom ekspresji badanych genów *CHOP*, *Grp78*, *EDEM*, *ATF4* w badanych liniach. C – Analiza alternatywnego splicingu genu *XBP1*. K – kontrola pozytywna, komórki traktowane przez 6 godzin 0,8  $\mu$ M tapsigarginą. 1 – sygnał pochodzący od hybrydyzacji produktów amplifikacji różnych form *XBP1*, głównej oraz powstałej z alternatywnego splicingu, 2 – sygnał pochodzący z amplifikacji głównej formy *XBP1*, 3 – sygnał pochodzący z amplifikacji formy *XBP1* powstałej, z alternatywnego splicingu, w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego**

### ***4.6 Poszukiwanie nowych markerów toksyczności RNA przy użyciu globalnych analiz transkryptomicznych i proteomicznych***

Globalne analizy transkryptomu i proteomu są powszechnie stosowane w badaniach mających na celu wykrycie wszelkich zmian jakie zachodzą w komórkach pod wpływem badanego czynnika. Ponadto, umożliwiają określenie obserwowanych zmian zarówno w sposób jakościowy, jak i ilościowy. Globalne podejścia transkryptomiczne i proteomiczne są niezwykle istotne w badaniu patomechanizmów wielu chorób w tym neurodegeneracyjnych, bowiem pozwalają na wytypowanie nie znanych jeszcze molekularnych podstaw patogenezy tych chorób. Z tego powodu postanowiono zastosować analizy transkryptomiczne i proteomiczne do identyfikacji nowych, potencjalnych markerów toksyczności RNA w wyprowadzonych modelach SCA3.

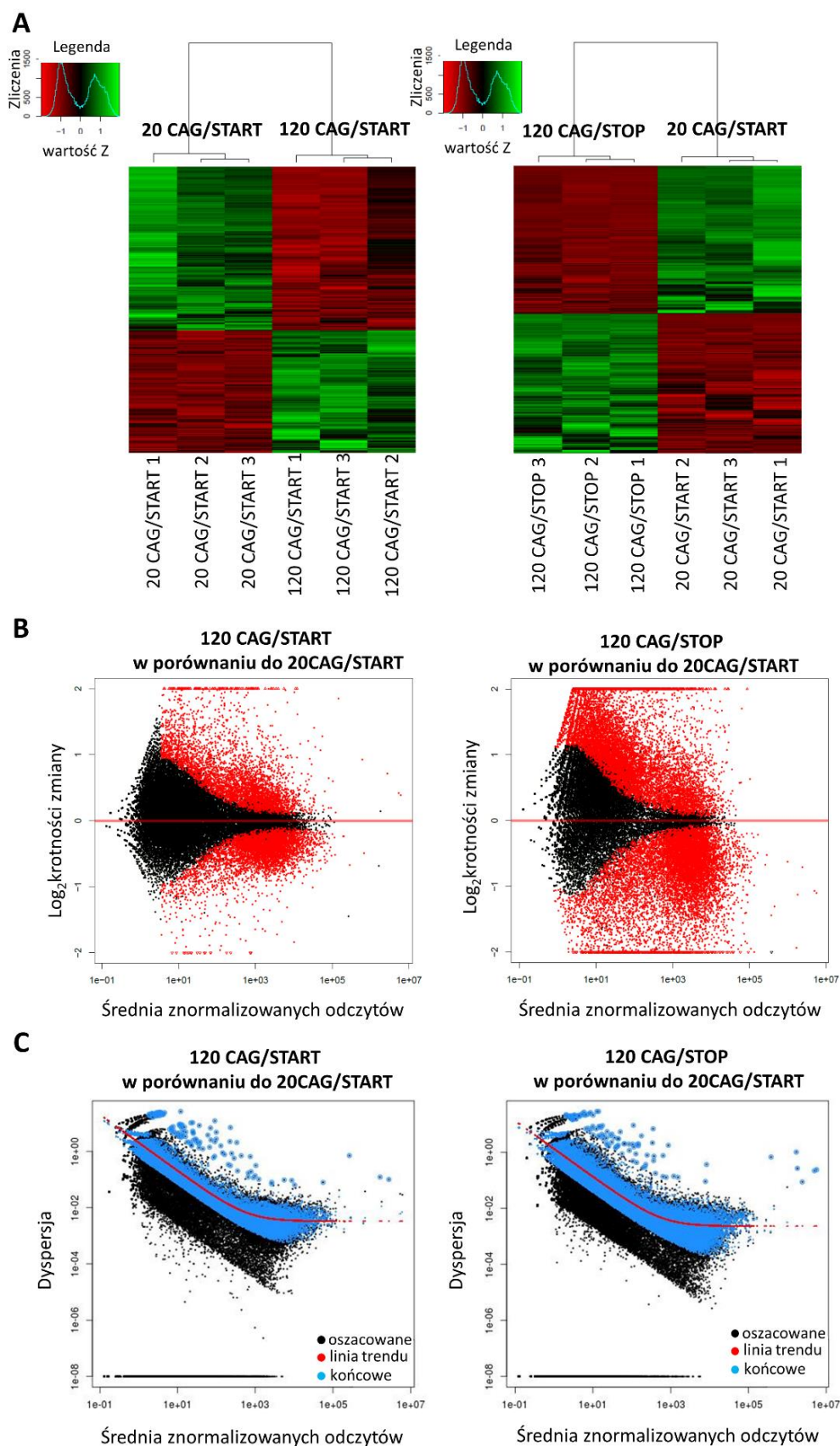
#### *4.6.1 Poszukiwanie markerów toksyczności RNA za pomocą analiz transkryptomicznych*

W celu wytypowania potencjalnych ścieżek przez jakie może działać toksyczny transkrypt ataksyny-3 analizom głębokiego sekwencjonowania RNA poddano linie 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po 72 godzinach indukcji ekspresji transgenu oraz nieindukowaną linię 20 CAG/START. Wariant nieindukowany linii 20 CAG/START stanowił tło komórkowe linii SH-SY5Y, natomiast indukowany pokazywał zmiany jakie zachodzą w wyniku nadekspresji normalnej ataksyny-3. Linia 120 CAG/START odzwierciedlała toksyczność RNA i białka, natomiast linia 120 CAG/STOP obrazowała toksyczność RNA. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych. W Tab. 7 przedstawiono uzyskane parametry przeprowadzonego sekwencjonowania RNA badanych próbek. Parametry QMS (ang. mean quality score), jak i ilość zasad o QS (ang. quality score)  $\geq 30$  we wszystkich próbkach są na względnie wysokim poziomie. MQS powyżej trzydziestu oznacza dokładność odczytu na poziomie powyżej 99,9%, a więc, że błędnie odczytane zasady występują rzadziej niż jedna na tysiąc. Ponadto, we wszystkich próbkach zasady o QS  $\geq 30$  stanowią co najmniej 92% wszystkich odczytów. Taki poziom dokładności zapewnia wiarygodną analizę danych głębokiego sekwencjonowania RNA. Ponadto uzyskana liczba odczytów dla badanych linii, wynosząca średnio od 72 do 111 milionów, pozwalała na bardzo dokładne określenie poziomu ekspresji genów.

**Tabela 7. Parametry wykonanych analiz głębokiego sekwencjonowania.** „+” – komórki z zaindukowaną ekspresją transgenu, „-”, – komórki nieindukowane, p1, 2, 3 – powtórzenie biologiczne 1, 2, 3, MQS – ang. Mean Quality Score – parametr opisujący prawdopodobieństwo błędnego odczytu zasady azotowej

Linia	Liczba odczytów z jednego końca nici	MQS	% zasad $\geq$ QS30
20 CAG/START- p1	104,637,206	39	94,34
20 CAG/START- p2	104,901,744	38,76	93,57
20 CAG/START- p3	104,890,073	38,88	93,97
20 CAG/START+ p1	105,492,153	39,07	94,6
20 CAG/START+ p2	105,240,878	38,73	93,49
20 CAG/START+ p3	85,672,302	38,91	94,09
120 CAG/START+ p1	79,023,844	38,33	92,19
120 CAG/START+ p2	87,624,823	38,33	92,23
120 CAG/START+ p3	49,359,758	38,39	92,45
120 CAG/STOP+ p1	110,937,076	38,69	93,40
120 CAG/STOP+ p2	113,964,976	38,73	93,53
120 CAG/STOP+ p3	109,004,566	38,73	93,53

Głównymi etapami wstępnych analiz bioinformatycznych była analiza jakościowa otrzymanych wyników w celu odrzucenia odczytów o złej jakości, mapowanie otrzymanych w ten sposób danych do ludzkiego transkryptomu oraz identyfikacja genów o zmienionej ekspresji. Następnie, zidentyfikowane geny poddano analizie ontologicznej aby określić procesy w jakich biorą udział. Porównanie komórek indukowanych i nieindukowanych linii 20 CAG/START pokazało, że indukcja ekspresji transgenu ataksyny-3 z krótkim ciągiem powtórzeń powoduje niewielką ilość zmian w transkryptomie. Dużo większą ilość zmian zaobserwowano w przypadku porównań nieindukowanej linii 20 CAG/START z liniami 120 CAG/START oraz 120 CAG/STOP. Ponadto, w zestawieniu linii 120 CAG/START czy 120 CAG/STOP z linią 20 CAG/START indukowaną i nieindukowaną obserwowano niemal identyczną liczbę genów o zmienionym poziomie ekspresji. W dalszych analizach porównywano komórki linii 120 CAG/START i 120 CAG/STOP do indukowanych komórek linii 20 CAG/START. Na Ryc. 30A przedstawiono profile ekspresji genów badanych linii z poszczególnych powtórzeń biologicznych eksperymentu. Na czerwono zaznaczono geny o podwyższonym a na zielono o obniżonym poziomie ekspresji. Próbkę pochodzące z tej samej linii grupowały się obok siebie, co świadczy o powtarzalności wyników uzyskanych między kolejnymi powtórzeniami eksperymentu.



**Rycina 30. Wstępna analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania RNA przy użyciu pakietu DESeq2. A – Profil ekspresji genów, na czerwono zaznaczono geny o podwyższonej a na zielono o obniżonej ekspresji. B – Wykresy zależności logarytmu o podstawie 2 z krotności zmiany ekspresji genu od średniej znormalizowanych odczytów. C – Wykresy zależności dyspersji od średniej znormalizowanych odczytów.**

Widać też, że profile ekspresji linii 120 CAG/START i 120 CAG/STOP bardzo różniły się od profilu ekspresji linii 20 CAG/START. Aby mieć pewność, co do otrzymanych wyników sporządzono wykresy diagnostyczne: zależności logarytmu o podstawie 2 z krotności zmiany ekspresji genu od średniej znormalizowanych odczytów (ang. MA-plot) i zależności dyspersji od średniej znormalizowanych odczytów (Ryc. 30B i C). Wykres MA-plot przedstawia rozkład ekspresji genów, gdzie wartość 0 na osi pionowej oznacza brak różnic, wartości dodatnie podwyższenie, a ujemne obniżenie względnego poziomu ekspresji. Czarne punkty oznaczają geny o zmianach nieistotnych, a czerwone o istotnych statystycznie. Otrzymane wykresy MA-plot (Ryc. 30B) pokazały obraz prawidłowych danych – dla obydwu zestawu danych mediana znajduje się w centrum rozkładu punktów na wykresie. Z kolei dyspersja jest parametrem, który opisuje zmienność między powtórzeniami biologicznymi. Czarne punkty na wykresie oznaczają oszacowane wartości dyspersji dla każdego z genów, czerwona linia trendu obrazuje zależność dyspersji od średniej, natomiast niebieskie punkty oznaczają końcowe wartości dyspersji uzyskane po korekcie wartości oszacowanych. Otrzymane wykresy dyspersji (Ryc. 30C) posiadały dobre dopasowanie, ponieważ niemal wszystkie punkty układały się wokół linii trendu. Reasumując, otrzymane wykresy MA-plot jak i dyspersji świadczyły o poprawności uzyskanych danych i pozwalały na wykonanie dalszych analiz bioinformatycznych. W przeprowadzonych analizach ekspresję genu uznawano za istotnie zmienioną jeśli wartość  $q < 0,05$ . Takie podejście jest powszechnie stosowane w analizach transkryptomicznych, dzięki niemu otrzymuje się mniej wyników fałszywie pozytywnych niż przy zastosowaniu zwykłej wartości  $p$ . W Tab. 8 i 9 przedstawiono geny o najbardziej zmienionej ekspresji. W linii 120/CAG START w porównaniu do linii 20 CAG/START zaobserwowano podwyższenie poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za proliferację komórki oraz sekrecję hormonów. Co ciekawe obserwowano, że część genów odpowiedzialnych za procesy związane z rozwojem układu nerwowego posiadała podniesiony a część zmniejszony poziom ekspresji. Ponadto wykazano obniżenie poziomu ekspresji genów związanych z cytoszkieletem komórkowym i sekrecją chemokin (Tab. 8). Podobne obserwacje poczyniono w linii 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START. Zaobserwowano, że część genów biorąca udział w procesach związanych z rozwojem układu nerwowego posiadała obniżony a część podwyższony poziom ekspresji. Ponadto obserwowano obniżony poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za sekrecję chemokin oraz kodujących białka wiążące wapń (Tab. 9).

**Tabela 8. Lista wybranych genów o najbardziej zmienionej ekspresji w linii 120 CAG/START w porównaniu do linii 20 CAG/START. Dla genów nie zidentyfikowanych w analizie ontologicznej (GO, ang. gene ontology) podano rodzaj RNA lub białka jakie kodują.**

		Ensembl ID	Nazwa	Zmiana ekspresji	Proces (analiza GO)
<b>120 CAG/START w stosunku do linii 20 CAG/START</b>	Podniesiony poziom ekspresji	ENSG00000152402	<i>GUCY1A2</i>	75,90	Metabolizm nukleotydów
		ENSG00000164649	<i>CDCA7L</i>	40,37	Proliferacja komórki
		ENSG00000145808	<i>ADAMTS19</i>	22,31	Metalopeptydaza
		ENSG00000210151	<i>MT-TS1</i>	10,35	Mitochondrialne tRNA
		ENSG00000163394	<i>CCKAR</i>	9,69	Sekrecja hormonów
		ENSG00000139352	<i>ASCL1</i>	9,45	Generowanie neuronów autonomicznego układu nerwowego
		ENSG00000239039	<i>SNORD13</i>	9,36	Małe jądrowe RNA
		ENSG00000027644	<i>INSRR</i>	8,70	Odpowiedź na glukozę
		ENSG00000200156	<i>RNU5B-1</i>	7,48	Małe jądrowe RNA
		ENSG00000199568	<i>RNU5A-1</i>	6,78	Małe jądrowe RNA
	Obniżony poziom ekspresji	ENSG00000274618	<i>HIST1H4F</i>	167,965	Histon
		ENSG00000182195	<i>LDOC1</i>	20,69	Negatywna regulacja proliferacji
		ENSG00000203812	<i>HIST2H2AA3</i>	5,99	Histon
		ENSG00000123609	<i>NMI</i>	5,76078	Kaskada STAT
		ENSG00000167641	<i>PPP1R14A</i>	4,36	Regulacja defosforylacji
		ENSG00000160307	<i>S100B</i>	4,28	Rozwój centralnego układu nerwowego
		ENSG00000197956	<i>S100A6</i>	3,58	Aksonogeneza
		ENSG00000137033	<i>IL33</i>	3,52	Sekrecja chemokin
		ENSG00000118523	<i>CTGF</i>	2,95	Składanie włókien aktynowych
ENSG00000130208		<i>APOC1</i>	2,88	Negatywny regulator transportu steroli	



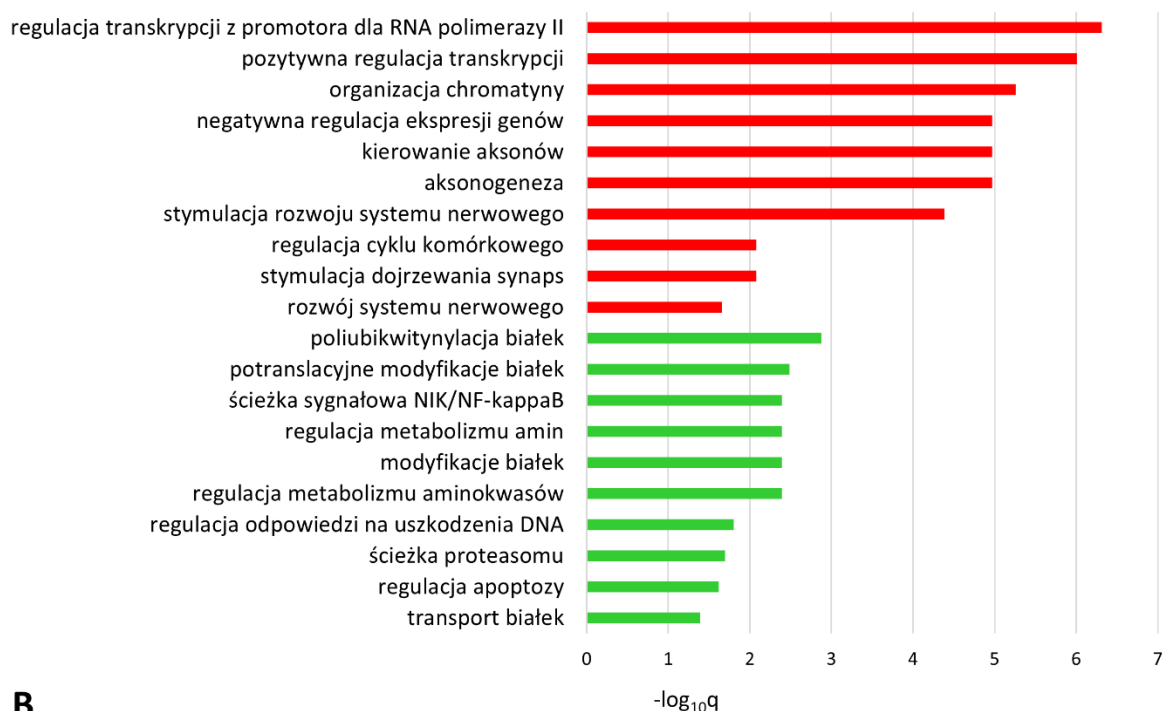
**Tabela 9. Lista wybranych genów o najbardziej zmienionej ekspresji w linii 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START. Dla genów nie zidentyfikowanych w analizie GO podano rodzaj RNA lub białka jakie kodują.**

		Ensembl ID	Nazwa	Zmiana ekspresji	Proces (analiza GO)
<b>120 CAG/START w stosunku do linii 20 CAG/START</b>	Podniesiony poziom ekspresji	ENSG00000106236	<i>NPTX2</i>	140,74	Rozwój wypustek neuronalnych
		ENSG00000178403	<i>NEUROG2</i>	100,69	Czynnik transkrypcyjny decydujący o losie neuronów ektodermy
		ENSG00000177511	<i>ST8SIA3</i>	81,39	Synteza gangliozydów
		ENSG00000155052	<i>CNTNAP5</i>	81,16	Białko adhezyjne neuronów
		ENSG00000077279	<i>DCX</i>	68,29	Migracja Neuronów
		ENSG00000120675	<i>DNAJC15</i>	58,673	Import białek do Mitochondrium
		ENSG00000139767	<i>SRRM4</i>	54,43	Metabolizm RNA
		ENSG00000100095	<i>SEZ6L</i>	53,37	Funkcjonowanie retikulum endoplazmatycznego w neuronach
		ENSG00000125879	<i>OTOR</i>	49,01	Załadunek pęcherzyków
	ENSG00000139352	<i>ASCL1</i>	47,87	Generowanie neuronów autonomicznego układu nerwowego	
	Obniżony poziom ekspresji	ENSG00000204379	<i>XAGE1A</i>	46,0196	Antygen z rodziny X
		ENSG00000137033	<i>IL33</i>	16,8512	Sekrecja chemokin
		ENSG00000196136	<i>SERPINA3</i>	14,5666	Utrzymanie struktury epitelialnej
		ENSG00000272727	<i>LINC02266</i>	11,2583	Długie niekodujące RNA
		ENSG00000275757	<i>RNA5-8SN2</i>	11,1224	5.8S rybosomalne RNA
		ENSG00000169884	<i>WNT10B</i>	9,30	Odpowiedź na kwas retinowy
		ENSG00000159200	<i>RCAN1</i>	8,05	Regulacja kaskady sygnałowej kalcyneuryna - NFAT
		ENSG00000188643	<i>S100A16</i>	7,33	Białko wiążące wapń
		ENSG00000182636	<i>NDN</i>	7,18	Rozwój systemu nerwowego
ENSG00000166592		<i>RRAD</i>	6,79	Ścieżka sygnałowa insuliny	

W celu identyfikacji procesów na jakie może wpływać transkrypt zmutowanej ataksyny-3, wyniki z programu DESeq2 poddano analizom w programie Enrichr. Program ten na podstawie listy zadanych genów umożliwia identyfikację nadreprezentowanych i istotnie zmienionych procesów. Osobno analizowano geny o podwyższonej i obniżonej ekspresji. Taki sposób procesowania danych umożliwił identyfikację najbardziej zmienionych ścieżek i pozwalał na jasne określenie, które procesy ulegają deregulacji. Wyniki z analiz przedstawiono na Ryc. 31.

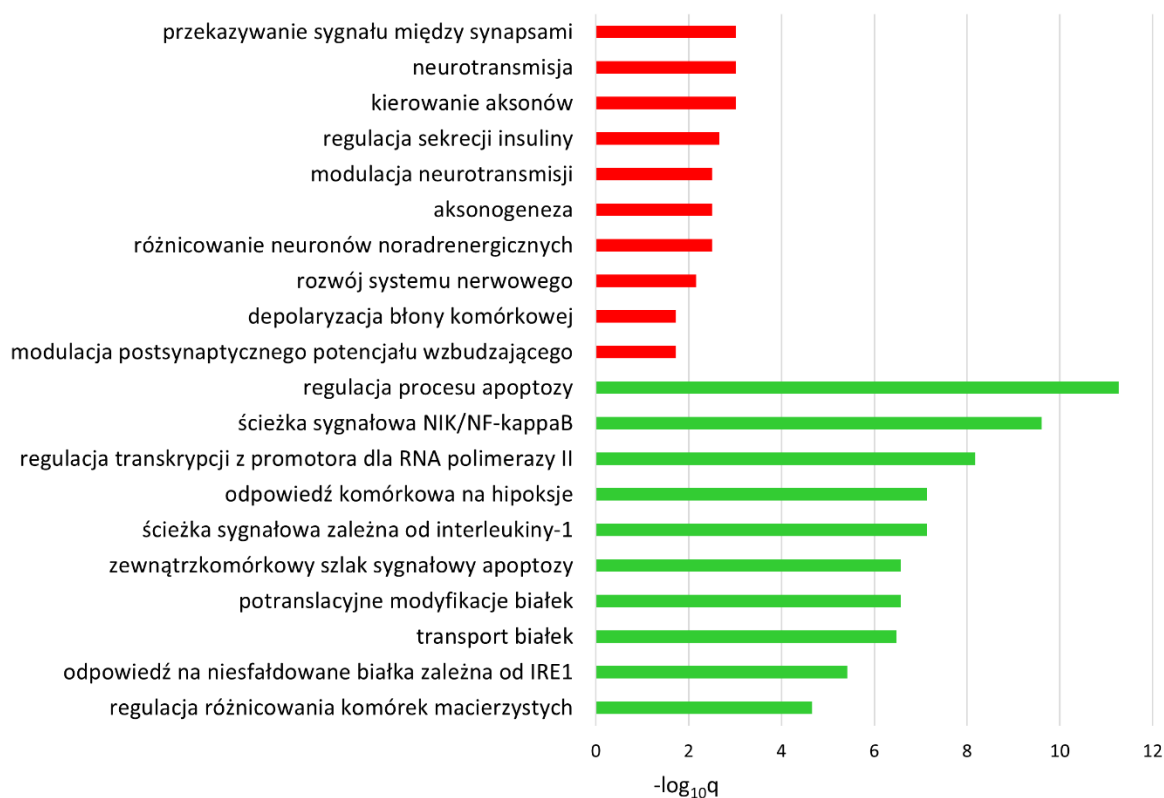
A

## Wybrane deregulowane procesy w linii 120 CAG/START w porównaniu do 20 CAG/START



B

## Wybrane deregulowane procesy w linii 120 CAG/STOP w porównaniu do 20 CAG/START



**Rycina 31. Analiza ontologiczna przeprowadzona za pomocą programu Enrichr.** Wybór prezentowanych procesów opierał się na wartości  $q$ . A –Procesy dla analizy linii 120 CAG/START w porównaniu do 20 CAG/START. B - Procesy dla analizy linii 120 CAG/STOP w porównaniu do 20 CAG/START. Na czerwono zaznaczono procesy, w których udział biorą geny o podwyższonej ekspresji, na zielono zaznaczono procesy w których udział biorą geny o obniżonej ekspresji.

Następnie zidentyfikowane przez program Enrichr procesy o  $q < 0,05$  zwizualizowano w programie Cytoscape za pomocą wtyczek ClueGo i CluPedia. Analiza ta dała możliwość pogrupowania procesów w klastry, a następnie połączenie poszczególnych węzłów na podstawie ontologii. Przy wykorzystaniu tych programów obserwowano w linii 120 CAG/START w porównaniu do linii 20 CAG/START podwyższony poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za rozwój układu nerwowego, aksonogenezę i dojrzewanie synaps. Co ciekawe, podniesiony był też poziom ekspresji genów związanych z negatywną regulacją transkrypcji (Ryc. 32).



**Rycina 32. Analiza ontologii deregulowanych procesów w których udział biorą zidentyfikowane geny o podwyższonej ekspresji w linii 120 CAG/START w porównaniu do linii 20 CAG/START.** Poszczególnymi kolorami oznaczono procesy należące do jednego klastra. Nazwy klastrów pochodzą od najistotniejszego procesu w klastrze (według wartości K), wielkość węzła odzwierciedla wartość  $q$  wyliczoną przez program Enrichr, połączenia węzłów zostały wykonane na podstawie ontologii.

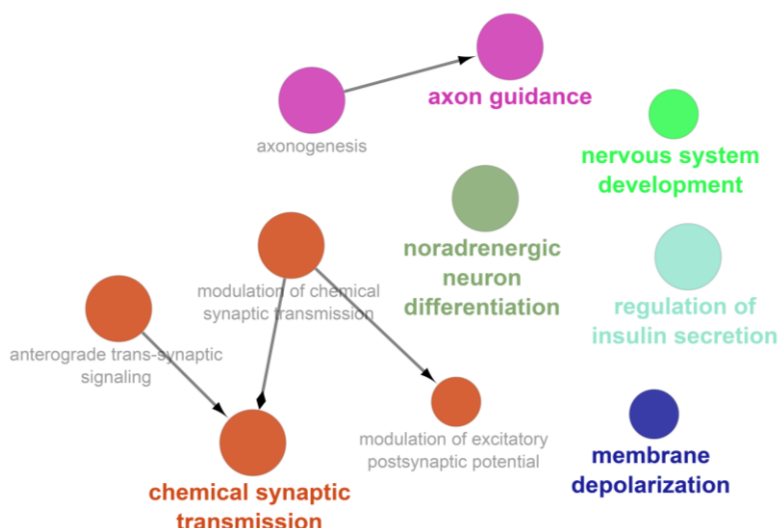
Wśród genów o obniżonej ekspresji były między innymi te regulujące poliubikwitynylację, transport białek, jak i te związane z funkcjonowaniem mitochondriów. Ponadto, zaobserwowano zmniejszony poziom ekspresji genów regulujących transkrypcję snRNA, co może świadczyć o zaburzeniach alternatywnego splicingu (Ryc. 33).



**Rycina 33. Analiza ontologii deregulowanych procesów w których udział biorą zidentyfikowane geny o obniżonej ekspresji w linii 120 CAG/START w porównaniu do linii 20 CAG/START.** Poszczególnymi kolorami oznaczono procesy należące do jednego klastru. Nazwy klastrów pochodzą od najistotniejszego procesu w klastrze (według wartości K), wielkość węzła odzwierciedla wartość  $q$  wyliczoną przez program Enrichr, połączenia węzłów zostały wykonane na podstawie ontologii.

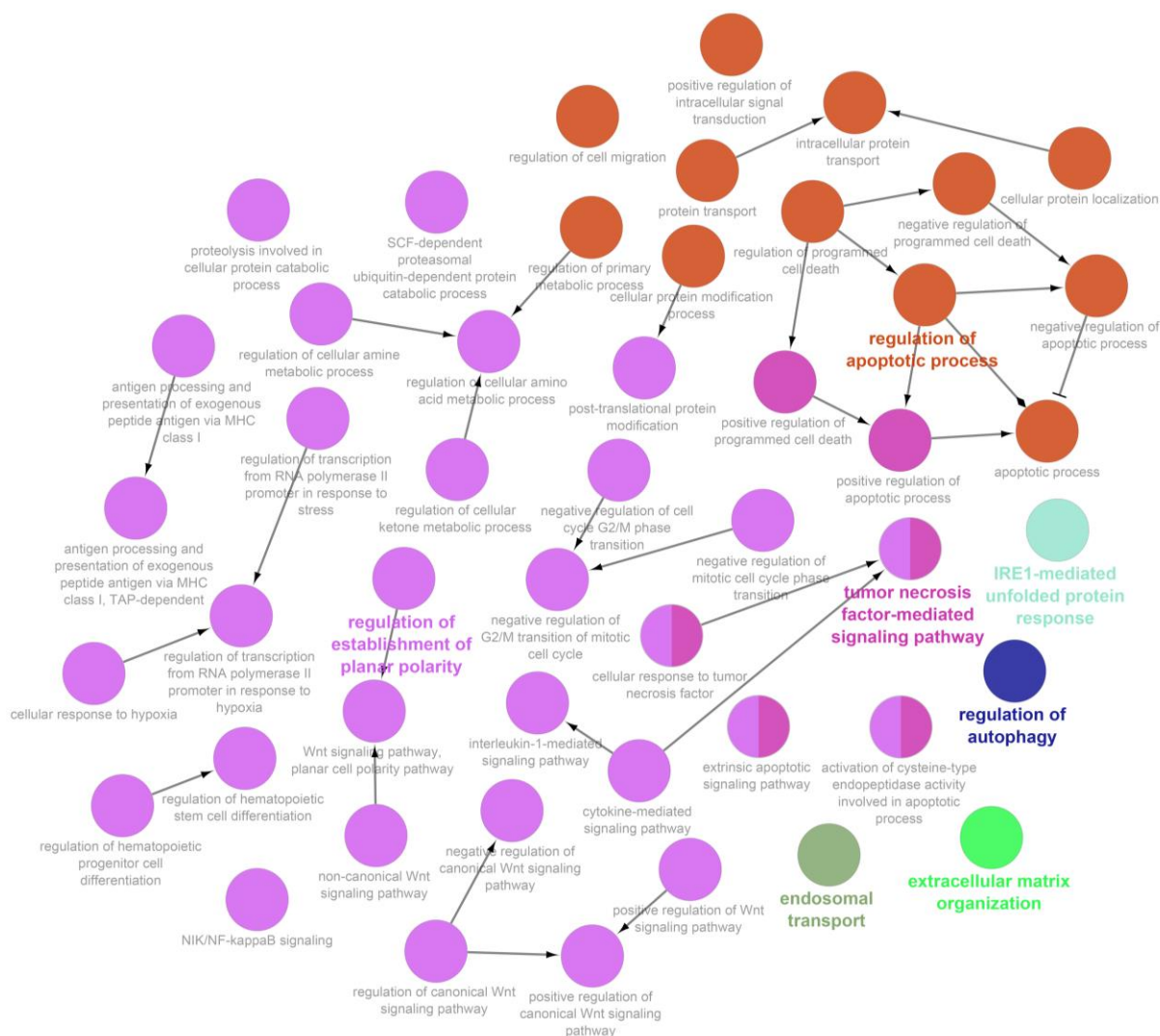
Na podstawie otrzymanych wyników wydaje się, że obecność zmutowanego RNA i białka, może prowadzić do indukcji ekspresji genów związanych z rozwojem układu nerwowego, a jednocześnie powodować zaburzenia ścieżek charakterystycznych dla patogenezy SCA3.

Tą samą analizę wykonano dla genów o zmienionej ekspresji w linii 120 CAG/STOP w stosunku do linii 20 CAG/START. Zaobserwowano podniesiony poziom ekspresji genów związanych z rozwojem układu nerwowego, w tym aksonogenezą, jednak było ich mniej niż w przypadku linii 120 CAG/START (Ryc. 34).



**Rycina 34 . Analiza ontologii deregulowanych procesów w których udział biorą zidentyfikowane geny o podwyższonej ekspresji w linii 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START.** Poszczególnymi kolorami oznaczono procesy należące do jednego klastra. Nazwy klastrow są wzięte od najistotniejszego procesu w klastrze (według wartości K), wielkość węzła odzwierciedla wartość  $q$  wyliczoną przez program Enrichr, połączenia węzłów zostały wykonane na podstawie ontologii.

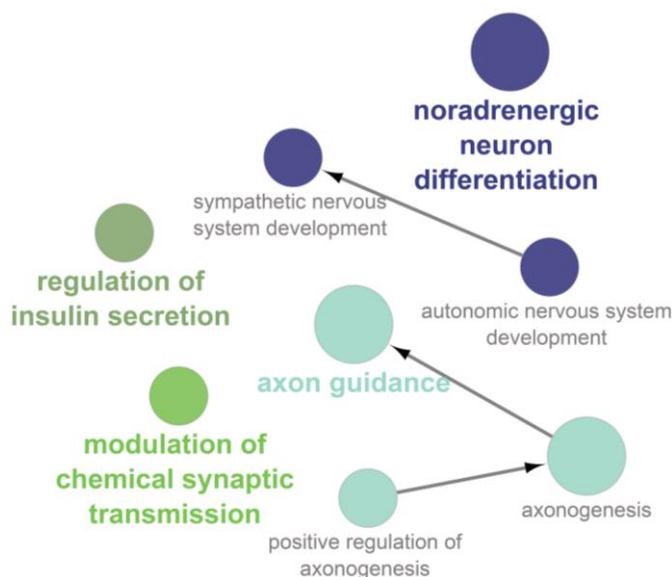
Dużo więcej, bo aż 304, deregulowanych procesów zidentyfikowano dla genów o obniżonej ekspresji. Wśród zaburzonych procesów były te związane z transportem białek i odpowiedzią na niesfałdowane białka, co może świadczyć o upośledzeniu systemu UPS. Co więcej, obniżony był poziom ekspresji genów odpowiedzialnych za ustalenie polarności komórki (Ryc. 35), który jest jednym z kluczowych szlaków wpływających na migrację neuronów podczas rozwoju układu nerwowego, a także ich asymetryczną morfologię.



**Rycina 35. Analiza ontologii deregulowanych procesów w których udział biorą zidentyfikowane geny o obniżonej ekspresji w linii 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START.** Poszczególnymi kolorami oznaczono procesy należące do jednego klastra. Nazwy klastrów są wzięte od najistotniejszego procesu w klastrze (według wartości  $K$ ), wielkość węzła odzwierciedla wartość  $q$  wyliczoną przez program Enrichr, połączenia węzłów zostały wykonane na podstawie ontologii. Do analiz wzięto 50 najistotniejszych procesów (według wartości  $q$ , z pominięciem procesów zupełnie niezwiązanych z patogenezą SCA3 jak np. odporność zależna od neutrofilii), ponieważ wizualizacja wszystkich 304 byłaby zupełnie nieczytelna.

W przeprowadzonych analizach zaobserwowano, że nadekspresja samego transkryptu zmutowanej ataksyny-3 powodowała deregulację podobnych procesów związanych z rozwojem układu nerwowego, co nadekspresja białka. Co ciekawe, w obydwu przypadkach obniżony był poziom genów związanych ze ścieżką sygnałową Wnt. Jednak różnica polegała na tym, że w przypadku nadekspresji białka efekty było widać w ścieżce kanonicznej, która odpowiada za regulację transkrypcji. Być może z tego powodu zauważono w tej linii obniżony poziom ekspresji genów kodujących snRNA. Z kolei, przy nadekspresji transkryptu dochodziło do hamowania ścieżki niekanonicznej, związanej z organizacją cytoszkieletu komórkowego,

co wpisuje się w zaburzone procesy ustalania polarności komórki. Celem identyfikacji procesów za jakie odpowiedzialny jest transkrypt, najlepszym sposobem było określenie procesów, które ulegały deregulacji zarówno w linii 120 CAG/START, jak i w linii 120 CAG/STOP. Aby to zrobić z list genów wziętych do analiz wyznaczono geny, które w obydwu powyższych przypadkach posiadają zmienioną ekspresję. Następnie, postępowano tak jak w przypadku wcześniejszych analiz: zidentyfikowane geny poddano analizie w programie Enrich, a następnie zwizualizowano za pomocą wtyczek ClueGo i CluPedia w programie Cytoscape. Program Enrich zidentyfikował w przypadku procesów w których udział biorą geny o podwyższonym poziomie ekspresji zaledwie 8 o  $q < 0,05$  z pośród 1704 (Ryc. 36), natomiast w przypadku procesów w których udział biorą geny o obniżonym poziomie ekspresji 51 z 3403 posiadało  $q < 0,05$  (Ryc. 37).



**Rycina 36.** Analiza ontologii procesów deregulowanych w których udział biorą zidentyfikowane geny o podwyższonej ekspresji zarówno w linii 120 CAG/START w stosunku do linii 20 CAG/START jak i 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START. Poszczególnymi kolorami oznaczono procesy należące do jednego klastra. Nazwy klastrów są wzięte od najistotniejszego procesu w klastrze (według wartości K), wielkość węzła odzwierciedla wartość  $q$  wyliczoną przez program Enrich, połączenia węzłów zostały wykonane na podstawie ontologii.



**Rycina 37. Analiza ontologii procesów deregulowanych w których udział biorą zidentyfikowane geny o obniżonej ekspresji zarówno w linii 120 CAG/START w stosunku do linii 20 CAG/START jak i 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START.** Pominięto procesy zupełnie niezwiązane z patogenezą SCA3 jak np. prezentację antygenów. Poszczególnymi kolorami oznaczono procesy należące do jednego klastra. Nazwy klastrów są wzięte od najistotniejszego procesu w klastrze (według wartości K), wielkość węzła odzwierciedla wartość  $q$  wyliczoną przez program Enrichr, połączenia węzłów zostały wykonane na podstawie ontologii.

Przeprowadzone analizy pokazały, że procesami, w których udział biorą geny o podwyższonej ekspresji zarówno w linii 120 CAG/START w porównaniu do linii 20 CAG/START, jak i 120 CAG/STOP w stosunku do linii 20 CAG/START był rozwój systemu nerwowego, a w szczególności aksonogeneza. W przypadku procesów, w których udział biorą geny o obniżonej ekspresji zidentyfikowano regulację kanonicznej ścieżki Wnt, transport pęcherzykowy i ustalanie polarności komórki. Geny zidentyfikowane w powyższych analizach zestawiono w Tab. 10.



Tabela 10. Lista genów o podniesionej i obniżonej ekspresji zarówno w linii 120 CAG/START, jak i 120 CAG/STOP.

	Proces (GO)	Gen	Funkcja białka
Geny o podniesionej ekspresji	Rozwój sympatycznego układu nerwowego (GO:0048485)	<i>TFAP2B</i>	Czynnik transkrypcyjny, może brać udział w różnicowaniu komórek pochodzących od grzebienia nerwowego
		<i>PHOX2B</i>	Czynnik transkrypcyjny uczestniczący w rozwoju neuronów noradrenergicznych
		<i>GATA3</i>	Czynnik transkrypcyjny pełniący istotną rolę w biologii komórek śródbłonka
		<i>ASCL1</i>	Czynnik transkrypcyjny odgrywający rolę w różnicowaniu neuronów, tworzeniu neuronów węchowych i autonomicznych
	Aksonogeneza (GO:0007409)	<i>RET</i>	Receptor transmembranowy odgrywający rolę w rozwoju tkanek pochodzących z grzebienia nerwowego
		<i>ROBO2</i>	Receptor transmembranowy biorący udział w migracji komórek i kierowaniu aksonów
		<i>NRXN1</i>	Receptor na powierzchni komórki biorący udział w neurotransmisji i tworzeniu połączeń synaptycznych
		<i>PLPPR4</i>	Fosfataza lipidów fosforanowych, zlokalizowana w błonie aksonów i ważna dla ich wzrostu
		<i>CXCR4</i>	Receptor dla chemokin
		<i>IRS2</i>	Cytoplazmatyczne białko sygnałowe
		<i>GAB2</i>	Białko adaptorowe służące do transdukcji sygnałów pochodzących od cytokin
		<i>ISL1</i>	Czynnik transkrypcyjny potrzebny do tworzenia neuronów motorycznych
		<i>EFNB2</i>	Receptor transmembranowy biorący udział w przekazywaniu sygnałów związanych z rozwojem układu nerwowego
		<i>NCAM1</i>	Białko adhezyjne zaangażowane w oddziaływania międzykomórkowe i komórka – macierz międzykomórkowa
		<i>SLIT3</i>	Białko ulegające sekrecji i wpływające na migrację komórek
		<i>NRCAM</i>	Neuronalne białko adhezyjne zaangażowane w adhezję między neuronami i przekazywanie sygnału wzdłuż aksonu podczas jego rozwoju
		<i>CNTN4</i>	Białko błonowe biorące udział w tworzeniu połączeń aksonów w rozwijającym się układzie nerwowym
		<i>EPHB2</i>	Receptor dla efryn
		<i>NEFH</i>	Białko neurofilamentów
<i>UNC5A</i>	Receptor dla netryn, które nakierowują aksony		

Geny o obniżonej ekspresji	Opłaszczanie pęcherzyków transportowych (GO:0006901)	<i>GRIA1</i>	Podjednostka receptora glutaminowego
		<i>ANKRD28</i>	Białko uczestniczące w transporcie do aparatu Golgiego
		<i>TRAPPC3</i>	Regulacja transportu z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego
		<i>SEC23A</i>	Rola w transporcie między retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego
		<i>MCFD2</i>	Ułatwia transport czynników koagulacyjnych z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego
		<i>SAR1B</i>	Podjednostka białkowego płaszcza COPII
		<i>USO1</i>	Część kompleksu cis-SNARE
		<i>KLHL12</i>	Adaptor substratu dla ligazy ubikwityny CUL3
		<i>LMAN1</i>	Receptor transportowanych glikoprotein
		<i>SCFD1</i>	Transport do aparatu Golgiego
		<i>CD59</i>	Transdukcja sygnału od limfocytów
		<i>SEC22B</i>	Kierowanie transportem między retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego
		<i>TMED2</i>	Transport do aparatu Golgiego
	Pozytywna regulacja kanonicznej ścieżki sygnałowej Wnt (GO:0090263)	<i>WNT2B</i>	Sekrecyjny czynnik sygnałowy szlaku Wnt, odgrywa rolę w wielu procesach rozwojowych
		<i>SMURF2</i>	Ligaza ubikwityny
		<i>PSMD13</i>	Podjednostka kompleksu proteasomu 26S
		<i>FZD9</i>	Receptor ścieżki Wnt
		<i>GSKIP</i>	Negatywna regulacja GSK3-β
		<i>NFKB1</i>	W formie 105 kDa jest inhibitorem transkrypcji białka Rel, w formie 50 kDa jest podjednostką wiążącą DNA w czynniku transkrypcyjnym NF-κB
		<i>PSMB8, PSME2, PSME1, PSMC2, PSMA2, PSMA1, PSMD6, PSMA5, PSMB9</i>	Podjednostki proteasomu
		<i>DAAM2</i>	Udział w ścieżce sygnałowej Wnt
		<i>LGR4</i>	Aktywator ścieżki Wnt
	Regulacja ustalenia polarności komórki (GO:0090175)	<i>WLS</i>	Biogeneza i kierowanie ligandu ścieżki Wnt
		<i>SMURF2</i>	Ligaza ubikwityny
		<i>WNT5A</i>	Białko sygnałowe odgrywające kluczową rolę podczas embriogenezy
		<i>FZD6</i>	Receptor dla białek sygnałowych ścieżki Wnt, hamuje kaskadę sygnałową kanonicznej ścieżki Wnt/β-kenina
		<i>PSMB8, PSME2, PSMD13, PSMB9, PSMA5, PSMD6, PSMA1, PSMA2, PSMC2, PSME1</i>	Podjednostki proteasomu
<i>NPHP3</i>		Białko niezbędne do rozwoju ciała rzęskowego	

Przyglądając się funkcjom białek kodowanych przez te geny można zauważyć, że obecność zmutowanego transkryptu może prowadzić do deregulacji procesów związanych z rozwojem układu nerwowego i aksonogenezą poprzez zaburzenie poziomu ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne i białka receptorowe. Co ciekawe, zaobserwowano obniżenie poziomu aktywatorów szlaków Wnt (*WNT5A* i *WNT2B*), które odgrywają ważną rolę podczas embriogenezy. Ponadto, wykryto obniżony poziom ekspresji *GRIA1*, który koduje podjednostkę receptora glutaminowego zaangażowanego w proces transpotu pęcherzykowego, co może potencjalnie świadczyć o zaburzeniach w przekazywaniu sygnału między synapsami.

### *4.6.2 Poszukiwanie markerów toksyczności RNA za pomocą analiz proteomicznych*

Ilościowym badaniom proteomicznym metodą iTRAQ poddano ten sam zestaw linii co w przypadku analiz transkryptomicznych, tj. linie 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po 72 godzinach indukcji ekspresji transgenu i nieindukowaną linię 20 CAG/START. Eksperyment przeprowadzono w czterech powtórzeniach biologicznych. Wydajność znakowania białek znacznikami iTRAQ, tzn. obwiednia wynosiła > 99,8%. Taki wysoki poziom znakowania pozwalał na wiarygodną ilościową analizę proteomiczną.

Po wstępnej analizie bioinformatycznej uzyskanych wyników spektrometrii mas udało się zidentyfikować i otrzymać relatywną wartość ilościową dla ponad 5668 różnych białek. Porównywano ze sobą ilości białek w następujących liniach: 120 CAG/START w stosunku do linii 20 CAG/START i 120 CAG/STOP w stosunku do linii 20 CAG/START. Porównanie indukowanych i nieindukowanych komórek linii 20 CAG/START wykazało różnice ilościowe w przypadku zaledwie dwóch białek, można więc sądzić, że nadekspresja normalnego białka ataksyny-3 praktycznie nie powoduje zmian w proteomie badanych linii. Podobne obserwacje poczyniono też w badaniach transkryptomicznych, gdzie ekspresja ataksyny-3 z ciągiem 20 powtórzeń CAG powodowała niewiele zmian w transkryptomie analizowanych linii. Ilość białka uznawano za istotnie zmienioną jeśli jego krotność zmiany wynosiła więcej niż 1,1 i była istotna statystycznie ( $q < 0,05$ ). Poniżej przedstawiono tabele zawierające białka o najbardziej zmienionej ilości.

Tabela 11. Lista wybranych białek o najbardziej zmienionym poziomie w linii 120 CAG/START w porównaniu z linią 20 CAG/START.

		Uniprot ID	Białko	Zmiana	Proces (analiza GO)
<b>120 CAG/START</b>	<b>Podniesiony poziom</b>	P08758	ANXA5	1,65	Organizacja komórki
		P29373	CRABP2	1,61	Rozwój organizmu
		P07949	RET	1,35	Powstawanie neuronów
		P62805	HIST1H4D	1,31	Organizacja chromatyny
		P57053	H2BFS	1,29	Organizacja chromatyny
		P23527	HIST1H2BO	1,18	Organizacja chromatyny
		O43602	DCX	1,14	Powstawanie neuronów
		Q9UPT6	MAPK8IP3	1,14	Powstawanie neuronów
		P16401	HIST1H1B	1,13	Organizacja chromatyny
		P09429	HMGB1	1,12	Powstawanie neuronów
	<b>Obniżony poziom</b>	P37802	TAGLN2	1,23	Różnicowanie komórek
		Q9Y678	COPG1	1,25	Transport pęcherzykowy
		P09486	SPARC	1,25	Cykl komórkowy
		P05783	KRT18	1,28	Transport pęcherzykowy
		P07355	ANXA2	1,30	Transport pęcherzykowy
		P05787	KRT8	1,30	Organizacja cytoszkieletu
		P09172	DBH	1,30	Metabolizm Dopaminy
		O00299	CLIC1	1,33	Cykl komórkowy
		P60981	DSTN	1,36	Organizacja cytoszkieletu
P31949	S100A11	1,54	Transport pęcherzykowy		

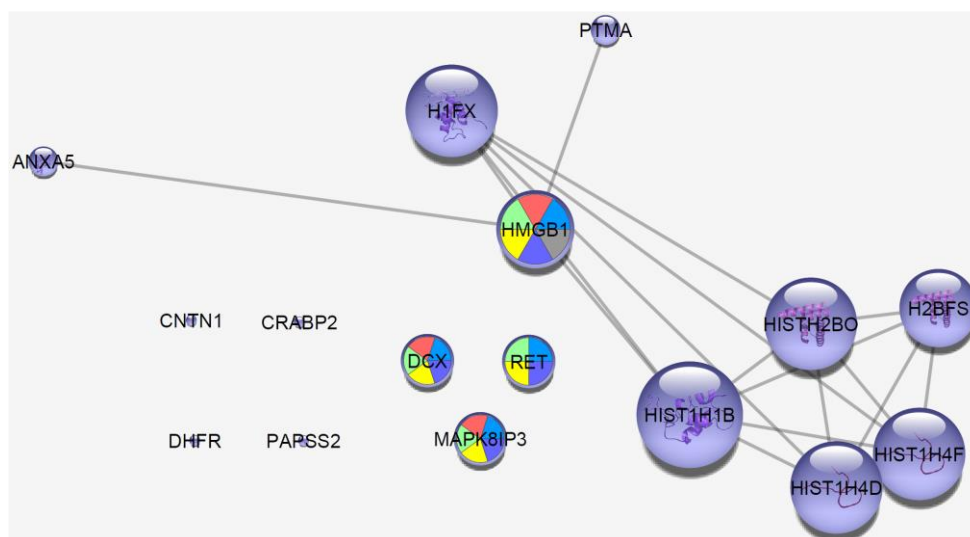
**Tabela 12. Lista wybranych białek o najbardziej zmienionym poziomie w linii 120 CAG/STOP w porównaniu z linią 20 CAG/START.**

		Uniprot ID	Białko	Zmiana	Proces (analiza GO)
<b>120 CAG/STOP</b>	Podniesiony poziom	O43602	DCX	4,77	Powstawanie neuronów
		P20711	DDC	3,31	Biosynteza neurotransmiterów
		Q16623	STX1A	2,79	Odpowiedź na bodziec
		P29373	CRABP2	2,57	Rozwój organizmu
		Q8WWM9	CYGB	2,57	Odpowiedź na stres
		P07949	RET	2,52	Powstawanie neuronów
		P07197	NEFM	2,3	Neurogeneza
		Q16352	INA	2,23	Organizacja neurofilamentów
		P07196	NEFL	2,21	Neurogeneza
		Q12860	CNTN1	1,98	Powstawanie neuronów
	Obniżony poziom	P04792	HSPB1	1,64	Transport białek aksonalnych
		Q92870	APBB2	1,72	Procesy komórkowe
		O00299	CLIC1	1,75	Cykl komórkowy
		P05783	KRT18	1,85	Transport pęcherzykowy
		P05787	KRT8	1,85	Organizacja cytoszkieletu
		Q9UKE5	TNIK	1,89	Procesy komórkowe
		P37802	TAGLN2	1,92	Różnicowanie komórek
		P60903	S100A10	2,13	Transport pęcherzykowy
		P07355	ANXA2	2,27	Transport pęcherzykowy
P31949		S100A11	2,86	Transport pęcherzykowy	

W linii 120 CAG/START w porównaniu z linią 20 CAG/START zaobserwowano większe ilości białek odpowiedzialnych za rozwój i powstawanie neuronów, natomiast obniżony był poziom białek związanych z organizacją cytoszkieletu i transportem pęcherzykowym. Co ciekawe, w porównaniu linii 120 CAG/STOP z linią 20 CAG/START zaobserwowano zmianę w ilości białek uczestniczących w analogicznych procesach.

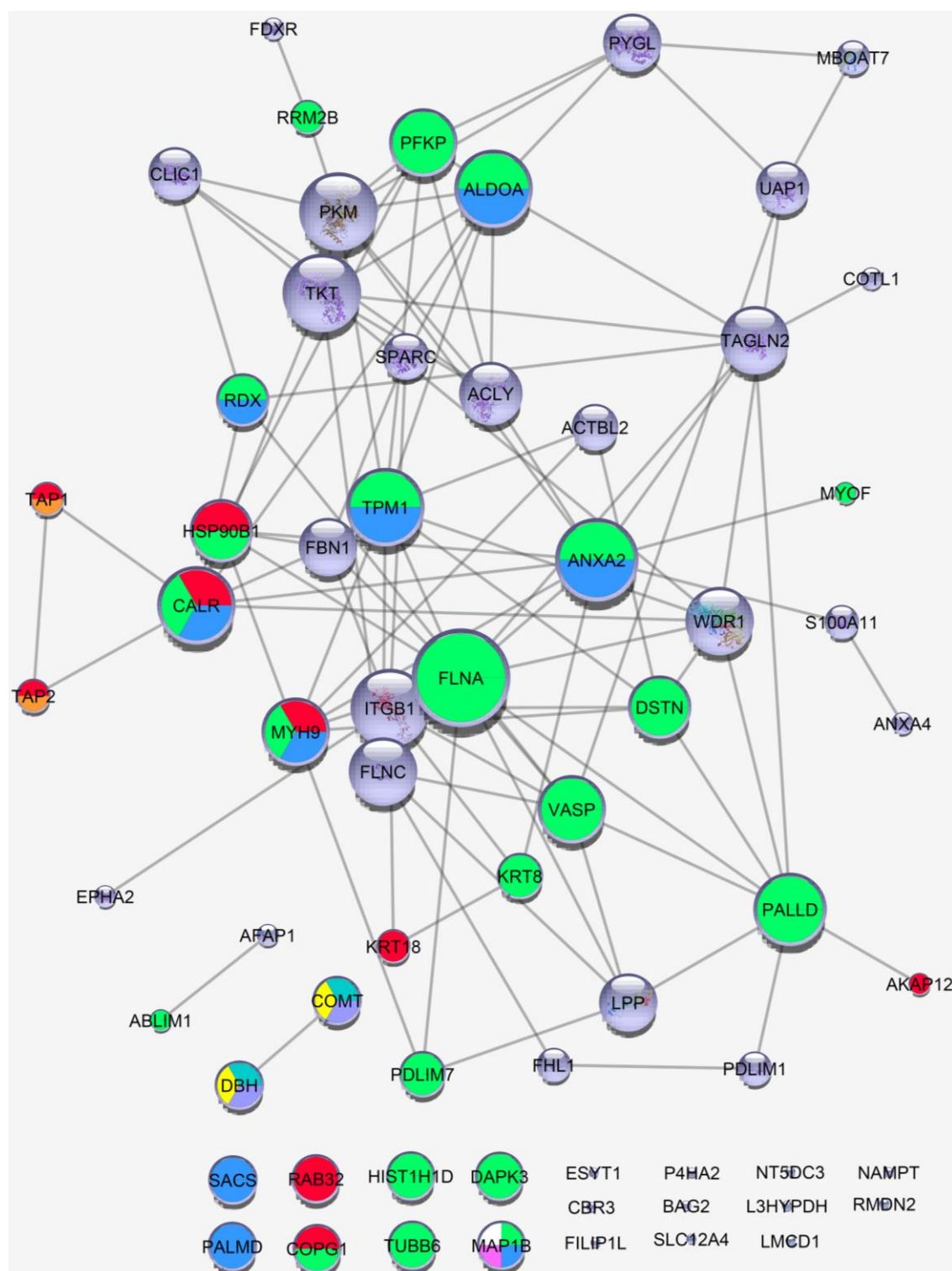
Analiza interakcji między białkami została wykonana w programie STRING. Wyniki zostały następnie wyeksportowane do programu Cytoscape, gdzie zanalizowano je za pomocą NetworkAnalyzer (narzędzie Cytoscape analizujące parametry sieci) i GOIorize (wtyczka do

programu Cytoscape, analiza GO). Wyniki przedstawiono w formie rycin a kolorami zaznaczono węzły białek, biorących udział w procesach, mogących być istotnymi z punktu widzenia patogenezy SCA3. Analiza ta pokazała, że w linii 120 CAG/START podwyższony był poziom białek biorących udział w powstawaniu neuronów: DCX, RET, HMGB1 i MAPK8IP3 (Ryc. 37).



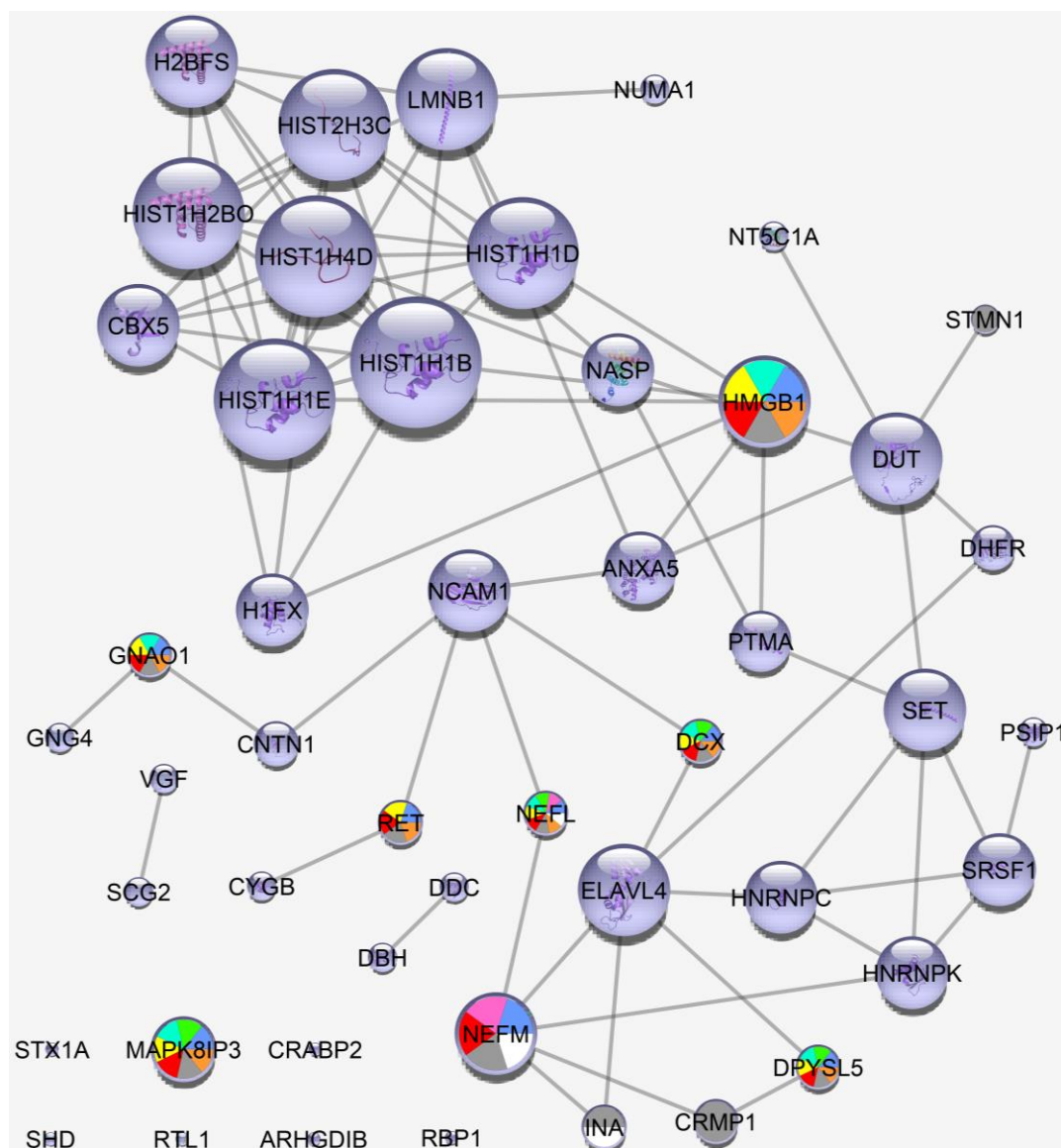
**Rycina 37. Analiza interakcji między białkami o podniesionym poziomie w linii 120 CAG/START w porównaniu z linią 20 CAG/START przeprowadzona programami STRING i Cytoscape.** Wielkość węzłów odpowiada ilości posiadanych połączeń (węzły białek DCX, RET i MAPK8IP3 zostały sztucznie powiększone dla lepszej przejrzystości ryciny). Kolorami znanaczono węzły białek biorących udział w następujących procesach (na podstawie analizy GO): niebieski – neurogeneza, pomarańczowy – tworzenie wypustek neuronalnych, zielony – rozwój neuronów, żółty powstawanie neuronów, fioletowy – różnicowanie neuronów, szary – chemotaksja komórek dendrytycznych.

Natomiast, zmniejszona w tej linii była ilość białek odpowiedzialnych za organizację komórki i metabolizm neurotransmiterów, w tym dopaminy. Ponadto, obniżony był też poziom białek odpowiedzialnych za transport białek z cytozolu do retikulum endoplazmatycznego, co może świadczyć o upośledzeniu systemu UPS (Ryc. 38). Co ciekawe, zaobserwowano też obniżenie poziomu białka SACS, które ulega ekspresji na wysokim poziomie w centralnym układzie nerwowym.



**Rycina 38. Analiza interakcji między białkami o zmniejszonym poziomie w linii 120 CAG/START w porównaniu do linii 20 CAG/START przeprowadzona programami STRING i Cytoscape.** Wielkość węzłów odpowiada ilości posiadanych połączeń (węzły białek COMT, DSH, SACS, RAB32, HIST1H1D, DAPK3, PALMD, COPG1, TUBB6, MAP1B sztucznie powiększone dla lepszej przejrzystości ryciny). Kolorami zaznaczono węzły białek biorących udział w następujących procesach (na podstawie analizy GO): biały – pozytywna regulacja plastyczności synaptycznej, różowy – indukcja plastyczności synaptycznej, turkusowy – metabolizm neurotransmitterów, żółty – metabolizm dopaminy, fioletowy – katabolizm katecholamin, czerwony – transport białek, pomarańczowy – transport białek do retikulum endoplazmatycznego z cytozolu, zielony – organizacja komórki, niebieski – regulacja organizacji komórki

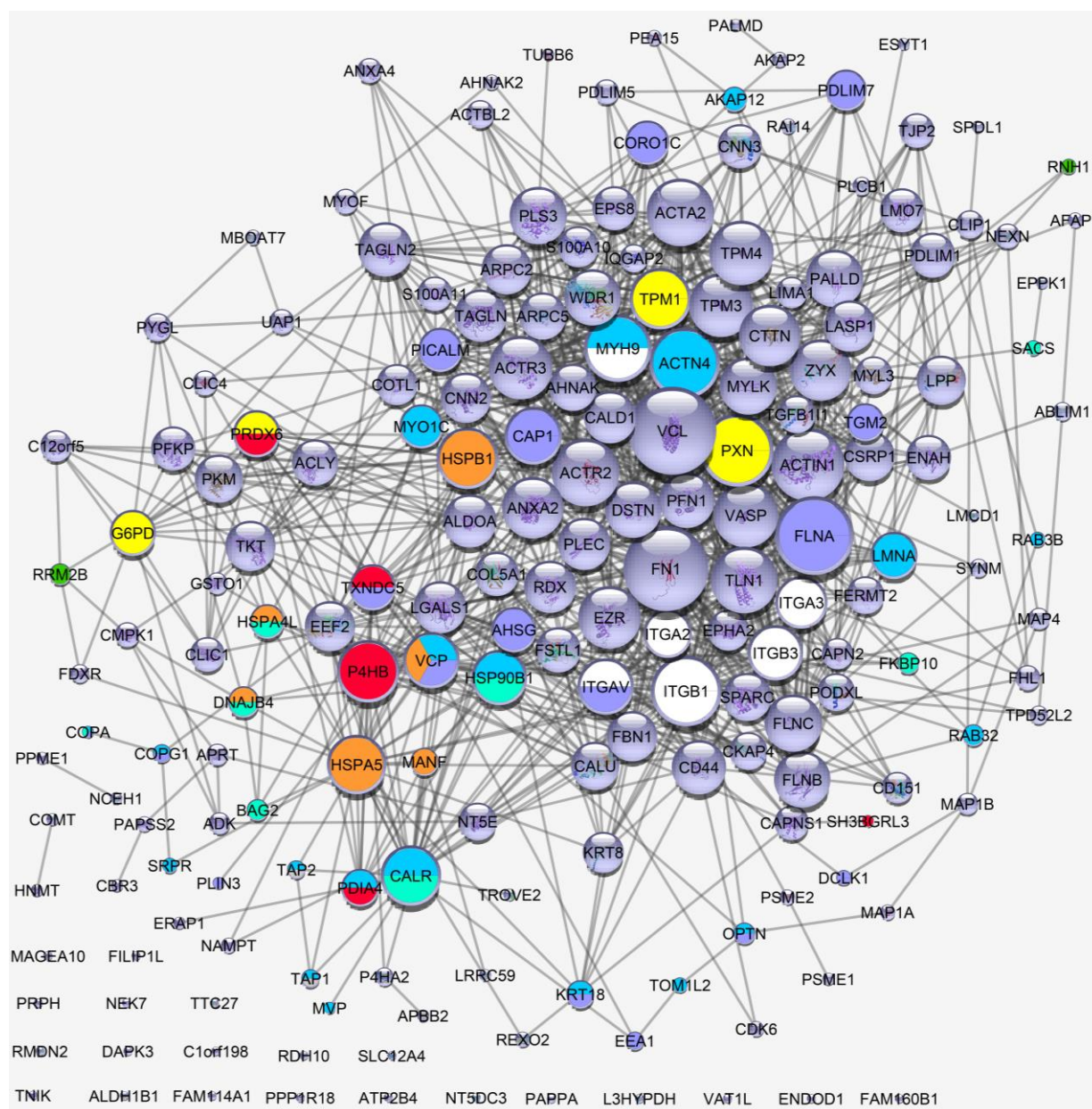
W analizach linii 120 CAG/STOP zaobserwowano obniżenie poziomu ataksyny-3, co było wynikiem spodziewanym, ponieważ białko to ulega nadekspresji w linii 20 CAG/START. Z tego powodu ataksynę-3 wykluczono z późniejszych analiz. Porównanie linii 120 CAG/STOP z linią 20 CAG/START wykazało podwyższony poziom białek, biorących udział w powstawaniu neuronów: DCX, RET, HMGB1, GNAO1, DPYSL5, MAPK8IP3, w tym białek tworzących neurofilamenty: NEFL oraz NEFM (Ryc. 39).



**Rycina 39. Analiza interakcji między białkami o podniesionym poziomie w linii 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START przeprowadzona programami STRING i Cytoscape.** Wielkość węzłów odpowiada ilości posiadanych połączeń (węzeł białka MAPK8IP3 został sztucznie powiększony dla lepszej przejrzystości ryciny). Kolorami zaznaczono węzły białek biorących udział w następujących procesach (na podstawie analizy GO): biały – organizacja cytoszkieletu neurofilamentów, różowy – transport aksonalny, turkusowy – rozwój wypustek neuronalnych, żółty – rozwój neuronów, czerwony – generowanie neuronów, pomarańczowy – różnicowanie neuronów, zielony – morfologia wypustek neuronalnych, niebieski – neurogeneza, szary – rozwój systemu nerwowego



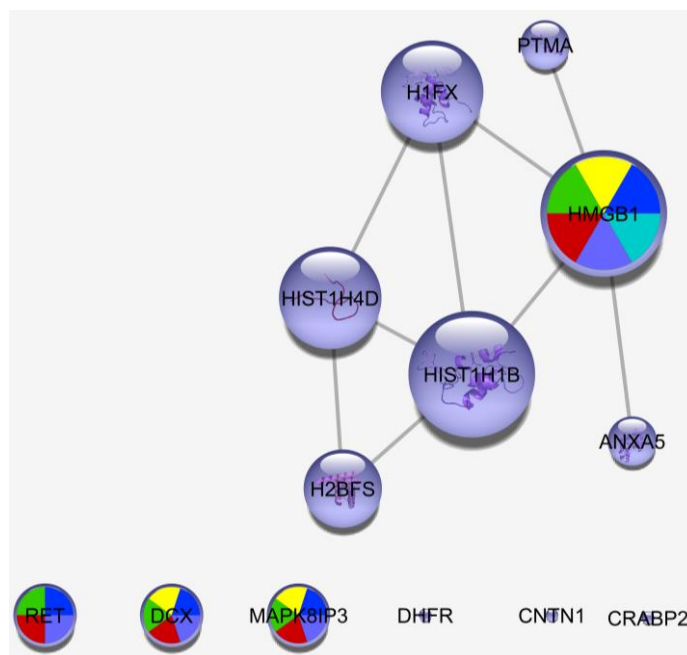
Obserwowano natomiast obniżenie ilości wielu białek zaangażowanych w procesy takie jak: transport białek do retikulum endoplazmatycznego, fałdowanie białek, homeostazę redoks i odpowiedź na źle sfałdowane białka (Ryc. 40). Co ciekawe, wykazano również obniżenie poziomu białka SACS, które posiada właściwości ochronne wobec białek poliQ (Parfitt *et al.*, 2009).



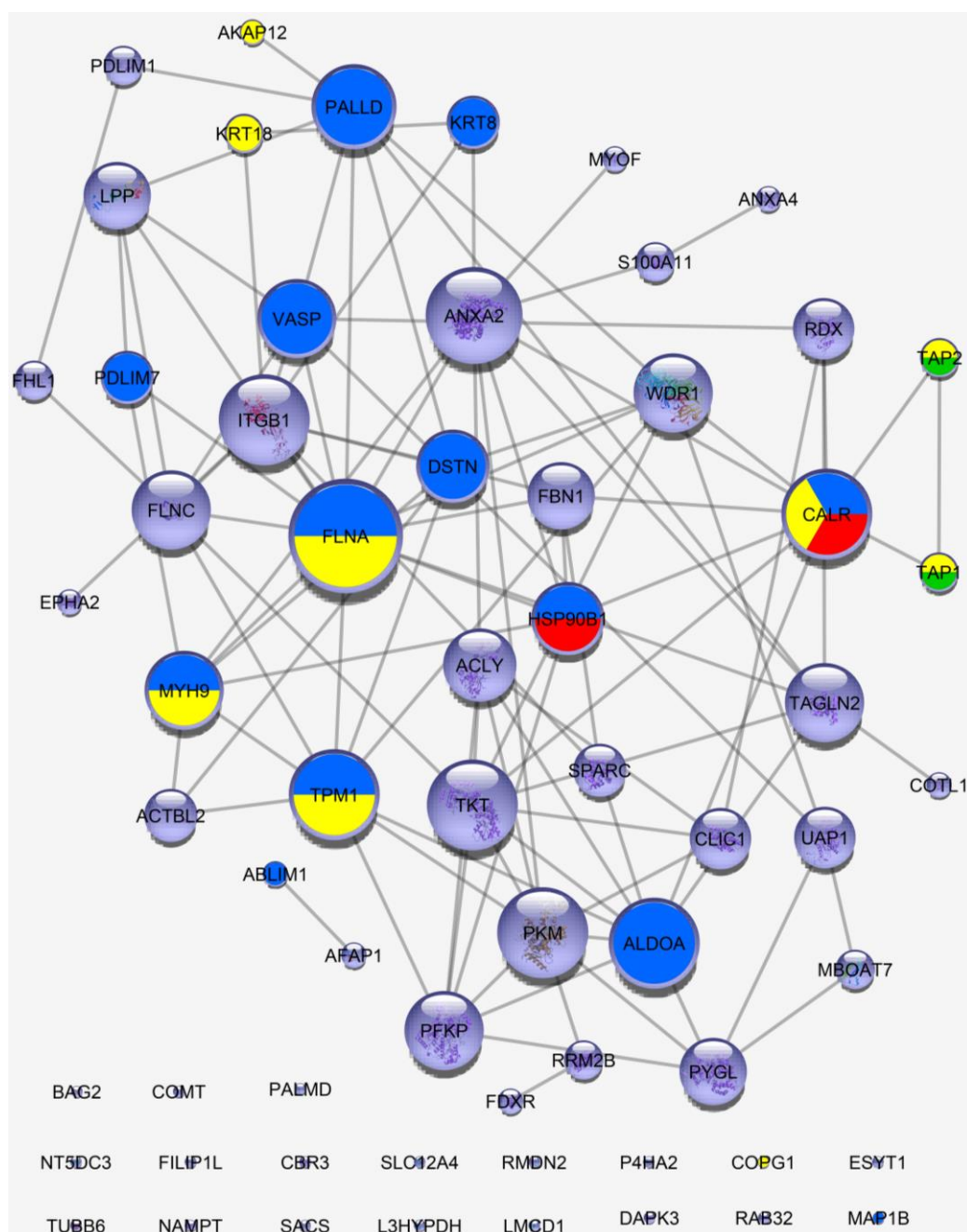
**Rycina 40. Analiza interakcji między białkami o obniżonym poziomie w linii 120 CAG/STOP w porównaniu do linii CAG/START przeprowadzona programami STRING i Cytoscape. Wielkość węzłów odpowiada ilości posiadanych połączeń. Kolorami zaznaczono węzły białek biorących udział w następujących procesach (na podstawie analizy GO): biały – ścieżka sygnałowa integrzyn, czerwony – komórkowa homeostaza redoks, zielony – procesy metabolizmu DNA mitochondrialnego, szary – transport z cytozolu do retikulum endoplazmatycznego, fioletowy – transport pęcherzykowy, żółty – odpowiedź komórki na stres oksydacyjny, pomarańczowy – odpowiedź na niesfałdowane białka, turkusowy – fałdowanie białek**

## 4. Wyniki

Następnie, tak jak w przypadku analiz transkryptomycznych, zidentyfikowano białka o zmienionej ilości zarówno w linii 120 CAG/START, jak i 120 CAG/STOP. Zestawienie danych dla obydwu linii wykazało podniesiony poziom białek odpowiedzialnych za rozwój układu nerwowego (Ryc. 41). Obserwowano też zmniejszone ilości białek biorących udział w organizacji cytoszkieletu, sekwestracji jonów wapnia i transporcie wewnątrzkomórkowym (Ryc. 42)



**Rycina 41. Analiza interakcji między białkami o podniesionym poziomie w liniach 120 CAG/START i 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START przeprowadzona programami STRING i Cytoscape. Wielkość węzłów odpowiada ilości posiadanych połączeń (węzły białek RET, DCX i MAPK8IP3 zostały sztucznie powiększone dla lepszej przejrzystości ryciny). Kolorami zanaczono węzły białek biorących udział w następujących procesach (na podstawie analizy GO): granatowy – neurogeneza, żółty – rozwój wypustek neuronalnych, zielony – rozwój neuronów, czerwony – generowanie neuronów, fioletowy – różnicowanie neuronów, błękitny – chemotaksja komórek dendrytycznych**



**Rycina 42. Analiza interakcji między białkami o zmniejszonej ilości w liniach 120 CAG/START i 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START przeprowadzona programami STRING i Cytoscape. Wielkość węzłów odpowiada ilości posiadanych połączeń Kolorami zaznaczono węzły białek biorących udział w następujących procesach (na podstawie analizy GO): niebieski – organizacja cytoszkieletu, żółty – transport wewnątrzkomórkowy, zielony – transport z cytozolu do retikulum endoplazmatycznego, czerwony – sekwestracja jonów wapnia**

Funkcje białek zidentyfikowanych w powyższych analizach, które mogą brać udział w patogenezie SCA3 przedstawiono w Tabeli 11.

**Tabela 11. Funkcje białek o zmienionym poziomie w liniach 120 CAG/START i 120 CAG/STOP w porównaniu do linii 20 CAG/START.**

	<b>Uniprot ID</b>	<b>Białko</b>	<b>Funkcja</b>
Białka o podwyższonej ilości	O43602	DCX	Białko związane z mikrotubulami, reguluje ich organizację i stabilność przez co kieruje migracją neuronów.
	P07949	RET	Rola w rozwoju systemu nerwowego a także rozwoju tkanek i organów wywodzących się z grzebienia nerwowego.
	P29373	CRABP2	Białko zaangażowane w ścieżkę sygnałową kwasu retinowego.
	P09429	HMGB1	Białko wiążące jądrowe DNA, które bierze udział w regulacji transkrypcji i jest zaangażowane w organizację DNA. Wiążąc się z białkiem RAGE stymuluje wzrost neuronów.
	Q9UPT6	MAPK8IP3	Białko rusztowania dla komórek neuronalnych. Stymuluje elongację aksonów i jest to też kluczowe białko dla ich regeneracji. Reguluje migrację neuronów kory mózgowej.
Białka o zmniejszonej ilości	O00299	CLIC1	Kanał chlorkowy zaangażowany w wiele ścieżek sygnałowych.
	P31949	S100A11	Białko wiążące wapń, znajduje się ono w cytoplazmie wielu komórek i jest zaangażowane w regulację wielu procesów takich jak cykl komórkowy i różnicowanie komórek.
	P27797	CARL	Białko funkcjonujące między innymi w retikulum endoplazmatycznym, gdzie wiąże jony wapnia i stanowi w ten sposób ich główny rezerwuwar.
	P21964	COMT	Białko biorące udział w jednej z głównych ścieżek degradacji neurotransmiterów należących do grupy katecholamin: dopaminy, epinefryny i norepinefryny.
	Q9Y678	COPG1	Podjednostka kompleksu opłaszczającego pęcherzyki, zaangażowana w transport z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego.
	Q9NZJ4	SACS	Białko, które ulega wysokiej ekspresji w centralnym układzie nerwowym. Uważa się, że chroni komórkę przed białkami poliQ.

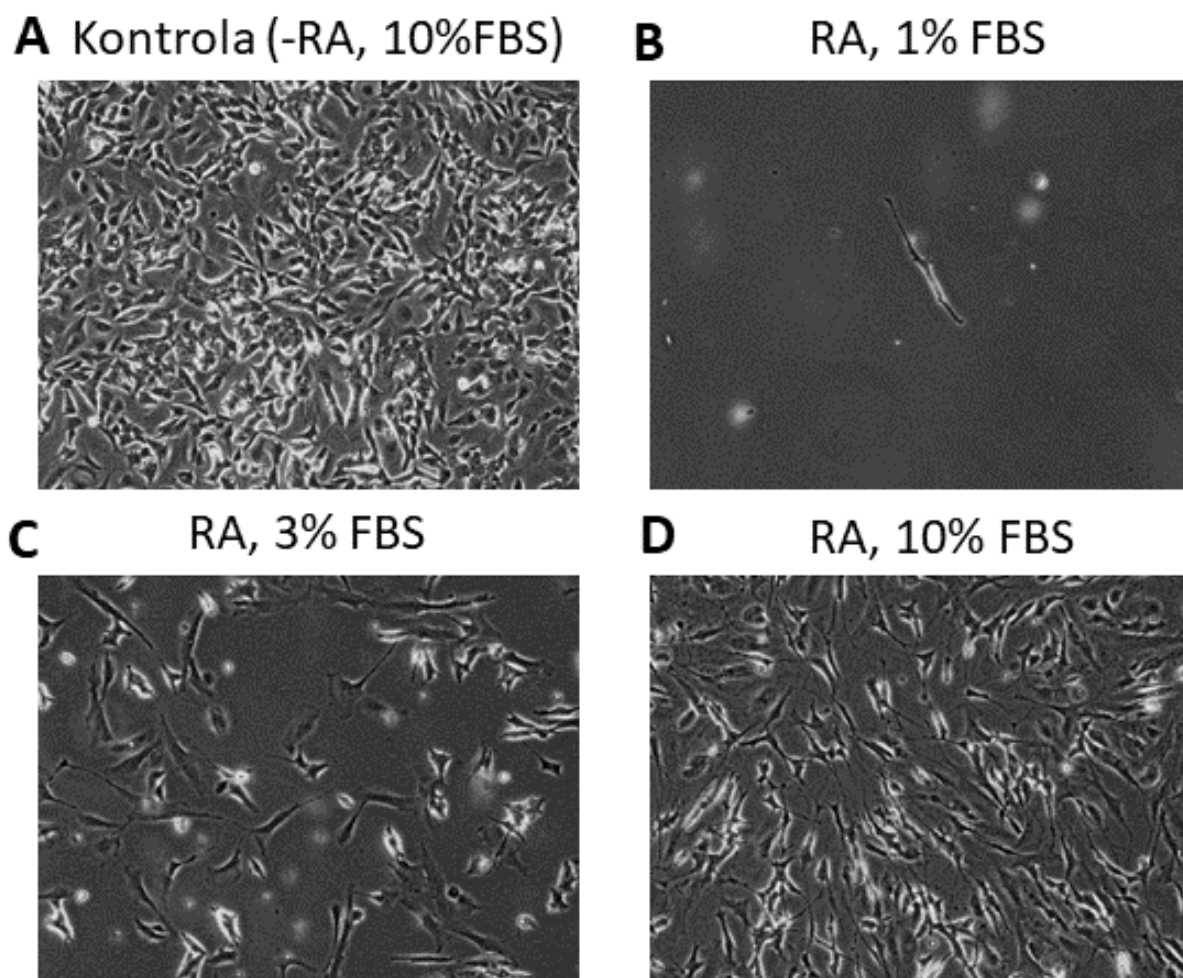
Analizy proteomiczne wykazały, że zmutowany transkrypt ataksyny-3 może powodować deregulację szeregu procesów zachodzących w komórce w wyniku zmiany ilości wielu białek. Na podstawie otrzymanych wyników, jak i biorąc pod uwagę rozwój SCA3, można przypuszczać, że toksyczny RNA przyczynia się do patogeny tej choroby przez zaburzanie rozwoju układu nerwowego i homeostazy jonów wapnia. Ciekawa jest też obserwacja dotycząca obniżenia ilości białka SACS. Wydaje się bowiem, że białko to chroni komórkę przed toksycznością białek poliQ (Parfitt *et al.*, 2009).

### **4.7 Różnicowanie komórek SH-SY5Y**

Powszechnie wiadomo, że w obecności kwasu retinowego komórki SH-SY5Y różnicują przez co ich fenotyp jeszcze bardziej przypomina komórki neuronalne: tworzą wypustki dendrytyczne i zaczynają syntetyzować markery dojrzałych neuronów (Xicoy *et al.*, 2017). Dane literaturowe sugerują, że cechy te mogą sprzyjać pojawieniu się ostrzejszych efektów cytotoksycznych w badanych liniach komórkowych (Evert *et al.*, 1999; Neves-Carvalho *et al.*, 2015). Zróżnicowane modele SCA3 mogłyby zatem stanowić atrakcyjny układ do przyszłych walidacji wyników otrzymanych w niniejszej pracy w analizach transkryptomicznych i proteomicznych. Postanowiono zatem zróżnicować komórki SH-SY5Y a następnie wstępnie je scharakteryzować analizując tworzenie się agregatów białkowych i skupień RNA.

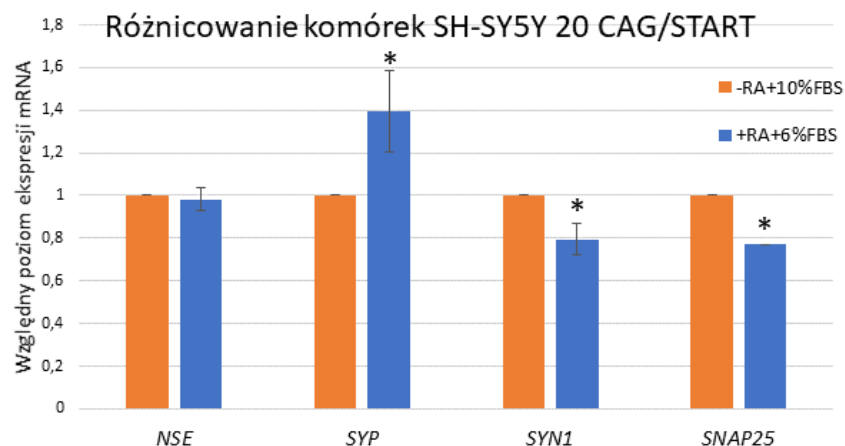
#### *4.7.1 Opracowanie protokołu do różnicowanie modeli komórkowych SH-SY5Y*

W celu zróżnicowania komórek SH-SY5Y do komórek neuropodobnych dokonano analizy literaturowej i wybrano najpowszechniej stosowany, trwający 7 dni, protokół: dodatek do medium hodowlanego DMEM/F12 kwasu retinowego (RA, ang. retinoic acid) w stężeniu 10 $\mu$ M i FBS w stężeniu: 1%, 3% lub 10%. Zróżnicowane komórki powinny mieć podniesiony poziom markerów neuronalnych, takich jak: neuroswoista enolaza (NSE, ang. neuron specific enolase), synaptofizyna (SYP, ang. synaptophysin), synapsyna I (SYN1, ang. synapsin I) i białko związane z synaptosomem o masie 25 kDa (SNAP25, ang. synaptosome associated protein of 25 kDa) jak również obniżoną proliferację i tworzyć wypustki dendrytyczne. Efektywność różnicowania określano na podstawie morfologii komórek oraz poziomu ekspresji powyższych markerów neuronalnych za pomocą qPCR. W pierwszych eksperymentach użyto linii 20 CAG/START. Na Ryc. 43A przedstawiono komórki hodowane w pełnym medium DMEM/F12, które stanowiły w tym eksperymencie kontrolę negatywną. Jak przedstawiono na Ryc. 43B komórki hodowane w medium do różnicowania z dodatkiem 1% FBS umierały po trzecim dniu, te hodowane w medium do różnicowania z dodatkiem 3% FBS nie wykazywały żadnych morfologicznych oznak różnicowania (Ryc. 43C), natomiast te hodowane w medium z dodatkiem 10% FBS wykazywały w przeciwieństwie do innych morfologiczne oznaki zróżnicowania, jednak nie doszło w nich do zahamowania proliferacji, przez to osiągnęły one zbyt dużą konfluencję co uniemożliwiło kontynuację procesu różnicowania (Ryc. 43D).



**Rycina 43. Reprezentatywne zdjęcia komórek SH-SY5Y różnicowanych przez 7 dni w medium z dodatkiem 10 $\mu$ M RA i zawierającym różne stężenia FBS. A – Kontrola, komórki hodowane w pełnym medium DMEM/F12 bez dodatku kwasu retinowego. B – Komórki hodowane z dodatkiem RA i 1% FBS. C – Komórki hodowane z dodatkiem RA i 3% FBS. D - Komórki hodowane z dodatkiem RA i 10% FBS. RA – kwas retinowy**

Ze względu na zaobserwowane problemy z przeżywalnością, jak i ilością komórek, w kolejnym eksperymencie zastosowano medium z dodatkiem 6% FBS. Komórki hodowane w tych warunkach przez 7 dni wykazywały obniżoną proliferację i zmiany morfologiczne świadczące o zróżnicowaniu. Jednakże analiza poziomu ekspresji markerów neuronalnych nie potwierdziła fenotypu neuronalnego. Poziom ekspresji *SYP* był podniesiony, natomiast *NSE* pozostał bez zmian, a *SYN1* i *SNAP25* był obniżony (Ryc. 44).



**Rycina 44. Względny poziom ekspresji markerów neuronalnych: NSE, SYP, SYN1 i SNAP25 w komórkach 20 CAG/START po różnicowaniu.** NSE (neuro swoista enolaza), SYP (synaptofizyna), SYN1 (synapsyna I), SNAP25 (białko związane z synaptosomem o masie 25 kDa), \* -  $p < 0,05$

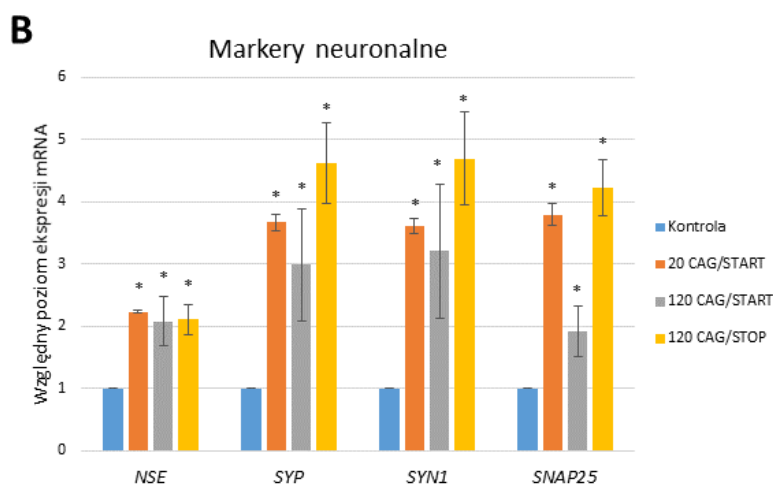
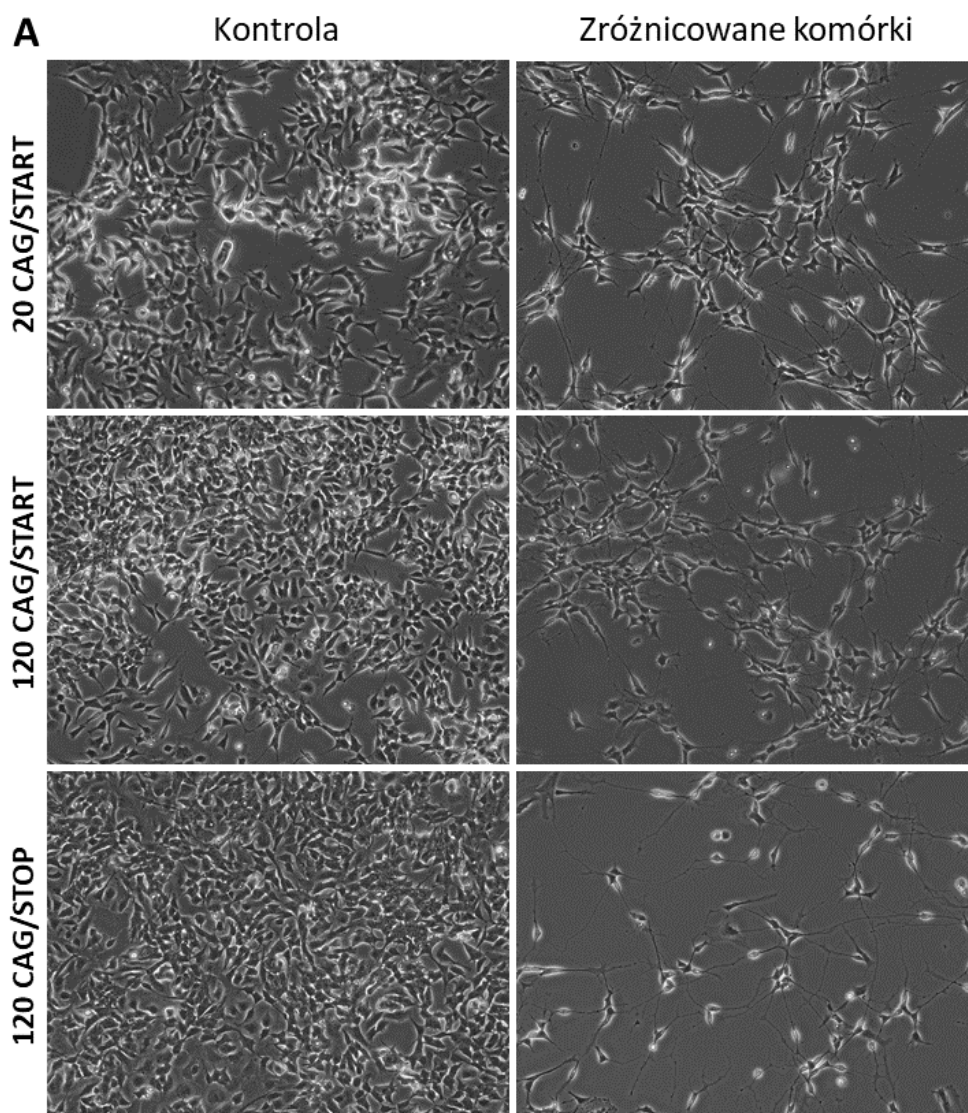
Wobec powyższych faktów postanowiono zastosować zmodyfikowany protokół zaproponowany przez Shipley i wsp. (Shipley *et al.*, 2016). Populacja komórek SH-SY5Y występuje w dwóch frakcjach morfologicznych: N – o morfologii neuroblastomalnej i S – o morfologii epitelialnej. Komórki typu N, w porównaniu do S, barwią się pozytywnie na markery neuronalne i są bardziej podatne na różnicowanie. Przy korzystaniu z protokołu opracowanego przez Shipley i wsp. populacja komórek powinna w całości być typu N, natomiast stosowane w niniejszych badaniach komórki były takie w 80%. Aby wyselekcjonować komórki typu N wykorzystano fakt, że są one znacznie słabiej przytwierdzone do szalki w porównaniu do komórek typu S i w trakcie pasażu odklejają się od powierzchni naczynia hodowlanego jako pierwsze. Po kilkunastu przeprowadzonych pasażach otrzymano populację komórek SH-SY5Y składającą się wyłącznie z typu N. Istotne w powyższym protokole jest też stopniowe obniżanie w medium hodowlanym stężenia FBS inaktywowanego termicznie (hiFBS, ang. heat inactivated FBS). Jest to związane z tym, że komórki typu S są komórkami aktywnie dzielącymi się, jednak dzielą się wolniej w medium z dodatkiem hiFBS. Ponadto komórki typu S potrzebują wyższego poziomu FBS niż zróżnicowane komórki, które zatrzymały swoje podziały. Kluczowe jest więc w tym protokole takie obniżenie poziomu hiFBS aby frakcja komórek typu S nie zdominowała komórek różnicujących się. Z drugiej strony należy zrobić to w taki sposób, aby nie wpłynąć na kondycje komórek i nie uniemożliwić im różnicowania się. Aby rozwiązać tą kwestię komórki poddano różnicowaniu w medium EMEM, z dodatkiem 10  $\mu$ M kwasu retinowego i 6% hiFBS, którego stężenie stopniowo obniżano w dwóch różnych wariantach jak przedstawiono w Tab. 12.

**Tabela 12. Przetestowane warianty obniżania poziomu hiFBS podczas różnicowania komórek SH-SY5Y.** Lp. – liczba porządkowa, dzień „0” jest dniem wysiania komórek do różnicowania.

Lp.	Dzień									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	10%	6%	6%	3%	3%	1%	1%	1%	1%	1%
2	10%	6%	6%	6%	6%	3%	3%	1%	1%	1%

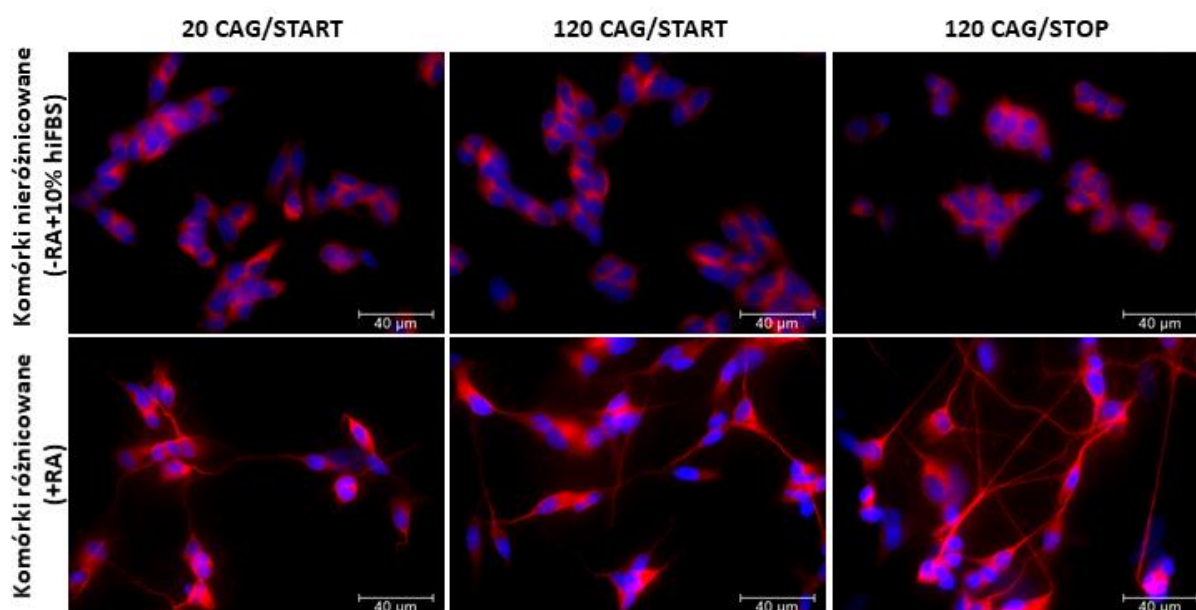
W obydwu sprawdzonych wariantach komórki wykazały morfologiczne oznaki różnicowania w postaci tworzenia się wypustek dendrytycznych (Ryc. 45A). Ponadto nie zaobserwowano ekspansji komórek typu S. Jednak z przetestowanych sposobów obniżania poziomu hiFBS pierwszy okazał się zbyt surowy dla komórek, ponieważ większość z nich nie przeżyła do dnia 9. Aby potwierdzić, że komórki zróżnicowały sprawdzono poziom ekspresji markerów neuronalnych za pomocą qPCR. Wykazano, że wszystkie badane markery posiadały istotnie statystycznie zwiększony poziom ekspresji (Ryc. 45B). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że za pomocą zmodyfikowanego protokołu zaproponowanego przez Shipley i wsp. oraz ustalonego sposobu obniżania poziomu hiFBS udało się zróżnicować komórki SH-SY5Y. Następnie postanowiono poddać różnicowaniu linii 120 CAG/START i 120 CAG/STOP, zdjęcia zróżnicowanych komórek przedstawiono na Ryc. 45A. Fenotyp zróżnicowanych komórek linii 120 CAG/START oraz 120 CAG/STOP potwierdzono na podstawie analiz poziomu ekspresji markerów neuronalnych (Ryc. 45B)





**Rycina 45. Różnicowanie komórek linii 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP. A** – Reprezentatywne zdjęcia komórek linii 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP poddanych procesowi różnicowania. **B** - Względny poziom ekspresji markerów neuronalnych: *NSE*, *SYP*, *SYN1* i *SNAP25* w liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po różnicowaniu. kontrola - komórki hodowane w standardowym medium hodowlanym, \* -  $p < 0,05$ . *NSE* (neuro swoista enolaza), *SYP* (synaptofizyna), *SYN1* (synapsyna I), *SNAP25* (białko związane z synaptosomem o masie 25 kDa)

W celu walidacji procesu różnicowania komórek SH-SY5Y przeprowadzono także barwienia *in situ* białka MAP-2. Ze względu na to, że białko to wiąże się z tubuliną i uczestniczy w tworzeniu się mikrotubul w dendrytach, w zróżnicowanych komórkach daje intensywny sygnał zlokalizowany w utworzonych wypustkach (Xicoy *et al.*, 2017). Na Ryc. 46 przedstawiono wizualizację białka MAP-2. Jak pokazano, w komórkach nieróżnicowanych białko MAP-2 było zlokalizowane w ciele komórkowym, natomiast w komórkach poddanych procesowi różnicowania obecne było również w sieci zbudowanej z wypustek wytworzonych przez komórki. Reasumując, ustalony protokół pozwolił na efektywne zróżnicowanie linii komórkowych 20 CAG/START, 120 CAG/START oraz 120 CAG/STOP.

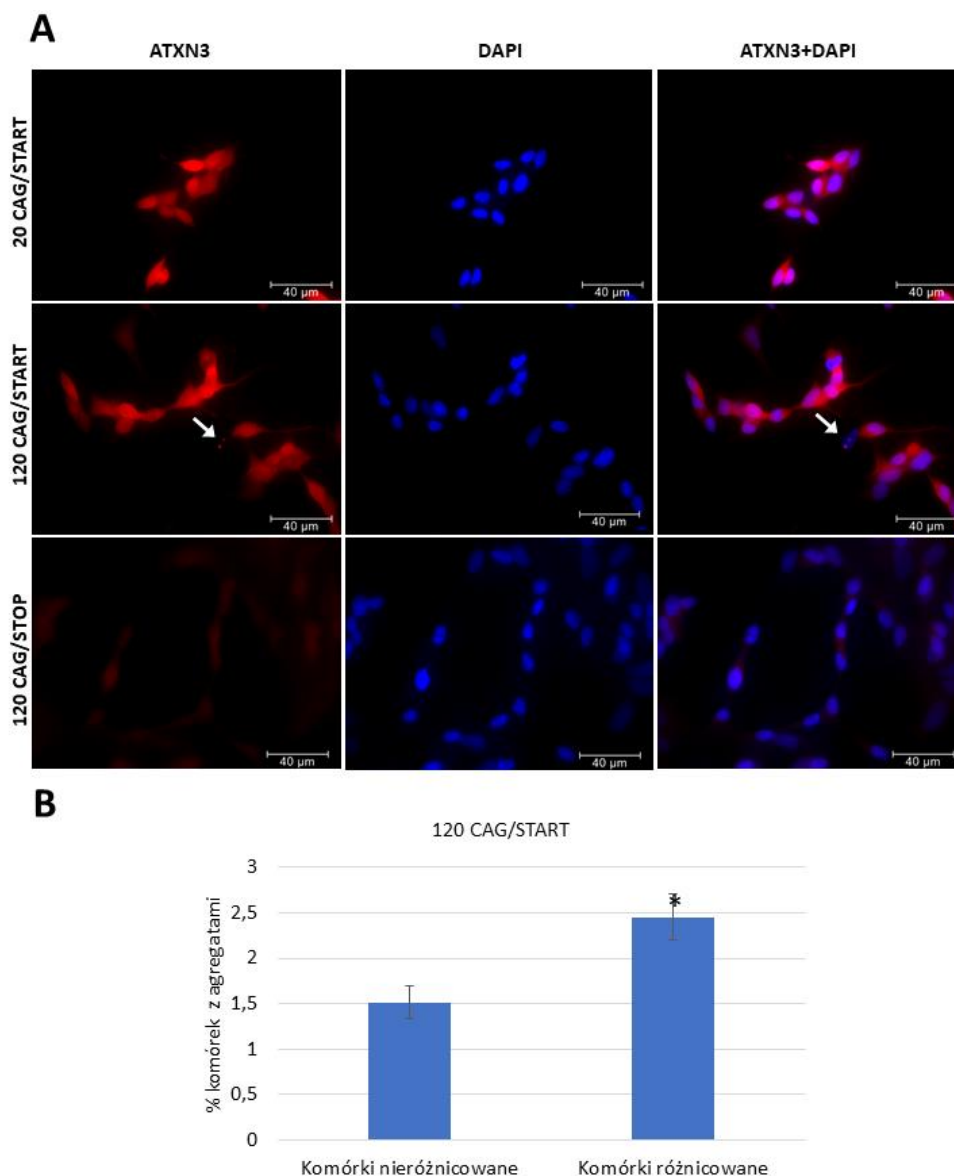


**Rycina 46.** Wizualizacja białka MAP-2 w różnicowanych i nieróżnicowanych liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP. Zaprezentowano nałożone na siebie obrazy z barwień białka MAP-2 oraz jąder komórkowych. Na czerwono wybarwiono białko MAP-2, a na niebiesko, za pomocą DAPI, jądra komórkowe.

### 4.7.2 Analiza obecności agregatów zmutowanej ataksyny-3 w zróżnicowanych modelach SCA3

W celu określenia, czy fenotyp zróżnicowanych komórek sprzyja procesowi tworzenia się agregatów białkowych wykorzystano metodę immunofluorescencji. Komórki zróżnicowano za pomocą opracowanego protokołu, a następnie zaindukowano w nich transkrypcję transgenu. Ze względu na zaobserwowaną w poprzednich eksperymentach zależność tworzenia się agregatów od czasu, analizy zostały wykonane po 6 dniach od momentu podania do komórek doksycykliny. Jak przedstawiono na Ryc. 47 po tym czasie w liniach 20 CAG/START i 120 CAG/START widoczny był silny sygnał pochodzący od egzogenu i endogennej ataksyny-3, natomiast w linii 120 CAG/STOP wizualizowane było tylko endogenne białko. W badanych

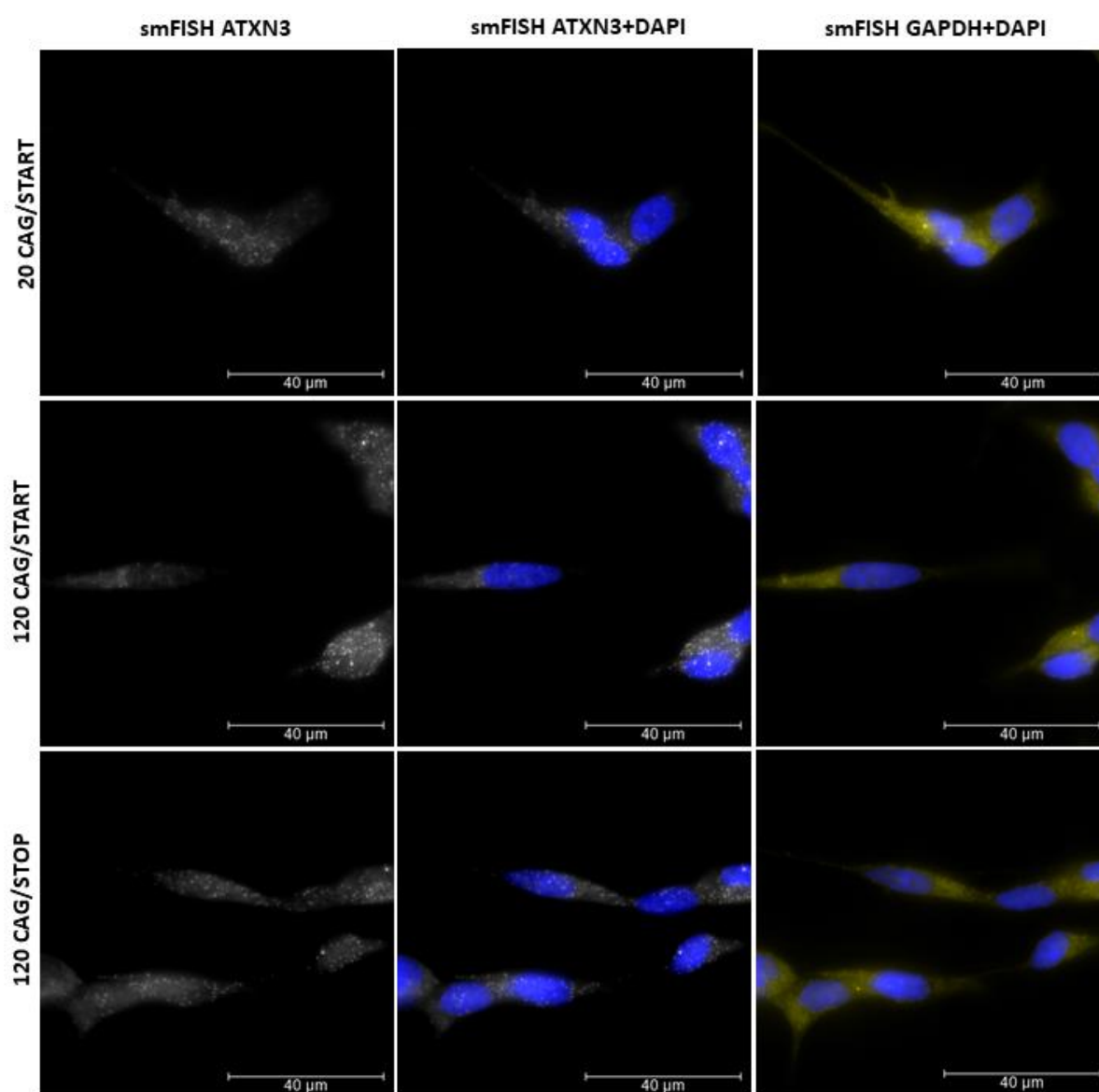
liniach ataksyna-3 znajdowała się zarówno w jądrze komórkowym jak i cytoplazmie. Ponadto sygnał od ataksyny-3 identyfikowano w wypustkach dendrytycznych. Obecność agregatów zmutowanej ataksyny-3 zaobserwowano w nielicznych komórkach linii 120 CAG/START (Ryc. 47A). Co ciekawe, ich ilość była istotnie statystycznie większa w porównaniu do liczby nieróżnicowanych komórek posiadających agregaty (Ryc. 47B). Przyczyną tego może być to, że komórki zróżnicowane zatrzymują swoją proliferację, co zapewne ułatwia formowanie się agregatów zmutowanej ataksyny-3.



**Rycina 47. Analiza obecności agregatów ataksyny-3 w zróżnicowanych liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START oraz 120 CAG/STOP po 6 dniach indukcji ekspresji transgenu.** A - Wizualizacja białka ataksyny-3 za pomocą immunofluorescencji w zróżnicowanych liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po 6 dniach indukcji ekspresji transgenu. Białymi strzałkami zaznaczono agregaty białkowe. B - Udział procentowy komórek posiadających agregaty w linii 120 CAG/START nieróżnicowanej i zróżnicowanej. Na czerwono wybarwiono ataksynę-3, a na niebiesko, za pomocą DAPI, jądra komórkowe. \* -  $p < 0,05$

## 4.7.3 Analiza obecności skupień RNA ataksyny-3 w zróżnicowanych modelach SCA3

W celu określenia czy w zróżnicowanych komórkach SH-SY5Y zmutowany transkrypt ataksyny-3 tworzy skupienia RNA wykorzystano metodę smFISH. Komórki zróżnicowano korzystając z opracowanego protokołu, a następnie dodano do nich doksycyklinę. Analizy wykonano po 6 dniach od momentu indukcji ekspresji transgenu. Jak przedstawiono na Ryc. 48, we wszystkich liniach obserwowano duże ilości sygnału pochodzącego od transkryptu ataksyny-3, który był zlokalizowany w jądrze komórkowym oraz cytoplazmie. Przeprowadzone analizy nie wykazały obecności skupień RNA w liniach z ekspresją zmutowanego transkryptu ataksyny-3.



**Rycina 48. Analiza lokalizacji transkryptu ataksyny-3 za pomocą smFISH w zróżnicowanych liniach 20 CAG/START, 120 CAG/START i 120 CAG/STOP po 6 dniach indukcji ekspresji transgenu.** Na biało wybarwiono transkrypty ataksyny-3, na żółto transkrypty *GAPDH*, na niebiesko jądra komórkowe za pomocą DAPI.

### **5. Dyskusja**

W niniejszej pracy postanowiono zgłębić słabo poznane zagadnienie toksyczności RNA w SCA3, jednej z najpowszechniej występujących ataksji rdzeniowo-mózdkowych. Choroba ta posiada skomplikowany mechanizm patogenezy i do dziś pozostaje nieuleczalna. Identyfikacja ścieżek przez jakie może działać potencjalnie toksyczny transkrypt zmutowanej ataksyny-3 mogłaby wskazać nowe cele dla terapii SCA3. Prowadzone do tej pory badania nad tą chorobą opierały się na modelach komórkowych lub zwierzęcych uniemożliwiających rozróżnienie toksyczności RNA od białka. Transgeny ulegające w nich ekspresji nie posiadały odpowiedniego kontekstu genetycznego lub ulegały zarówno transkrypcji, jak i translacji, przez co toksyczność białka nakładała się na potencjalną toksyczność RNA ( Tsoi *et al.*, 2011, 2012; Fiszer and Krzyzosiak, 2013).

Stąd, w niniejszej pracy utworzono po raz pierwszy taki układ modeli komórkowych, który umożliwił zidentyfikowanie efektów za jakie może być odpowiedzialny jedynie transkrypt zmutowanej ataksyny-3. Po wstępnej charakterystyce wyprowadzonych modeli SCA3 poddano je globalnym analizom transkryptomicznym i proteomicznym w celu wytypowania ścieżek patogenezy aktywowanych obecnością zmutowanego transkryptu ataksyny-3, którego rola w patogenezie SCA3 jest w dalszym ciągu nieznaną.

#### ***5.1 Wyprowadzenie i charakterystyka stabilnych modeli komórkowych, umożliwiających odróżnienie toksyczności RNA od toksyczności białka w SCA3***

W badaniach patogenezy SCA3, w tym roli zmutowanego transkryptu w modelach komórkowych, stosowane są różne wersje transgeny zmutowanej ataksyny-3. Zawierają one różnej długości ciągi powtórzeń CAG, stanowią fragmenty pełnej długości ataksyny-3 czy też ulegają ekspresji w fuzji z genem reporterowym (Fiszer and Krzyzosiak, 2013). W celu uzyskania układu modelowego, który jak najwierniej oddawałby sytuację fizjologiczną, do otrzymania transgenów, ulegających ekspresji w wyprowadzonych modelach komórkowych, wykorzystano cDNA ataksyny-3 pochodzący z fibroblastów od pacjenta ze SCA3 (Mykowska *et al.*, 2011). Jego istotnymi cechami było posiadanie pełnej długości sekwencji kodującej ataksynę-3, jak i fragmentów sekwencji 5' i 3' UTR. W badaniach toksyczności transkryptu niezwykle ważny jest kontekst sekwencji w jakim znajdują się powtórzenia. Pokazano, że sekwencja pseudopowtórzeń flankująca ciąg CAG w ataksynie-3 ma kluczowe znaczenie dla

formowania struktury RNA tworzonej przez powtórzenia (Sobczak *et al.*, 2003; Michlewski and Krzyzosiak, 2004; Ciesiolka *et al.*, 2017).

W niniejszej pracy poprzez wprowadzenie kodonów stop do sekwencji ataksyny-3, skutecznie uniemożliwiających proces kanonicznej translacji, otrzymano pierwszy model do badania toksyczności transkryptu zmutowanej ataksyny-3. Co ważne, kodony stop zostały wprowadzone poza miejscami mającymi kluczowe znaczenie dla struktury transkryptu, a więc nie powinny wpływać na potencjalną toksyczność RNA. Ostatecznie, w celu rozróżnienia toksyczności RNA od białka stworzono zestaw modeli komórkowych, tak jak opisano to wcześniej w rozdziale 3.1.

Modele komórkowe SCA3 wyprowadzono przy użyciu systemu Flp-In T-REx. Jest on powszechnie stosowany do otrzymywania stabilnych modeli komórkowych, w tym modeli chorób neurodegeneracyjnych (Y. Liu *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014; Stopford *et al.*, 2017). Dzięki modelom stworzonym za jego pomocą pokazano, że białka poliQ mogą zaburzać proces endocytozy i ustalono związek między zmianami w alternatywnym splicingu a ilością MBNL1 w komórce. Ponadto, z wykorzystaniem systemu Flp-In T-REx badano też rolę zmutowanego RNA w patogenezie C9ALS/FTD (Yu *et al.*, 2014; Wagner *et al.*, 2016; Stopford *et al.*, 2017). Przewagą systemu Flp-In T-REx nad innymi systemami do wyprowadzenia stabilnych modeli komórkowych, w tym podejścia lentiwirusowego jest integracja transgenu w jedno ściśle określone miejsce w genomie komórki. Dzięki temu wpływ kontekstu genetycznego na ekspresję transgenu jest taki sam. Drugą zaletą jest możliwość kontrolowania transkrypcji badanego transgenu, co umożliwia między innymi badanie wpływu czasu ekspresji transgenu na fenotyp komórek. Do otrzymania modeli komórkowych SCA3 wybrano komórki ludzkiej linii neuroblastoma: SH-SY5Y, ze względu na to, że posiadają one cechy charakterystyczne dla komórek neuronalnych. Są nimi między innymi ekspresja receptorów neuronalnych i aktywność neuronalnych markerów enzymatycznych. Ponadto, komórki SH-SY5Y można zróżnicować w komórki neuropodobne, w wyniku czego syntetyzują one markery charakterystyczne dla dojrzałych neuronów, takie jak neuroswoista enolaza i synaptofizyna. Zróżnicowane komórki SH-SY5Y zmieniają też swoją morfologię przez tworzenie wypustek dendrytycznych (Xicoy *et al.*, 2017). Linia SH-SY5Y jest powszechnie stosowana jako model do badań patogenezy chorób neurodegeneracyjnych, w tym roli zmutowanej ataksyny-3 w SCA3 (Schlachetzki *et al.*, 2013; Yusuf *et al.*, 2013; Krishna *et al.*, 2014; Xicoy *et al.*, 2017).

Po wstępnej charakterystyce, mającej na celu jakościową i ilościową analizę ekspresji transgenu, w wybranych liniach komórkowych badano znane markery patogenezy SCA3, w

tym toksyczność białka i RNA. Analizowano tworzenie się agregatów białkowych i skupień jądrowych, oraz apoptozę i stres retikulum endoplazmatycznego. Badaniami objęto linię kontrolną 20 CAG/START, oraz linię 120 CAG/START odzwierciedlającą toksyczność, zarówno RNA i białka, oraz linię 120 CAG/STOP obrazującą potencjalną toksyczność RNA.

Jedną z oznak patogenezy SCA3, którą można obserwować w modelach komórkowych, jest obecność agregatów białkowych tworzonych przez zmutowane białko. Uważane są one za główny element toksyczności ciągu poliQ, ze względu na ich zdolność do sekwestracji różnych białek, w wyniku czego dochodzi do zaburzenia wielu szlaków komórkowych regulowanych przez te białka (Matos *et al.*, 2011). Analizy wykonane po trzech dniach indukcji ekspresji transgenu wykazały obecność agregatów jedynie w linii 120 CAG/START, co jest obrazem oczekiwanym, jakkolwiek procent komórek zawierających inkluzje był niewielki. Po wydłużeniu czasu ekspresji transgenu do sześciu dni, agregaty białkowe zaobserwowano w ponad trzykrotnie większej liczbie komórek, jednak w dalszym ciągu było to jedynie 1,5% (Ryc. 23). Otrzymane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi opisującymi częstość występowania inkluzji tworzonych przez zmutowaną ataksynę-3 w modelach komórkowych. W modelach z ekspresją krótkich fragmentów ataksyny-3 obserwuje się większą ilość komórek zawierających agregaty w porównaniu z modelami w których dochodzi do ekspresji pełnej długości ataksyny-3. Transfekcja komórek mysiej neuroblastomy plazmidem kodującym C-końcowy fragment ataksyny-3 z 71 powtórzeniami CAG powodowała utworzenie się agregatów po 24 godzinach w 99% komórek, natomiast transfekcja plazmidem kodującym pełnej długości białko w zaledwie 9% komórek (Haacke *et al.*, 2006). Z kolei w komórkach HEK293T, po trzech dniach ekspresji pełnej długości ataksyny-3 z ciągiem 148 CAG, 0,4% komórek zawierało agregaty (Sowa *et al.*, 2018). Co więcej, w przypadku ekspresji pełnej długości ataksyny-3 niektórzy badacze w ogóle nie obserwują agregacji tego białka, jak miało to miejsce w linii SH-SY5Y z ekspresją ataksyny-3 z 83 powtórzeniami CAG (Neves-Carvalho *et al.*, 2015). Ponadto, nawet bardzo długa ekspresja białka zawierającego ciągu poliQ nie powoduje pojawienia się agregatów w przeważającej liczbie komórek. Po trwającej aż trzy miesiące ekspresji huntingtyny z 72 powtórzeniami CAG badacze obserwowali agregaty w 25% komórek HEK293 (Lu *et al.*, 2015). Ponadto, należy wziąć pod uwagę, że pojawienie się inkluzji tworzonych przez zmutowaną ataksynę-3 w mysich modelach choroby SCA3 zajmuje, w zależności od modelu, nawet 12 miesięcy, a minimalny czas po którym były one obserwowane w tego typu modelach wynosił około 10 tygodni (Ramani *et al.*, 2015; Switonski *et al.*, 2015). Z drugiej strony pokazano, że agregacja pełnej długości zmutowanej ataksyny-3 może zostać zaindukowana przez transfekcję komórek wektorami kodującymi krótkie

fragmenty ataksyny-3, zawierające wydłużony ciąg poliQ (Nguyen *et al.*, 2013). Obecnie postuluje się, że powstające w komórkach pacjentów, w wyniku cięcia zmutowanej ataksyny-3 przez kalpainy, krótkie fragmenty białka mogą służyć jako katalizator lub ognisko dla agregacji pełnej długości białka. (Schmidt *et al.*, 2002; Hubener *et al.*, 2013; Simoes *et al.*, 2012). Podsumowując, jak do tej pory nie jest jasne czy obserwowane w komórkach pacjentów SCA3 inkluzje są formowane przez pełnej długości czy krótkie fragmenty zmutowanego białka. Agregacja ataksyny-3 jest niezwykle złożonym procesem, który prawdopodobnie zależy od czasu jak i rodzaju komórek w których dochodzi do ekspresji zmutowanego białka. Ponadto na szybkość agregacji wydaje się mieć też wpływ długość ciągu poliQ, co pokazano zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (Teixeira-Castro *et al.*, 2011; Streets *et al.*, 2013).

W ramach tej pracy powyższe modele badano również pod kątem tworzenia przez zmutowany transkrypt ataksyny-3 charakterystycznych struktur jądrowych, tzn. skupień RNA, które są jedną z dobrze udokumentowanych oznak toksyczności RNA w chorobach DM1, DM2 i C9ALS/FTD (Zhang and Ashizawa, 2017). Pomimo obecności dużych ilości transkryptu ataksyny-3 na terenie jądra komórkowego nie obserwowano skupień RNA w liniach 120 CAG/START i 120 CAG/STOP, w których ekspresji ulegał zmutowany transkrypt ataksyny-3. Nasuwają się zatem pytania czy skupienia RNA występują w SCA3, czy może są tylko nieobecne w wyprowadzonych modelach? Do tej pory jedynymi doniesieniami opisującymi skupienia RNA w komórkach z ekspresją zmutowanej ataksyny-3 są badania wykonane wcześniej w ZBM (Mykowska *et al.*, 2011; Urbanek *et al.*, 2016). W tych badaniach, w celu identyfikacji struktur jądrowych zastosowano technikę FISH i sondy skierowane na region powtórzeń. Strategia ta jest powszechnie stosowana do wizualizacji skupień RNA w innych chorobach związanych z ekspansją sekwencji powtórzonej, w tym DM1 czy C9ALS/FTD (Ho *et al.*, 2005; Cooper-Knock *et al.*, 2015; Xia and Ashizawa, 2015). Ponadto, za jej pomocą identyfikowano skupienia RNA także w modelach komórkowych choroby Huntingtona (Sun *et al.*, 2015; Rué *et al.*, 2016). Jednak obecnie, po zastosowaniu bardziej czulej metody jaką jest smFISH przypuszczamy, że obserwowane w poprzednich badaniach struktury mogą być artefaktami, wynikającymi z niewystarczającej specyficzności sond rozpoznających powtórzenia CAG w ataksynie-3. W porównaniu do SCA3, długość ciągów powtórzeń identyfikowana w chorobach DM1, DM2 i C9ALS/FTD może wynosić nawet tysiące, jak w przypadku DM1, gdzie liczba ta dochodzi nawet do 4 500 (Zhang and Ashizawa, 2017; Sznajder *et al.*, 2019). Stąd możliwe, że zastosowanie sond rozpoznających region powtórzeń sprawdza się tylko w przypadku skupień jądrowych tworzonych przez transkrypty, zawierające wystarczająco długi ciąg powtórzeń, bowiem w takim przypadku liczba związanych sond jest



na tyle wysoka, że daje specyficzny sygnał. Ponadto, powyższe obserwacje mogą również wskazywać, że zdolność transkryptu do tworzenia skupień RNA w komórce jest ściśle uzależniona od długości sekwencji powtórzonej, bowiem im dłuższy region powtórzeń tym struktura typu spinki tworzona przez powtórzenia może być bardziej stabilna. Zmutowany transkrypt ataksyny-3 w przeciwieństwie do zmutowanego transkryptu *DMPK* obecnego w DM1 zawierał 120 powtórzeń CAG, co prawdopodobnie tłumaczy nie powstawanie tych struktur. Ponadto, jak wykazano w przypadku agregatów zmutowanego białka ataksyny-3 nie jest wykluczone, że pojawienie się skupień RNA jest uzależnione od czasu i typu komórek. Jak do tej pory nie badano też obecności tych struktur w skrawkach tkanki mózgowej pochodzącej od pacjentów ze SCA3. Reasumując, kwestia obecności skupień RNA w SCA3 i ich rola w patogenezie tej choroby pozostaje nierozstrzygnięta. Na podstawie danych literaturowych nie jest wykluczone, że zmutowany transkrypt ataksyny-3 działa poprzez inne mechanizmy. Znane są patogenne oddziaływania toksycznego RNA nie związane z sekwestracją białek do skupień jądrowych, takie jak deregulacja transkrypcji w C9ALS/FTD, indukcja stresu jądrowego w SCA3, RAN translacja w DM1, przesunięcie ramki odczytu w HD czy rekrutacja kompleksu MID1 w chorobach związanych z ekspansją powtórzeń CAG (Tsoi *et al.*, 2012; Haeusler *et al.*, 2014; Wojciechowska *et al.*, 2014; Griesche *et al.*, 2016; Gourdon and Meola, 2017). Możliwe więc, że istnieje więcej tego typu interakcji w wyniku których transkrypt zaburza funkcjonowanie komórki. Obecnie w ZBM trwają badania, mające na celu identyfikację białek wiążących się do powtórzeń CAG.

Białko zmutowanej ataksyny-3 zawierające wydłużony ciąg poliQ wywołuje cały szereg zaburzeń, które mogą prowadzić do śmierci komórki, co jest przyczyną obserwowanej neurodegeneracji u pacjentów SCA3 (Evers *et al.*, 2014; Matos *et al.*, 2018; Nóbrega *et al.*, 2018). Stąd postanowiono sprawdzić, czy w wyprowadzonych w niniejszej pracy modelach komórkowych dochodzi do aktywacji procesu apoptozy. Wpływ zmutowanego białka i transkryptu na apoptozę badano analizując obecność ciętej kaspazy-3, powszechnie stosowanego markera aktywacji procesu programowanej śmierci komórki. Przeprowadzone badania pokazały, że do indukcji tego procesu doszło w niewielkim procencie komórek we wszystkich badanych liniach. Zaobserwowano istotnie statystycznie większą ilość sygnałów pochodzących od ciętej kaspazy-3 w linii 120 CAG/START względem linii 20 CAG/START i 120 CAG/STOP. Nie zaobserwowano natomiast różnic między linią 120 CAG/STOP a linią komórkową 20 CAG/START. W zależności od użytego układu eksperymentalnego obserwuje się bardzo różne poziomy wzrostu ilości ciętej kaspazy-3 (Liu *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2017). W komórkach mysich fibroblastów zarodkowych (MEF, ang. mouse embryonic fibroblast) nie

obserwowano indukcji apoptozy, z kolei w szczurzych neuronach ekspresja pełnej długości ataksyny-3 z ciągiem 79 CAG dawała tak duże zmiany, że poziom ciętej kaspazy-3 mógł być analizowany za pomocą metody Western blot (Chou *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2016). Natomiast w komórkach SH-SY5Y stabilna ekspresja ataksyny-3 w trakcie 7 dni różnicowania spowodowała wzrost śmiertelności o 7%. Tymczasem ekspresja C-końcowego fragmentu tego białka przez 48 godzin w komórkach mysiej neuroblastomy spowodowała wzrost śmiertelności o 5% (Neves-Carvalho *et al.*, 2015; Hsu *et al.*, 2017). Największe obniżenie przeżywalności (o 55%) obserwowano w szczurzych komórkach CSM14.1 zróżnicowanych do fenotypu neuronalnego gdzie indukowano ekspresję ataksyny-3 z 70 powtórzeniami CAG przez 26 dni. (Evert *et al.*, 1999). Powyższe dane świadczą to o tym, że do obserwacji dużego obniżenia przeżywalności komórek potrzebny jest stosunkowo długi czas ekspresji zmutowanej ataksyny-3. Co więcej, można przypuszczać, że wpływ zmutowanej ataksyny-3 na apoptozę zależy również od typu komórek. Co ciekawe, w niniejszej pracy nie zaobserwowano indukcji apoptozy w linii z ekspresją jedynie zmutowanego transkryptu. Możliwe zatem, że sama obecność toksycznego RNA nie kieruje komórki na drogę apoptozy albo indukuje inne szlaki niezależne od kaspazy-3 (Lopez-Meraz *et al.*, 2010).

Indukcja stresu retikulum endoplazmatycznego i zaburzenia UPS są jednym z mechanizmów prowadzących do rozwoju SCA3 (Chai *et al.*, 1999; Fardghassemi *et al.*, 2017). Jest to głównie związane z obecnością nieprawidłowo sfałdowanej zmutowanej ataksyny-3, jak i tworzenia przez nią agregatów białkowych (Chai *et al.*, 1999; Jäger *et al.*, 2012; Pereira, 2013; Roussel *et al.*, 2013). Stres retikulum endoplazmatycznego jest monitorowany przez trzy różne białka transmembranowe umieszczone w błonie retikulum endoplazmatycznego: IRE1 (enzym zależny od inozytolu), PERK (kinaza białkowa) i ATF6 (czynn timeranskrypcyjny 6) (Zhang, 2015). Każdą z tych ścieżek sygnałowych można monitorować za pomocą określenia poziomu ekspresji odpowiednich genów. Dla ścieżki IRE1 jest to *EDEM* (koduje białko opiekuńcze retikulum endoplazmatycznego) i alternatywny splicing *XBPI* (koduje czynnik transkrypcyjny), dla ścieżki PERK jest to *ATF4* (koduje czynnik transkrypcyjny 4) i *CHOP* (koduje białko opiekuńcze), a dla ścieżki ATF6 jest to *Grp78* (koduje białko opiekuńcze) i *CHOP* (Osłowski, 2012). Przeprowadzone w niniejszej pracy analizy pokazały, że w linii 120 CAG/START istotnie statystycznie podniesiony był jedynie poziom ekspresji *Grp78*. Wynik ten mógłby świadczyć o aktywacji ścieżki zależnej od ATF6, jednak ze względu na to, że poziom ekspresji *CHOP* był nieznacznie podniesiony, nie jest jasne, czy w tej linii dochodzi do indukcji powyższego szlaku. Interesujące wyniki otrzymano dla linii 120 CAG/STOP, gdzie istotnie wzrósł poziom ekspresji genów *CHOP*, *Grp78* i *EDEM*, wskazując na aktywację ścieżki

zależnej od ATF6. Wcześniejsze badania pokazały, że ekspresja ataksyny-3 zawierającej ciąg 89 CAG powodowała u nicieni zwiększenie się ilości białka Grp78 (Fardghassemi *et al.*, 2017). Tymczasem ekspresja pierwszego egzonu huntingtyny, zawierającego ciąg 96Q, w komórkach HEK293 przez 30 godzin spowodowała aktywację wszystkich trzech ścieżek sygnałowych stresu retikulum endoplazmatycznego. Zaobserwowano zmieniony splicing *XBPI*, wzrost poziomu fosforylacji białka eIF2 $\alpha$  (indykator aktywacji ścieżki PERK), jak i zwiększoną ilość ciętego białka ATF6 (Leitman *et al.*, 2013). Analizy wykonane w niniejszej pracy w linii 120 CAG/START wydają się być zgodne z obserwacjami przeprowadzonymi na nicieniach, natomiast nie obserwowano aktywacji tych samych szlaków, jak w przypadku huntingtyny. Może to świadczyć o tym, że stres retikulum endoplazmatycznego powodowany przez ekspresję ataksyny-3 i huntingtyny jest inicjowany przez różne ścieżki.

Badania pokazują, że nie tylko obecność nieprawidłowo sfałdowanych białek może indukować stres retikulum endoplazmatycznego. Okazało się bowiem, że obecność zmutowanego transkryptu *DMPK* może również aktywować ten proces. Zwiększoną ilość białka Grp78 odnotowano we fragmentach tkanki mięśniowej pobranej od pacjentów DM1 (Ikezoe *et al.*, 2007). Ponadto, w komórkach mioblastów pacjentów DM1 zróżnicowanych do miotubul obserwowano podniesiony poziom ekspresji genów *CHOP* i *Grp78* (Botta *et al.*, 2013). Nie poznano natomiast roli jaką odgrywa w tych obserwacjach zmutowany transkrypt *DMPK*. Badacze postulują, że jego obecność może indukować stres retikulum endoplazmatycznego przez zaburzenia splicingu genów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy jonów wapnia, co prowadziłoby do deregulacji ich stężenia (Botta *et al.*, 2013). Co ważne, zakłócenie homeostazy jonów wapnia jest jednym z postulowanych mechanizmów patogenezы SCA3 (Chen *et al.*, 2008, Zhivotovsky and Orrenius, 2011). Rezultaty eksperymentów przeprowadzonych w linii 120 CAG/STOP wydają się być zbieżne z obserwacjami poczynionymi przez Botta i współpracowników (Botta *et al.*, 2013). Teoretycznie obecność zmutowanego transkryptu ataksyny-3 mogłaby wpływać na ilość lub prawidłowe funkcjonowanie białek opiekuńczych, przez co w komórce podnosiłby się ogólny poziom białek nieprawidłowo sfałdowanych. Jednak powyższe hipotezy wymagają eksperymentalnego potwierdzenia.

Reasumując, molekularna charakterystyka wyprowadzonych modeli SCA3 wskazuje, że obrazują one wczesne etapy patogenezы tej choroby. Świadczy o tym zarówno obserwowany poziom tworzenia się agregatów białkowych, jak i analizy apoptozy i stresu retikulum endoplazmatycznego. Wydaje się zatem, że otrzymane modele stanowią idealny układ do badań molekularnych mechanizmów stojących u podstaw rozwoju SCA3.

### **5.2 Poszukiwanie nowych markerów toksyczności i ścieżek patogenezы RNA przy użyciu globalnych analiz transkryptomycznych i proteomicznych**

Do tej pory postulowanymi markerami toksyczności RNA w chorobach poliQ, w tym w SCA3, były między innymi skupienia RNA, zmiany alternatywnego splicingu i markery stresu jąderkowego (Chan, 2014; Ciesiolka *et al.*, 2017; Coyne *et al.*, 2017). Jednak wiele z przeprowadzonych badań nad rolą RNA w chorobach poliQ zostało wykonanych na modelach, w których nakładały się na siebie efekty wywołane przez zmutowane białko i transkrypt (Fischer and Krzyzosiak, 2013; Schmidt and Schmidt, 2018). Kwestionuje to wiarygodność wskazanych markerów toksyczności RNA. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy nie potwierdziły niektórych zidentyfikowanych we wcześniejszych badaniach markerów toksyczności zmutowanego transkryptu. Stąd, aby wyłonić nowych kandydatów przez których faktycznie może działać RNA postanowiono wykonać analizy transkryptomyczne i proteomiczne w wyprowadzonych modelach SCA3. Takie podejście daje możliwość globalnego zidentyfikowania wszelkich zmian jakie mają miejsce w komórce pod wpływem ekspresji poszczególnych transgenów. Ponadto integracja otrzymanych danych pozwala na otrzymanie pełnego obrazu efektów za jakie może być odpowiedzialny transkrypt zmutowanej ataksyny-3. Wywoływane zmiany powinny być obserwowane w linii 120 CAG/STOP i mieć także odzwierciedlenie w linii 120 CAG/START, gdzie również obecny jest transkrypt. Stąd potencjalnych kandydatów poszukiwano przez identyfikację genów/białek, których poziom ekspresji/ilość ulegał zmianie w obydwu powyższych liniach. Przeprowadzone następnie analizy ontologiczne otrzymanych danych transkryptomycznych i proteomicznych wskazały szereg procesów za których zaburzenie może być potencjalnie odpowiedzialny zmutowany transkrypt ataksyny-3. Zidentyfikowanych kandydatów mogących być markerami toksyczności RNA w patogenezы SCA3 omówiono poniżej.

Przeprowadzone analizy pokazały, że obecność transkryptu zmutowanej ataksyny-3 podnosi poziom ekspresji genów i ilości białek odpowiedzialnych za procesy związane z rozwojem układu nerwowego, a w szczególności aksonogenezę. Wśród 20 genów o podwyższonym poziomie ekspresji były geny kodujące czynniki transkrypcyjne, receptory transmembranowe i białka adhezyjne (Tab. 10). Z kolei w analizach proteomicznych wykryto podwyższone ilości białek RET, DCX i MAPK8IP3. Białko RET jest receptorem transmembranowym odgrywającym ważną rolę w rozwoju systemu nerwowego, natomiast DCX kieruje migracją neuronów przez regulację organizacji i stabilności mikrotubul. Z kolei MAPK8IP3 stymuluje elongację aksonów i jest ważne dla ich regeneracji. Co ważne,

podwyższony poziom ekspresji genów kodujących białka RET i DCX zaobserwowano również w analizach transkryptomicznych. Wydaje się zatem, że mogą one być silnymi kandydatami na markery toksyczności RNA. Deregulacja procesów w których udział biorą powyższe geny i białka przez transkrypt zmutowanej ataksyny-3 mogłaby zatem zaburzać rozwój układu nerwowego i przyczyniać się w ten sposób do patogenezy SCA3. Obecnie istnieje relatywnie niewiele danych opisujących globalne analizy modeli SCA3. Większość wykonanych wcześniej analiz przeprowadzono na mysich modelach SCA3, w których ekspresji ulegał zarówno transkrypt jak i białko zmutowanej ataksyny-3 (Chou *et al.*, 2008; Toonen *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2018; Wiatr *et al.*, 2019; Chuang *et al.*, 2019). Ponadto, jak do tej pory nie przeprowadzono globalnych analiz badających toksyczność RNA. W badaniach transkryptomu myszy, w których ekspresji ulegała ataksyna-3 zawierająca 77 CAG zaobserwowano, że zaburzeniu ulegają ścieżki sygnałowe CREB (odpowiedzialna za plastyczność synaptyczną) i  $\alpha$ -adrenergiczna (jej receptory związane są z częścią współczulną autonomicznego układu nerwowego). Z kolei w prążkowie tych myszy zaobserwowano zmienione procesy kierowywania aksonów oraz przekazywania sygnału między synapsami za pomocą neurotransmiterów (Lodewijk J A Toonen *et al.*, 2018). Ponadto, w komórkach Purkinjego myszy z ekspresją C-końcowego fragmentu ataksyny-3 z 69 powtórzeniami CAG, obserwowano zaburzenia procesu rozwoju dendrytów (Konno *et al.*, 2014). W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy część z obserwacji pokrywa się. Zarówno w badanych liniach, jak i wspomnianych powyżej badaniach, zaobserwowano zmiany w procesach kierowywania aksonów i transportu pęcherzykowego, z których ten ostatni może mieć związek z przekazywaniem sygnału między synapsami. W żadnej z badanych linii nie zaobserwowano natomiast zmiany w innych procesach wskazanych u myszy, takich jak ścieżka CREB i  $\alpha$ -adrenergiczna czy biosynteza cholesterolu. Może to być związane z tym, że powyższe badania zostały przeprowadzone na 17-miesięcznych zwierzętach w których, obecne były najprawdopodobniej późniejsze etapy patogenezy natomiast, jak pokazała charakterystyka molekularna, wyprowadzone w niniejszej pracy modele SCA3 odzwierciedlają wczesne etapy rozwoju tej choroby. Przypuszczenia te mogą być poparte badaniami transkryptomu młodych myszy Ki91 gdzie nie wykrywano żadnych zmian w transkryptomie tych zwierząt (Wiatr *et al.*, 2019).

Zachowanie homeostazy jonów wapnia ma niezwykle ważne znaczenie w rozwoju układu nerwowego. Miejscowe zwiększenie ich stężenia hamuje rozwój stożków wzrostu, co negatywnie wpływa na aksonogenezę (Zheng, 2000). Z przeprowadzonych analiz wynika, że obecność zmutowanego transkryptu może zakłócać homeostazę jonów wapnia. W analizach transkryptomicznych zaobserwowano obniżony poziom ekspresji genów *S100A6*, *S100A10* i

*S100A16*, kodujących białka wiążące wapń. Z kolei porównanie profili białkowych badanych linii wykazało zmniejszone ilości białek CARL oraz *S100A11*, które również wiążą jony wapnia. Zmiany stężenia jonów wapnia mają negatywny wpływ na funkcjonowanie komórek neuronalnych, gdyż zaburzają uwalnianie neurotransmiterów, wzrost neurytów i plastyczność synaptyczną. Obniżenie poziomu białek wiążących wapń mogłoby powodować wzrost i utrzymywanie się wysokiego stężenia wapnia w cytoplazmie komórki, a w konsekwencji indukować cytotoksyczne mechanizmy, takie jak permeabilizacja mitochondriów, stres oksydacyjny, zaburzenia funkcjonowania cytoszkieletu i aktywacja białek zależnych od wapnia – np. kalpajny (Zhivotovsky and Orrenius, 2011). Zaburzenia homeostazy wapnia są obecnie postulowane jako jeden z patomechanizmów prowadzących do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona (Marambaud *et al.*, 2009; Bezprozvanny, 2010; Pchitskaya *et al.*, 2018). Co ważne w komórkach Purkinjego myszy z ekspresją C-końcowego fragmentu ataksyny-3 z 69 powtórzeniami CAG obserwowano obniżenie poziomu receptora  $ROR\alpha$ , który wpływa na ekspresję genów biorących udział w ścieżkach przekazywania sygnału zależnych od wapnia (Konno *et al.*, 2014). Zaproponowany mechanizm deregulacji homeostazy jonów wapnia dla *SCA3* obejmuje również wiązanie się zmutowanego białka do *Insp3R1* – wewnątrzkomórkowego kanału wapnia obecnego w retikulum endoplazmatycznym i zwiększenie w ten sposób uwalniania jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego (Chen *et al.*, 2008). Analogiczny mechanizm postulowany jest też dla zmutowanej huntingtyny (Bezprozvanny, 2010; Pchitskaya *et al.*, 2018). Jednak do tej pory nie przypisano udziału transkryptu zmutowanej ataksyny-3 w tym mechanizmie. Tymczasem zaobserwowano, że w komórkach mioblastów pacjentów *DM1* zróżnicowanych do miotubul dochodzi do zaburzenia homeostazy jonów wapnia i zmian w splicingu genów kodujących białka je transportujące. Nie znany jest natomiast mechanizm przez jaki transkrypt *DMPK* powoduje powyższe zmiany (Botta *et al.*, 2013). Na podstawie wyników uzyskanych w nieniejszej pracy, wydaje się, że obecność transkryptu zmutowanej ataksyny-3 prowadzi do obniżenia poziomu ekspresji genów regulujących homeostazę jonów wapnia, przez co komórki dotknięte *SCA3* nie radzą sobie ze zwiększonym stężeniem wapnia, co w konsekwencji prowadzi do ich śmierci (Zhivotovsky and Orrenius, 2011). Możliwy jest również scenariusz w którym białko i transkrypt działają kooperatywnie uzupełniając swoje działania.

Ciekawymi kandydatami toksyczności RNA wydają się być białka *SACS* i *HMGB1*. Co istotne, zgodnie z analizami proteomicznymi, zaobserwowano również obniżony poziom ekspresji genu kodującego białko *SACS*, natomiast wzrost ilości *HMGB1* wykazano jedynie w

analizach profili białkowych. Białko SACS ulega ekspresji na wysokim poziomie w centralnym układzie nerwowym. Z kolei białko HMGB1 bierze udział w regulacji transkrypcji oraz wiążąc się do białka RAGE stymuluje wzrost neuronów. Ponadto postuluje się, że obydwa białka chronią komórkę przed toksycznością związaną z białkami poliQ (Parfitt *et al.*, 2009; Min *et al.*, 2013). Pokazano, że białko HMGB1 znajduje się w agregatach tworzonych przez białko TBP w SCA17. Możliwe więc, że w modelu z ekspresją białka zmutowanej ataksyny-3 zmniejszająca się pula wolnego białka HMGB1 indukuje mechanizmy zwrotne podnoszące jego ekspresję (Lee *et al.*, 2014). Dlaczego więc ekspresja zmutowanego transkryptu ataksyny-3 wpływa na poziom białek SACS i HMGB1? Czy możliwe jest, że zmutowany transkrypt hamuje mechanizmy komórki chroniące ją przed toksycznym białkiem?

Kolejne markery toksyczności RNA w SCA3 wytypowano na podstawie jedynie analiz transkryptomicznych. Zaobserwowano bowiem, że obecność transkryptu zmutowanej ataksyny-3 prowadziła do obniżenia poziomu ekspresji genów kodujących aktywatory ścieżek sygnałowych Wnt: *WNT2B* (kanoniczna ścieżka Wnt) i *WNT5A* (niekanoniczna ścieżka Wnt), co potencjalnie może prowadzić do zaburzenia kontrolowanych przez nie procesów. Kanoniczny szlak Wnt odpowiada za aktywację czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów odpowiedzialnych za procesy rozwojowe organizmu. Wnt2b koduje sekretoryjne białko sygnałowe i odpowiada za utrzymanie pluripotencji progenitorów neuronalnych podczas embriogenezy (Katoh, 2005). Natomiast niekanoniczna ścieżka zależna od Wnt5a odgrywa kluczową rolę przy tworzeniu się nowych kolców dendrytycznych w ośrodkowym układzie nerwowym i dystrybucji do nich mitochondriów (Arrázola *et al.*, 2015). Ponadto, obecnie postuluje się o protekcyjnej roli ścieżek Wnt w chorobie Alzheimera (Harvey and Marchetti, 2014). Aktywacja kanonicznej ścieżki Wnt okazała się znosić toksyczność  $\beta$ -amyloidu wobec komórek neuronalnych przez zapobieganie ich apoptozie, jednak dokładny mechanizm jej działania nie został jeszcze określony (Alvarez *et al.*, 2004; Silva-Alvarez *et al.*, 2013). Z kolei podanie ligandu Wnt5a neuronom traktowanym  $\beta$ -amyloidem powstrzymywało spadek a nawet prowadziło do zwiększenia się liczby ich mitochondriów w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Na podstawie tych badań autorzy postulują, że ścieżka Wnt posiada funkcje ochronne lub stymuluje podziały mitochondriów, co umożliwiłoby komórkom utrzymanie ich prawidłowej ilości (Silva-Alvarez *et al.*, 2013; Arrázola *et al.*, 2015). Co ciekawe, deregulacja funkcjonowania mitochondriów została także zaproponowana jako jeden z patomechanizmów SCA3 (Yu *et al.*, 2009; Bonanomi *et al.*, 2015). W oparciu o wykonane w niniejszej pracy analizy transkryptomiczne można stwierdzić, że zmutowany transkrypt mógłby przyczyniać się do powyższego patomechanizmu przez zaburzenie szlaku Wnt zależnego od

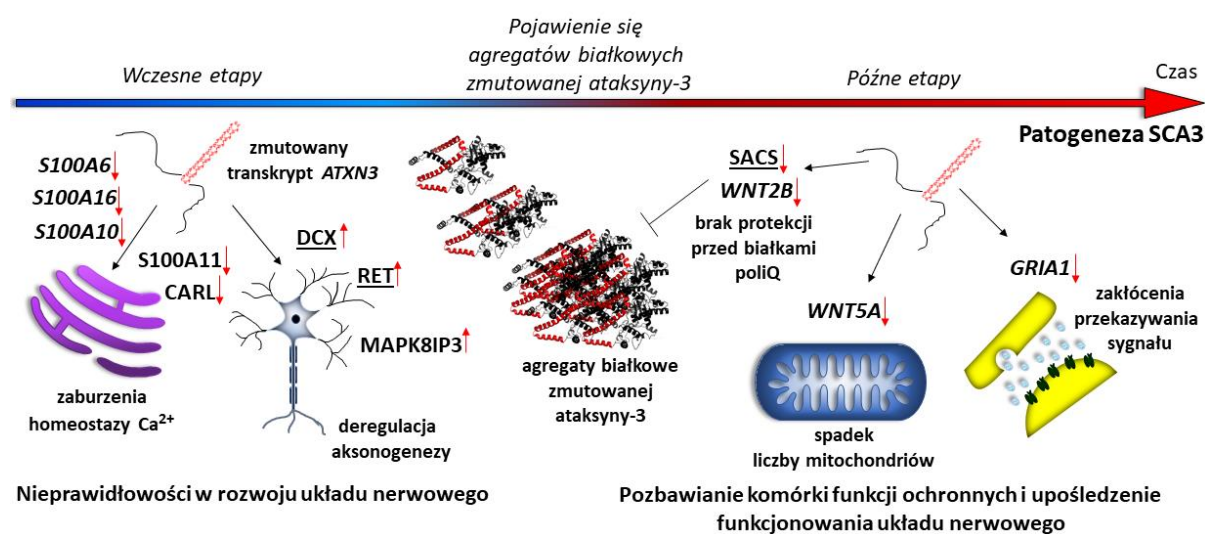
Wnt5a. Co ciekawe, podobne obserwacje odnośnie szlaków Wnt co w niniejszej pracy zostały poczynione w eksperymentach na komórkach MEF z wyciszonym genem ataksyny-3, gdzie również obserwowano obniżenie poziomu ekspresji *WNT5A* (Zeng *et al.*, 2018). Ta zbieżność mogłaby świadczyć o tym, że obecność zmutowanego transkryptu zaburza procesy regulowane przez normalne białko ataksyny-3 w komórce. Ponadto Zeng i współpracownicy obserwowali w swoich badaniach podwyższony poziom ekspresji inhibitorów szlaku Wnt: *Apcdd1* i *Sfrp1* (Zeng *et al.*, 2018). Co ciekawe, w linii 120 CAG/START nie wykryto istotnie statystycznie zmienionego poziomu *Sfrp1*, natomiast w linii 120 CAG/STOP był on istotnie obniżony, co może świadczyć o tym, że za obserwowaną zaburzoną regulację ścieżki Wnt odpowiada inny mechanizm niż ten zaobserwowany w komórkach MEF. Reasumując, powyższe dane mogą świadczyć o tym, że transkrypt zmutowanej ataksyny-3 może przyczyniać się do wywoływania negatywnych efektów na układ nerwowy przez deregulację ścieżek Wnt, jednak aby to potwierdzić niezbędne są odpowiednie eksperymenty walidacyjne.

Innym obiecującym kandydatem może być gen *GRIA1* kodujący podjednostkę pobudzającego receptora glutaminowego dla neurotransmiterów. Zaburzoną regulację ścieżki przekazywania sygnału zależnej od glutaminianu obserwowano zarówno w modelach mysich jak i komórkowych SCA3 (Chou *et al.*, 2008; Toonen *et al.*, 2018; Chuang *et al.*, 2019). Ponadto pokazano, że w komórkach iPSC, wyprowadzonych z fibroblastów od pacjentów SCA3, pod wpływem glutaminianu dochodzi do obniżenia poziomu ekspresji genów kodujących podjednostki receptorów glutaminianu, w tym *GRIA1* (Chuang *et al.*, 2019). *GRIA1* jest związany ze ścieżką transportu pęcherzykowego i jego obniżenie może zaburzać przekazywanie sygnału między neuronami upośledzając w ten sposób działanie układu nerwowego.

Podsumowując, w niniejszej pracy otrzymano modele komórkowe umożliwiające określenie roli jaką odgrywa transkrypt zmutowanej ataksyny-3 w patogenezie SCA3. Przeprowadzona charakterystyka molekularna pokazała, że stanowią one obraz wczesnych etapów rozwoju tej choroby. Wykonane analizy transkryptomyczne i proteomiczne wyprowadzonych modeli SCA3 pozwoliły na wytypowanie potencjalnych kandydatów przez których może działać zmutowany transkrypt ataksyny-3. Na podstawie otrzymanych wyników można przypuszczać, że toksyczny RNA zaburza procesy związane z rozwojem układu nerwowego, a w szczególności aksonogenezę (Ryc. 54). Zaobserwowano również obniżenie poziomu ekspresji genów i ilości białek wiążących wapń co może świadczyć o zaburzeniach homeostazy jonów wapnia. Co więcej, toksyczny transkrypt może zaburzać ścieżki przekazywania sygnału między neuronami przez obniżenie poziomu podjednostek receptorów



pobudzających dla neurotransmiterów. Ponadto wydaje się, że zmutowany RNA pozbawia komórki neuronalne mechanizmów ochronnych przed toksycznym białkiem ataksyny-3 w wyniku obniżenia poziomu ekspresji aktywatorów ścieżek Wnt i ilości białka SACS (Ryc. 54). W związku z powyższym, zmutowany RNA może być odpowiedzialny za molekularne mechanizmy wczesnych etapów SCA3, natomiast później, gdy dochodzi do wytworzenia się agregatów białkowych jego rola polegałaby zapewne na kooperatywnym działaniu z toksycznym białkiem (Ryc. 49).



**Rycina 49. Proponowany mechanizm działania zmutowanego transkryptu w patogenezie SCA3.** Kandydaci wytypowani zarówno w analizach transkryptomycznych jak i proteomicznych zostali podkreśleni. Czerwonymi strzałkami zaznaczono zmianę poziomu ekspresji genów i ilości białek.

### 5.3 Perspektywy

Zidentyfikowane w oparciu o globalne analizy transkryptomiczne i proteomiczne procesy, ulegające deregulacji w obecności zmutowanego transkryptu ataksyny-3 stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych badań nad rolą RNA w patogenezie SCA3. Planowane jest zwalidowanie otrzymanych wyników na pełnym zestawie wyprowadzonych modeli. Istotne będzie wykorzystanie modelu, zawierającego długie ciągi CAA, który obrazuje toksyczność wyłącznie białka ataksyny-3. Interesującymi wynikami w tych eksperymentach byłoby zaobserwowanie zidentyfikowanych wcześniej zmian w linii obrazującej toksyczność RNA i linii odzwierciedlającej toksyczność RNA i białka, a ich brak w modelu opisującym toksyczność samego białka. Świadczyłoby to o tym, że za deregulację danego procesu odpowiada wyłącznie zmutowany transkrypt ataksyny-3. Co więcej, wyprowadzony zestaw

modeli umożliwia również badanie toksyczności białka w patogenezie SCA3, która mimo iż lepiej poznana niż toksyczność RNA, w dalszym ciągu nie jest do końca wyjaśniona.

Ponadto w niniejszej pracy opracowano protokół, umożliwiający różnicowanie komórek SH-SY5Y w kierunku komórek neuronalnych, co pozwala na analizę toksyczności RNA w bardziej złożonym układzie modelowym. Otwiera to nowe możliwości do badań udziału zmutowanego transkrypty ataksyny-3 w patogenezie SCA3. W przyszłości planowane jest przeprowadzenie eksperymentów walidujących wyniki otrzymane w analizach transkryptomicznych i proteomicznych na zróżnicowanych komórkach SH-SY5Y.

### 6. Streszczenie

SCA3 jest jedną z najpowszechniej występujących ataksji i należy do grupy chorób poliQ. Do niedawna uważano, że choroby poliQ, w tym SCA3, są powodowane tylko przez patogenne białko, zyskujące w wyniku mutacji toksyczne funkcje, a w mniejszym stopniu przez utratę funkcji normalnego białka. Jednakże, coraz więcej doniesień sugeruje, że oprócz toksyczności białka w patomechanizm chorób poliQ może być zaangażowany także transkrypt zawierający wydłużone ciągi CAG. Większość z przeprowadzonych dotychczas badań została wykonana na modelach komórkowych, w których nakładały się na siebie efekty wywołane przez zmutowane białko i transkrypt, co uniemożliwiało określenie faktycznej roli zmutowanego RNA w rozwoju SCA3. W związku z powyższym toksyczność transkryptu ataksyny-3 w dalszym ciągu stanowi niewyjaśniony aspekt patogenezы tej choroby.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było poszukiwanie ścieżek patogenezы przez które może działać zmutowany transkrypt ataksyny-3, w nowo wygenerowanych modelach komórkowych SCA3, umożliwiającą odróżnienie toksyczności RNA od białka.

Stabilne i izogeniczne modele komórkowe SCA3, z indukowaną doksycykliną ekspresją pełnej długości transkryptu ataksyny-3 ulegającego, bądź nieulegającego translacji i zawierającego powtórzenia CAG lub CAA o długości: patogenicznej (120 powtórzeń) i normalnej (20 powtórzeń), utworzono w linii neuroblastoma SH-SY5Y przy użyciu systemu Flp-in T-REx. Otrzymane linie komórkowe SCA3, w zależności od rodzaju modelu, charakteryzowały się wysokim poziomem ekspresji transkryptu i/lub białka ataksyny-3.

Dalsza charakterystyka wybranych modeli SCA3 metodą smFISH pokazała, że badany mRNA, obecny w bardzo dużej ilości cząsteczek w pojedynczej komórce, był zlokalizowany zarówno na terenie jądra komórkowego, jak i cytoplazmy. W żadnej z analizowanych linii zawierających zmutowane ciągi CAG, po względnie długim czasie od indukcji transkrypcji (3 i 6 dni), nie wykryto skupień RNA. W modelu z nadekspresją zmutowanego białka zaobserwowano charakterystyczne dla pacjentów z chorobą SCA3 agregaty tworzone przez zmutowaną ataksynę-3. Ponadto, w porównaniu do linii kontrolnej, sygnał pochodzący od ciętej kaspazy-3, świadczący o indukcji procesu apoptozy, był ponad dwukrotnie i półtorakrotnie wyższy, w odpowiednio komórkach z obecnością zmutowanego białka lub jedynie transkryptu ataksyny-3. W modelu z ekspresją nieulegającego translacji transkryptu zmutowanej ataksyny-3 zaobserwowano także podwyższony w stosunku do kontroli poziom wybranych markerów stresu retikulum endoplazmatycznego (*CHOP*, *GRP78* i *EDEM*).

## 6. Streszczenie

Przeprowadzone globalne analizy transkryptomyczne i proteomiczne modeli SCA3 wykazały, że ekspresja samego transkryptu zmutowanej ataksyny-3 powodowała podniesienie poziomu ekspresji genów oraz ilości białek związanych z rozwojem układu nerwowego, a w szczególności aksonogenezą. Jednocześnie zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji komponentów ścieżek Wnt, w tym ligandów *WNT5A* i *WNT5B*, oraz transportu pęcherzykowego i białek wiążących wapń. Ścieżki te mają również kluczowe znaczenie dla rozwoju układu nerwowego oraz są związane z prawidłowym funkcjonowaniem dojrzałego mózgu. Na podstawie tych analiz postawiono hipotezę, że zmutowany transkrypt ataksyny-3 może działać na wczesnych etapach rozwoju SCA3 upośledzając kluczowe dla rozwoju komórki procesy biologiczne.

W toku niniejszej pracy opracowano także protokół umożliwiający różnicowanie komórek SH-SY5Y, dzięki czemu nabierają one cech fenotypu neuronalnego. Umożliwia to w przyszłości badanie toksyczności RNA w bardziej złożonym układzie modelowym.

Reasumując, w niniejszej pracy doktorskiej wyprowadzono nowe modele komórkowe SCA3 pozwalające na określenie roli transkryptu ataksyny-3 w patogenezie tej choroby. Wytypowane na podstawie globalnych analiz transkryptomicznych i proteomicznych, deregulowane obecnością zmutowanego RNA, procesy biologiczne stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań nad rolą transkryptu ataksyny-3 w rozwoju SCA3.

## 7. Abstract

### „Role of RNA toxicity in pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3”

SCA3 is one of the most common ataxias and belongs to polyQ diseases. Until recently it was thought that polyQ diseases, including SCA3 are caused exclusively by mutated protein and the gain-of-function mechanism. However, raising number of reports suggest that in addition to the protein toxicity, transcript containing expanded CAG tracts may also contribute to the pathomechanism of polyQ diseases. Most of the studies carried out so far have been done on cellular models in which the protein and RNA toxicity overlapped each other which made it impossible to determine the actual role of mutant RNA in the development of SCA3. Therefore, the toxicity of the ataxin-3 transcript remains an unexplained aspect of the pathogenesis of this disease.

The main aim of this thesis was to search for novel pathways affected by mutated transcript of ataxin-3 that could lead to SCA3 pathogenesis. To address this, novel SCA3 cellular models were generated that allow to distinguish between RNA and protein toxicity.

Stable and isogenic cell models of SCA3, with doxycycline induced expression of full length ataxin-3 transcript which was translated or untranslated and contained CAG or CAA repeats of varying lengths: pathogenic (120 repeats) and normal (20 repeats) were created in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line using the Flp-in T-REx system. The obtained SCA3 cell lines, depending on the type of the model, had high levels of transcript and/or ataxin-3 protein.

Further characteristics of selected SCA3 models by the smFISH method showed that the examined mRNA, is present in a very large number of molecules in a single cell and is located both in the cell nucleus and in the cytoplasm. In none of the analyzed cell lines containing mutated CAG repeats, after relatively long time of transcription induction (3 and 6 days), no RNA foci were observed. However, in the model with overexpression of the mutant protein, aggregates formed by mutant ataxin-3, characteristic for patients with SCA3 disease, were observed. Moreover in comparison to the control cell line, signal from cleaved caspase-3, indicator of apoptosis process, was more than twice or one and a half times higher in cells expressing mutated protein or only the ataxin-3 transcript respectively. In the model expressing the untranslated transcript of mutant ataxin-3, in comparison to the control, increased levels of selected markers of endoplasmic reticulum stress response (*CHOP*, *GRP78* and *EDEM*) were observed.

The global transcriptomic and proteomic analysis of SCA3 models have shown that the expression of the mutant ataxin-3 transcript increases the levels of gene expression and the amount of proteins involved in the development of the nervous system, in particular axonogenesis. At the same time, lower expression levels of the Wnt pathways components were observed, including the *WNT5A* and *WNT5B* ligands, as well as vesicular transport and calcium-binding proteins. These pathways are crucial for the development of the nervous system and are associated with the normal functioning of the mature brain. Based on these analysis, it was hypothesized that the mutant transcript of ataxin-3 may act at the early stages of SCA3, impairing the key biological processes for normal neuronal cell development.

In the course of this thesis a protocol for the differentiation of SH-SY5Y cells was developed, enabling them to acquire the characteristics of a neuronal phenotype. This will allow to perform the studies of RNA toxicity in a more complex model system.

To summarize, in this thesis new SCA3 cell models were established, which enable to determine the role of the ataxin-3 transcript in the pathogenesis of SCA3. Identified by the global transcriptomic and proteomic analysis, deregulated by the presence of mutant RNA, biological processes are an excellent starting point for further research on the role of the ataxin-3 transcript in the development of SCA3.

### **8. Bibliografía**

- Agrawal, N. *et al.* (2003) 'RNA interference: biology, mechanism, and applications.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. American Society for Microbiology (ASM), 67(4), pp. 657–85. doi: 10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003.
- Ajayi, A. *et al.* (2012) 'Expanded ataxin-7 cause toxicity by inducing ROS production from NADPH oxidase complexes in a stable inducible Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) model', *BMC Neuroscience*. BioMed Central, 13(1), p. 86. doi: 10.1186/1471-2202-13-86.
- Albrecht, M. *et al.* (2004) 'Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3.', *European journal of biochemistry*, 271(15), pp. 3155–70. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04245.x.
- Alvarez, A. R. *et al.* (2004) 'Wnt-3a overcomes  $\beta$ -amyloid toxicity in rat hippocampal neurons', *Experimental Cell Research*. Academic Press, 297(1), pp. 186–196. doi: 10.1016/J.YEXCR.2004.02.028.
- Antony, P. M. A. *et al.* (2009) 'Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 36(2), pp. 280–292. doi: 10.1016/J.NBD.2009.07.020.
- Aranda-Orgillés, B. *et al.* (2008) 'The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex', *Human Genetics*. Springer-Verlag, 123(2), pp. 163–176. doi: 10.1007/s00439-007-0456-6.
- Aranda-Orgillés, B. *et al.* (2011) 'Protein phosphatase 2A (PP2A)-specific ubiquitin ligase MID1 is a sequence-dependent regulator of translation efficiency controlling 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDPK-1).', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(46), pp. 39945–57. doi: 10.1074/jbc.M111.224451.
- Araujo, J. *et al.* (2011) 'FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 20(15), pp. 2928–2941. doi: 10.1093/hmg/ddr197.
- Arrázola, M. S., Silva-Alvarez, C. and Inestrosa, N. C. (2015) 'How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario.', *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media SA, 9, p. 166. doi: 10.3389/fncel.2015.00166.
- Ashkenazi, A. *et al.* (2017a) 'Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy', *Nature*. Nature Publishing Group, 545(7652), pp. 108–111. doi: 10.1038/nature22078.
- Ashkenazi, A. *et al.* (2017b) 'Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy', *Nature*. Nature Publishing Group, 545(7652), pp. 108–111. doi: 10.1038/nature22078.
- Bading, H. (2013) 'Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 14(9), pp. 593–608. doi: 10.1038/nrn3531.
- Bañez-Coronel, M. *et al.* (2012) 'A Pathogenic Mechanism in Huntington's Disease Involves Small CAG-Repeated RNAs with Neurotoxic Activity', *PLoS Genetics*. Edited by C. E. Pearson. Public Library of Science, 8(2), p. e1002481. doi: 10.1371/journal.pgen.1002481.

- Bence, N. F., Sampat, R. M. and Kopito, R. R. (2001) 'Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 292(5521), pp. 1552–5. doi: 10.1126/science.292.5521.1552.
- Berke, S. J. S. *et al.* (2004) 'Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3', *Journal of Neurochemistry*. Wiley/Blackwell (10.1111), 89(4), pp. 908–918. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02369.x.
- Berke, S. J. S. *et al.* (2005) 'Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(36), pp. 32026–34. doi: 10.1074/jbc.M506084200.
- Bernstein, E. *et al.* (2001) 'Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference', *Nature*. Nature Publishing Group, 409(6818), pp. 363–366. doi: 10.1038/35053110.
- Bettencourt, C. *et al.* (2010) 'Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado–Joseph Disease gene (ATXN3)', *neurogenetics*. Springer-Verlag, 11(2), pp. 193–202. doi: 10.1007/s10048-009-0216-y.
- Bettencourt, C. and Lima, M. (2011) 'Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives', *Orphanet Journal of Rare Diseases*. BioMed Central, 6(1), p. 35. doi: 10.1186/1750-1172-6-35.
- Bezprozvanny, I. B. (2010) 'Calcium signaling and neurodegeneration.', *Acta naturae*. National Research University Higher School of Economics, 2(1), pp. 72–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22649630> (Accessed: 28 June 2019).
- Bichelmeier, U. *et al.* (2007) 'Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 27(28), pp. 7418–28. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4540-06.2007.
- Bilen, J. and Bonini, N. M. (2007) 'Genome-Wide Screen for Modifiers of Ataxin-3 Neurodegeneration in *Drosophila*', *PLoS Genetics*. Public Library of Science, 3(10), p. e177. doi: 10.1371/journal.pgen.0030177.
- Blanchette, M. *et al.* (2004) 'Genome-wide analysis reveals an unexpected function for the *Drosophila* splicing factor U2AF50 in the nuclear export of intronless mRNAs.', *Molecular cell*. Elsevier, 14(6), pp. 775–86. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.012.
- Blount, J. R. *et al.* (2014) 'Ubiquitin-binding site 2 of ataxin-3 prevents its proteasomal degradation by interacting with Rad23', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 4638. doi: 10.1038/ncomms5638.
- Boeddrich, A. *et al.* (2006) 'An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis.', *The EMBO journal*. EMBO Press, 25(7), pp. 1547–58. doi: 10.1038/sj.emboj.7601043.
- Bonanomi, M. *et al.* (2014) 'Epigallocatechin-3-gallate and tetracycline differently affect ataxin-3 fibrillogenesis and reduce toxicity in spinocerebellar ataxia type 3 model', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 23(24), pp. 6542–6552. doi: 10.1093/hmg/ddu373.



- Bonanomi, M. *et al.* (2015) 'The toxic effects of pathogenic ataxin-3 variants in a yeast cellular model', *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0129727.
- Botta, A. *et al.* (2013) 'Altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum stress in myotonic dystrophy type 1 muscle cells.', *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 4(2), pp. 275–92. doi: 10.3390/genes4020275.
- Boy, J. *et al.* (2010) 'A transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 resembling late disease onset and gender-specific instability of CAG repeats', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 37(2), pp. 284–293. doi: 10.1016/J.NBD.2009.08.002.
- Brinegar, A. E. and Cooper, T. A. (2016) 'Roles for RNA-binding proteins in development and disease', *Brain Research*. Elsevier, 1647, pp. 1–8. doi: 10.1016/J.BRAINRES.2016.02.050.
- Brini, M. *et al.* (2014) 'Neuronal calcium signaling: function and dysfunction', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Basel, 71(15), pp. 2787–2814. doi: 10.1007/s00018-013-1550-7.
- Burnett, B. G. and Pittman, R. N. (2005a) 'The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(12), pp. 4330–5. doi: 10.1073/pnas.0407252102.
- Burnett, B. G. and Pittman, R. N. (2005b) 'The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(12), pp. 4330–5. doi: 10.1073/pnas.0407252102.
- Burnett, B., Li, F. and Pittman, R. N. (2003) 'The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 12(23), pp. 3195–3205. doi: 10.1093/hmg/ddg344.
- Cancel, G. *et al.* (1995) 'Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus.', *American journal of human genetics*. Elsevier, 57(4), pp. 809–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573040> (Accessed: 14 August 2018).
- Carvalho, A. L., Silva, A. and Macedo-Ribeiro, S. (2018) 'Polyglutamine-Independent Features in Ataxin-3 Aggregation and Pathogenesis of Machado-Joseph Disease.', *Advances in experimental medicine and biology*, 1049, pp. 275–288. doi: 10.1007/978-3-319-71779-1\_14.
- Cemal, C. K. *et al.* (2002) 'YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 11(9), pp. 1075–1094. doi: 10.1093/hmg/11.9.1075.
- Chai, Y. *et al.* (1999) 'Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro.', *Human molecular genetics*, 8(4), pp. 673–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072437> (Accessed: 31 July 2018).

- Chai, Y. *et al.* (2001) 'The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 276(48), pp. 44889–97. doi: 10.1074/jbc.M106575200.
- Chai, Y. *et al.* (2004) 'Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways.', *The Journal of biological chemistry*, 279(5), pp. 3605–11. doi: 10.1074/jbc.M310939200.
- Chan, H. Y. E. (2014) 'RNA-mediated pathogenic mechanisms in polyglutamine diseases and amyotrophic lateral sclerosis', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers, 8, p. 431. doi: 10.3389/fncel.2014.00431.
- Chang, K.-H. *et al.* (2013) 'Aqueous Extract of *Paeonia lactiflora* and Paeoniflorin as Aggregation Reducers Targeting Chaperones in Cell Models of Spinocerebellar Ataxia 3.', *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. Hindawi, 2013, p. 471659. doi: 10.1155/2013/471659.
- Chang, K. H. *et al.* (2014) 'Aqueous extract of *Gardenia jasminoides* targeting oxidative stress to reduce polyQ aggregation in cell models of spinocerebellar ataxia 3', *Neuropharmacology*, 81, pp. 166–175. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.032.
- Chatterjee, A. *et al.* (2015) 'The Role of the Mammalian DNA End-processing Enzyme Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Pathogenesis', *PLoS Genetics*. Edited by C. E. Pearson. Public Library of Science, 11(1), p. e1004749. doi: 10.1371/journal.pgen.1004749.
- Chen, X. *et al.* (2008) 'Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 28(48), pp. 12713–24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3909-08.2008.
- Chou, A.-H. *et al.* (2006) 'Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL', *Neurobiology of Disease*, 21(2), pp. 333–345. doi: 10.1016/j.nbd.2005.07.011.
- Chou, A.-H. *et al.* (2008) 'Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 31(1), pp. 89–101. doi: 10.1016/J.NBD.2008.03.011.
- Choudhry, S. *et al.* (2001) 'CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms.', *Human molecular genetics*, 10(21), pp. 2437–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689490> (Accessed: 14 December 2018).
- Chow, M. K. M. *et al.* (2004) 'Polyglutamine expansion in ataxin-3 does not affect protein stability: implications for misfolding and disease.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(46), pp. 47643–51. doi: 10.1074/jbc.M405799200.
- Christie, N. T. M. *et al.* (2014) 'Novel Polyglutamine Model Uncouples Proteotoxicity from Aging', *PLoS ONE*. Edited by A. Pastore. Public Library of Science, 9(5), p. e96835. doi: 10.1371/journal.pone.0096835.

- Chuang, C.-Y. *et al.* (2019) ‘Modeling spinocerebellar ataxias 2 and 3 with iPSCs reveals a role for glutamate in disease pathology.’, *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 9(1), p. 1166. doi: 10.1038/s41598-018-37774-2.
- Ciesiolka, A. *et al.* (2017) ‘Structural Characteristics of Simple RNA Repeats Associated with Disease and their Deleterious Protein Interactions’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers, 11, p. 97. doi: 10.3389/fncel.2017.00097.
- Clapham, D. E. (2007) ‘Calcium signaling.’, *Cell*. Elsevier, 131(6), pp. 1047–58. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.028.
- Cooper-Knock, J. *et al.* (2015) ‘Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy’, *Acta Neuropathologica*. Springer, 130(1), p. 63. doi: 10.1007/S00401-015-1429-9.
- Costa, M. do C. *et al.* (2010) ‘Ataxin-3 Plays a Role in Mouse Myogenic Differentiation through Regulation of Integrin Subunit Levels’, *PLoS ONE*. Edited by C. Winkler. Public Library of Science, 5(7), p. e11728. doi: 10.1371/journal.pone.0011728.
- Costa, M. do C. and Paulson, H. L. (2012) ‘Toward understanding Machado–Joseph disease’, *Progress in Neurobiology*. Pergamon, 97(2), pp. 239–257. doi: 10.1016/J.PNEUROBIO.2011.11.006.
- Coyne, A. N., Zaepfel, B. L. and Zarnescu, D. C. (2017) ‘Failure to Deliver and Translate—New Insights into RNA Dysregulation in ALS’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers, 11, p. 243. doi: 10.3389/fncel.2017.00243.
- Doss-Pepe, E. W. *et al.* (2003) ‘Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis.’, *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology, 23(18), pp. 6469–83. doi: 10.1128/MCB.23.18.6469-6483.2003.
- Durcan, T. M. *et al.* (2011) ‘The Machado–Joseph disease-associated mutant form of ataxin-3 regulates parkin ubiquitination and stability’, *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 20(1), pp. 141–154. doi: 10.1093/hmg/ddq452.
- Durcan, T. M. *et al.* (2012) ‘Ataxin-3 deubiquitination is coupled to Parkin ubiquitination via E2 ubiquitin-conjugating enzyme.’, *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(1), pp. 531–41. doi: 10.1074/JBC.M111.288449.
- Durcan, T. M. and Fon, E. A. (2013) ‘Ataxin-3 and Its E3 Partners: Implications for Machado–Joseph Disease’, *Frontiers in Neurology*. Frontiers, 4, p. 46. doi: 10.3389/fneur.2013.00046.
- Dürr, A. *et al.* (1996) ‘Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features.’, *Annals of neurology*, 39(4), pp. 490–9. doi: 10.1002/ana.410390411.
- Durut, N. and Sáez-Vásquez, J. (2015) ‘Nucleolin: Dual roles in rDNA chromatin transcription’, *Gene*. Elsevier, 556(1), pp. 7–12. doi: 10.1016/J.GENE.2014.09.023.
- Ellisdon, A. M., Pearce, M. C. and Bottomley, S. P. (2007) ‘Mechanisms of Ataxin-3 Misfolding and Fibril Formation: Kinetic Analysis of a Disease-associated Polyglutamine Protein’, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 368(2), pp. 595–605. doi: 10.1016/J.JMB.2007.02.058.

- Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F. (2004) 'Neurodegenerative diseases and oxidative stress', *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Elsevier Masson, 58(1), pp. 39–46. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2003.11.004.
- Evers, M. M. *et al.* (2013) 'Ataxin-3 protein modification as a treatment strategy for spinocerebellar ataxia type 3: Removal of the CAG containing exon', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 58, pp. 49–56. doi: 10.1016/J.NBD.2013.04.019.
- Evers, M. M., Toonen, L. J. A. and van Roon-Mom, W. M. C. (2014) 'Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: current insights and emerging therapeutic strategies.', *Molecular neurobiology*. Springer US, 49(3), pp. 1513–31. doi: 10.1007/s12035-013-8596-2.
- Evert, B. O. *et al.* (1999) 'High level expression of expanded full-length ataxin-3 in vitro causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells', *Human Molecular Genetics*, 8(7), pp. 1169–1176. doi: 10.1093/hmg/8.7.1169.
- Evert, B. O. *et al.* (2001) 'Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 21(15), pp. 5389–96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-15-05389.2001.
- Evert, B. O. *et al.* (2003a) 'Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3.', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 62(10), pp. 1006–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14575237> (Accessed: 20 July 2018).
- Evert, B. O. *et al.* (2003b) 'Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3.', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 62(10), pp. 1006–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14575237> (Accessed: 1 August 2018).
- Evert, B. O. *et al.* (2006a) 'Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 26(44), pp. 11474–86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2053-06.2006.
- Evert, B. O. *et al.* (2006b) 'Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 26(44), pp. 11474–86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2053-06.2006.
- Evert, B. O. *et al.* (2018) 'Upregulation of miR-370 and miR-543 is associated with reduced expression of heat shock protein 40 in spinocerebellar ataxia type 3', *PLOS ONE*. Edited by K. Roemer. Public Library of Science, 13(8), p. e0201794. doi: 10.1371/journal.pone.0201794.
- van Eyk, C. L. *et al.* (2011) 'Perturbation of the Akt/Gsk3- $\beta$  signalling pathway is common to Drosophila expressing expanded untranslated CAG, CUG and AUUCU repeat RNAs', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 20(14), pp. 2783–2794. doi: 10.1093/hmg/ddr177.
- Fang, S. and Weissman, A. M. (2004) 'Ubiquitin-proteasome system', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhäuser-Verlag, 61(13), pp. 1546–1561. doi: 10.1007/s00018-004-4129-5.

- Fardaei, M. *et al.* (2001) 'In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 29(13), pp. 2766–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433021> (Accessed: 6 August 2018).
- Fardghassemi, Y. *et al.* (2017) 'Rescue of ATXN3 neuronal toxicity in *Caenorhabditis elegans* by chemical modification of endoplasmic reticulum stress.', *Disease models & mechanisms*. The Company of Biologists Ltd, 10(12), pp. 1465–1480. doi: 10.1242/dmm.029736.
- Fei, E. *et al.* (2007) 'Phosphorylation of ataxin-3 by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  at serine 256 regulates the aggregation of ataxin-3', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 357(2), pp. 487–492. doi: 10.1016/J.BBRC.2007.03.160.
- Figura, G., Koscianska, E. and Krzyzosiak, W. J. (2015) 'In Vitro Expansion of CAG, CAA, and Mixed CAG/CAA Repeats.', *International journal of molecular sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 16(8), pp. 18741–51. doi: 10.3390/ijms160818741.
- Fiszer, A. and Krzyzosiak, W. J. (2013) 'RNA toxicity in polyglutamine disorders: concepts, models, and progress of research', *Journal of Molecular Medicine*. Springer-Verlag, 91(6), pp. 683–691. doi: 10.1007/s00109-013-1016-2.
- Friedman, J. H. (2002) 'Presumed rapid eye movement behavior disorder in Machado-Joseph disease (spinocerebellar ataxia type 3)', *Movement Disorders*. Wiley-Blackwell, 17(6), pp. 1350–1353. doi: 10.1002/mds.10269.
- Gao, R. *et al.* (2015) 'Inactivation of PNKP by Mutant ATXN3 Triggers Apoptosis by Activating the DNA Damage-Response Pathway in SCA3', *PLOS Genetics*. Edited by C. E. Pearson. Public Library of Science, 11(1), p. e1004834. doi: 10.1371/journal.pgen.1004834.
- Gaspar, C. *et al.* (2000) 'CAG tract of MJD-1 may be prone to frameshifts causing polyalanine accumulation.', *Human molecular genetics*, 9(13), pp. 1957–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942424> (Accessed: 6 August 2018).
- Gasteiger, E. *et al.* (2003) 'Expasy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 31(13), pp. 3784–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824418> (Accessed: 21 March 2019).
- Goswami, A. *et al.* (2006) 'Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 342(1), pp. 184–190. doi: 10.1016/J.BBRC.2006.01.136.
- Goti, D. *et al.* (2004) 'A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Society for Neuroscience, 24(45), pp. 10266–79. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2734-04.2004.
- Goto, J. *et al.* (1997) 'Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini', *Neuroscience Research*. Elsevier, 28(4), pp. 373–377. doi: 10.1016/S0168-0102(97)00056-4.
- Gourdon, G. and Meola, G. (2017) 'Myotonic Dystrophies: State of the Art of New Therapeutic Developments for the CNS', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers, 11, p. 101. doi: 10.3389/fncel.2017.00101.

- Greco, C. M. *et al.* (2002) 'Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers.', *Brain : a journal of neurology*, 125(Pt 8), pp. 1760–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135967> (Accessed: 8 August 2018).
- Griesche, N. *et al.* (2016) 'Regulation of mRNA Translation by MID1: A Common Mechanism of Expanded CAG Repeat RNAs.', *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media SA, 10, p. 226. doi: 10.3389/fncel.2016.00226.
- Haacke, A. *et al.* (2006) 'Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 15(4), pp. 555–568. doi: 10.1093/hmg/ddi472.
- Haacke, A., Hartl, F. U. and Breuer, P. (2007) 'Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 282(26), pp. 18851–6. doi: 10.1074/jbc.M611914200.
- Haeusler, A. R. *et al.* (2014) 'C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease.', *Nature*. NIH Public Access, 507(7491), pp. 195–200. doi: 10.1038/nature13124.
- Hagerman, P. (2013) 'Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS): pathology and mechanisms', *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag, 126(1), pp. 1–19. doi: 10.1007/s00401-013-1138-1.
- Hammond, S. M. *et al.* (2000) 'An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 404(6775), pp. 293–296. doi: 10.1038/35005107.
- Hammond, S. M. *et al.* (2001) 'Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi.', *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 293(5532), pp. 1146–50. doi: 10.1126/science.1064023.
- Handa, V., Saha, T. and Usdin, K. (2003) 'The fragile X syndrome repeats form RNA hairpins that do not activate the interferon-inducible protein kinase, PKR, but are cut by Dicer.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 31(21), pp. 6243–8. doi: 10.1093/NAR/GKG818.
- Hansen, S. K. *et al.* (2016) 'Induced pluripotent stem cell - derived neurons for the study of spinocerebellar ataxia type 3', *Stem Cell Research*. Elsevier, 17(2), pp. 306–317. doi: 10.1016/J.SCR.2016.07.004.
- Harris, G. M. *et al.* (2010) 'Splice Isoforms of the Polyglutamine Disease Protein Ataxin-3 Exhibit Similar Enzymatic yet Different Aggregation Properties', *PLoS ONE*. Edited by M. R. Cookson. Public Library of Science, 5(10), p. e13695. doi: 10.1371/journal.pone.0013695.
- Harvey, K. and Marchetti, B. (2014) 'Regulating Wnt signaling: a strategy to prevent neurodegeneration and induce regeneration', *Journal of Molecular Cell Biology*. Narnia, 6(1), pp. 1–2. doi: 10.1093/jmcb/mju002.
- Hayashi, M., Kobayashi, K. and Furuta, H. (2003) 'Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado-Joseph disease', *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. Wiley/Blackwell (10.1111), 57(2), pp. 205–213. doi: 10.1046/j.1440-1819.2003.01102.x.

- Hirabayashi, M. *et al.* (2001) 'VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration', *Cell Death & Differentiation*. Nature Publishing Group, 8(10), pp. 977–984. doi: 10.1038/sj.cdd.4400907.
- Ho, T. H. *et al.* (2004) 'Muscleblind proteins regulate alternative splicing.', *The EMBO journal*. EMBO Press, 23(15), pp. 3103–12. doi: 10.1038/sj.emboj.7600300.
- Ho, T. H. *et al.* (2005) 'Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from misregulation of alternative splicing in myotonic dystrophy.', *Journal of cell science*. The Company of Biologists Ltd, 118(Pt 13), pp. 2923–33. doi: 10.1242/jcs.02404.
- Hsu, J.-Y. *et al.* (2017) 'The Truncated C-terminal Fragment of Mutant ATXN3 Disrupts Mitochondria Dynamics in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Models.', *Frontiers in molecular neuroscience*. Frontiers Media SA, 10, p. 196. doi: 10.3389/fnmol.2017.00196.
- Hsu, R.-J. *et al.* (2011) 'Long Tract of Untranslated CAG Repeats Is Deleterious in Transgenic Mice', *PLoS ONE*. Edited by T. Lamitina. Public Library of Science, 6(1), p. e16417. doi: 10.1371/journal.pone.0016417.
- Hubener, J. *et al.* (2013) 'Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 22(3), pp. 508–518. doi: 10.1093/hmg/dd5449.
- Ichikawa, Y. *et al.* (2001) 'The genomic structure and expression of MJD , the Machado-Joseph disease gene', *Journal of Human Genetics*. Nature Publishing Group, 46(7), pp. 413–422. doi: 10.1007/s100380170060.
- Ikeda, H. *et al.* (1996) 'Expanded polyglutamine in the Machado–Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 13(2), pp. 196–202. doi: 10.1038/ng0696-196.
- Ikezoe, K. *et al.* (2007) 'Endoplasmic reticulum stress in myotonic dystrophy type 1 muscle', *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag, 114(5), pp. 527–535. doi: 10.1007/s00401-007-0267-9.
- Imbert, G. *et al.* (1996) 'Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 14(3), pp. 285–291. doi: 10.1038/ng1196-285.
- Ingelbrecht, I. L., Mandelbaum, C. I. and Mirkov, T. E. (1998) 'Highly Sensitive Northern Hybridization Using a Rapid Protocol for Downward Alkaline Blotting of RNA', *BioTechniques*. Future Science Ltd London, UK , 25(3), pp. 420–425. doi: 10.2144/98253st03.
- Jäger, R. *et al.* (2012) 'The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress', *Biology of the Cell*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 104(5), pp. 259–270. doi: 10.1111/boc.201100055.
- Jana, N. R. and Nukina, N. (2004) 'Misfolding promotes the ubiquitination of polyglutamine-expanded ataxin-3, the defective gene product in SCA3/MJD.', *Neurotoxicity research*, 6(7–8), pp. 523–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15639784> (Accessed: 30 July 2018).
- Jazurek, M. *et al.* (2016) 'Identifying proteins that bind to specific RNAs - focus on simple repeat expansion diseases.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 44(19), pp. 9050–9070. doi: 10.1093/nar/gkw803.

- Jiang, H. *et al.* (2004) 'Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 13(24), pp. 3079–3088. doi: 10.1093/hmg/ddh327.
- Jung, J. *et al.* (2009) 'Preventing Ataxin-3 protein cleavage mitigates degeneration in a *Drosophila* model of SCA3', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 18(24), pp. 4843–4852. doi: 10.1093/hmg/ddp456.
- Kato, M. (2005) 'WNT2B: comparative integromics and clinical applications (Review).', *International journal of molecular medicine*, 16(6), pp. 1103–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16273293> (Accessed: 4 July 2019).
- Kawaguchi, Y. *et al.* (1994) 'CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 221–228. doi: 10.1038/ng1194-221.
- Kawai, Y. *et al.* (2004) 'Cognitive Impairments in Machado-Joseph Disease', *Archives of Neurology*. American Medical Association, 61(11), p. 1757. doi: 10.1001/archneur.61.11.1757.
- Kazachkova, N. *et al.* (2013) 'Patterns of mitochondrial DNA damage in blood and brain tissues of a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease.', *Neuro-degenerative diseases*. Karger Publishers, 11(4), pp. 206–14. doi: 10.1159/000339207.
- Khan, L. A. *et al.* (2006) 'Expanded polyglutamines impair synaptic transmission and ubiquitin-proteasome system in *Caenorhabditis elegans*', *Journal of Neurochemistry*. Wiley/Blackwell (10.1111), 98(2), pp. 576–587. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03895.x.
- Kim, S.-J. *et al.* (2003) 'Oxidative stimuli affect polyglutamine aggregation and cell death in human mutant ataxin-1-expressing cells', *Neuroscience Letters*. Elsevier, 348(1), pp. 21–24. doi: 10.1016/S0304-3940(03)00657-8.
- Kino, Y. *et al.* (2004) 'Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 13(5), pp. 495–507. doi: 10.1093/hmg/ddh056.
- Klinke, I. *et al.* (2010) 'Neuropsychological Features of Patients with Spinocerebellar Ataxia (SCA) Types 1, 2, 3, and 6', *The Cerebellum*. Springer-Verlag, 9(3), pp. 433–442. doi: 10.1007/s12311-010-0183-8.
- Klockgether, T. *et al.* (1998) 'The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients.', *Brain: a journal of neurology*, 121 ( Pt 4), pp. 589–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9577387> (Accessed: 14 August 2018).
- Koch, P. *et al.* (2011) 'Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease', *Nature*. Nature Publishing Group, 480(7378), pp. 543–546. doi: 10.1038/nature10671.
- Konno, A. *et al.* (2014) 'Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells', *The Cerebellum*. Springer US, 13(1), pp. 29–41. doi: 10.1007/s12311-013-0516-5.



- Krauß, S. *et al.* (2013) 'Translation of HTT mRNA with expanded CAG repeats is regulated by the MID1-PP2A protein complex', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(1), p. 1511. doi: 10.1038/ncomms2514.
- Kressler, D., Hurt, E. and Baßler, J. (2010) 'Driving ribosome assembly', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1803(6), pp. 673–683. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2009.10.009.
- Krishna, A. *et al.* (2014) 'Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease.', *BMC genomics*. BioMed Central, 15(1), p. 1154. doi: 10.1186/1471-2164-15-1154.
- Krol, J. *et al.* (2007) 'Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets.', *Molecular cell*. Elsevier, 25(4), pp. 575–86. doi: 10.1016/j.molcel.2007.01.031.
- Kumar, V., Hasan, G. M. and Hassan, M. I. (2017) 'Unraveling the Role of RNA Mediated Toxicity of C9orf72 Repeats in C9-FTD/ALS', *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers, 11, p. 711. doi: 10.3389/fnins.2017.00711.
- Laço, M. N. *et al.* (2012) 'Valosin-Containing Protein (VCP/p97) Is an Activator of Wild-Type Ataxin-3', *PLoS ONE*. Edited by P. Opal. Public Library of Science, 7(9), p. e43563. doi: 10.1371/journal.pone.0043563.
- Laura, M. *et al.* (2011) 'Functional interactions as a survival strategy against abnormal aggregation', *The FASEB Journal*. Federation of American Societies for Experimental Biology Bethesda, MD, USA, 25(1), pp. 45–54. doi: 10.1096/fj.10-161208.
- Lawlor, K. T. *et al.* (2011) 'Double-stranded RNA is pathogenic in Drosophila models of expanded repeat neurodegenerative diseases', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 20(19), pp. 3757–3768. doi: 10.1093/hmg/ddr292.
- Lawlor, K. T. *et al.* (2012) 'Ubiquitous Expression of CUG or CAG Trinucleotide Repeat RNA Causes Common Morphological Defects in a Drosophila Model of RNA-Mediated Pathology', *PLoS ONE*. Edited by D. E. Rincon-Limas. Public Library of Science, 7(6), p. e38516. doi: 10.1371/journal.pone.0038516.
- Lee, L.-C. *et al.* (2014) 'Role of high mobility group box 1 (HMGB1) in SCA17 pathogenesis.', *PloS one*. Public Library of Science, 9(12), p. e115809. doi: 10.1371/journal.pone.0115809.
- Leitman, J., Ulrich Hartl, F. and Lederkremer, G. Z. (2013) 'Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(1), p. 2753. doi: 10.1038/ncomms3753.
- Li, F. *et al.* (2002a) 'Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 277(47), pp. 45004–12. doi: 10.1074/jbc.M205259200.
- Li, F. *et al.* (2002b) 'Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 277(47), pp. 45004–12. doi: 10.1074/jbc.M205259200.

- Li, L.-B. *et al.* (2008) 'RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*', *Nature*. Nature Publishing Group, 453(7198), pp. 1107–1111. doi: 10.1038/nature06909.
- Lin, K.-P. and Soong, B.-W. (2002) 'Peripheral neuropathy of Machado-Joseph disease in Taiwan: a morphometric and genetic study.', *European neurology*. Karger Publishers, 48(4), pp. 210–7. doi: 10.1159/000066169.
- Liu, E. *et al.* (2011) 'Control of mTORC1 signaling by the Opitz syndrome protein MID1.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108(21), pp. 8680–5. doi: 10.1073/pnas.1100131108.
- Liu, H. *et al.* (2016) 'The Machado–Joseph Disease Deubiquitinase Ataxin-3 Regulates the Stability and Apoptotic Function of p53', *PLOS Biology*. Edited by H. Bellen. Public Library of Science, 14(11), p. e2000733. doi: 10.1371/journal.pbio.2000733.
- Liu, Y. *et al.* (2011) 'Mutant HFE H63D protein is associated with prolonged endoplasmic reticulum stress and increased neuronal vulnerability.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(15), pp. 13161–70. doi: 10.1074/jbc.M110.170944.
- Liu, Y. and Ye, Y. (2012) 'Roles of p97-associated deubiquitinases in protein quality control at the endoplasmic reticulum.', *Current protein & peptide science*. NIH Public Access, 13(5), pp. 436–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22812527> (Accessed: 30 July 2018).
- Lopez-Meraz, M.-L., Niquet, J. and Wasterlain, C. G. (2010) 'Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus', *Epilepsia*, 51, pp. 56–60. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02611.x.
- Lu, M., Boschetti, C. and Tunnacliffe, A. (2015) 'Long Term Aggresome Accumulation Leads to DNA Damage, p53-dependent Cell Cycle Arrest, and Steric Interference in Mitosis', *The Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 290(46), p. 27986. doi: 10.1074/JBC.M115.676437.
- Luis-Ravelo, D. *et al.* (2018) 'Pramipexole reduces soluble mutant huntingtin and protects striatal neurons through dopamine D3 receptors in a genetic model of Huntington's disease', *Experimental Neurology*. Academic Press, 299, pp. 137–147. doi: 10.1016/J.EXPNEUROL.2017.10.019.
- Macedo-Ribeiro, S. *et al.* (2009) 'Nucleocytoplasmic Shuttling Activity of Ataxin-3', *PLoS ONE*. Edited by D. C. Rubinsztein. Public Library of Science, 4(6), p. e5834. doi: 10.1371/journal.pone.0005834.
- Maciel, P. *et al.* (1995) 'Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease.', *American journal of human genetics*. Elsevier, 57(1), pp. 54–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7611296> (Accessed: 14 August 2018).
- Maciel, P. *et al.* (2001) 'Improvement in the Molecular Diagnosis of Machado-Joseph Disease', *Archives of Neurology*. American Medical Association, 58(11), p. 1821. doi: 10.1001/archneur.58.11.1821.
- Malinowska, A. *et al.* (2012) 'Diffprot — software for non-parametric statistical analysis of differential proteomics data', *Journal of Proteomics*. Elsevier, 75(13), pp. 4062–4073. doi: 10.1016/J.JPROT.2012.05.030.

- Mankodi, A. *et al.* (2001) 'Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2.', *Human molecular genetics*, 10(19), pp. 2165–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590133> (Accessed: 6 August 2018).
- Mankodi, A. *et al.* (2003) 'Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2', *Annals of Neurology*. Wiley-Blackwell, 54(6), pp. 760–768. doi: 10.1002/ana.10763.
- Mansour, F. H. and Pestov, D. G. (2013) 'Separation of long RNA by agarose-formaldehyde gel electrophoresis.', *Analytical biochemistry*. NIH Public Access, 441(1), pp. 18–20. doi: 10.1016/j.ab.2013.06.008.
- Mao, Y. *et al.* (2005) 'Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(36), pp. 12700–5. doi: 10.1073/pnas.0506344102.
- Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U. and Vingtdeux, V. (2009) 'Calcium signaling in neurodegeneration.', *Molecular neurodegeneration*. BioMed Central, 4, p. 20. doi: 10.1186/1750-1326-4-20.
- Maruff, P. *et al.* (1996) 'Cognitive deficits in Machado-Joseph disease.', *Annals of neurology*, 40(3), pp. 421–7. doi: 10.1002/ana.410400311.
- Matos, C. A., de Macedo-Ribeiro, S. and Carvalho, A. L. (2011) 'Polyglutamine diseases: The special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease', *Progress in Neurobiology*. Pergamon, 95(1), pp. 26–48. doi: 10.1016/J.PNEUROBIO.2011.06.007.
- Matos, C., Pereira de Almeida, L. and Nóbrega, C. (2018) 'Machado-Joseph disease / Spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy', *Journal of Neurochemistry*. Wiley/Blackwell (10.1111). doi: 10.1111/jnc.14541.
- Matsumoto, M. *et al.* (2004) 'Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4.', *The EMBO journal*. EMBO Press, 23(3), pp. 659–69. doi: 10.1038/sj.emboj.7600081.
- Matsumura, R. *et al.* (1996) 'The relationship between trinucleotide repeat length and phenotypic variation in Machado-Joseph disease.', *Journal of the neurological sciences*, 139(1), pp. 52–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8836972> (Accessed: 14 August 2018).
- Mazzucchelli, S. *et al.* (2009) 'Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Pergamon, 41(12), pp. 2485–2492. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2009.08.003.
- McCampbell, A. *et al.* (2000) 'CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine.', *Human molecular genetics*, 9(14), pp. 2197–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958659> (Accessed: 1 August 2018).
- McGurk, L., Berson, A. and Bonini, N. M. (2015) 'Drosophila as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease.', *Genetics*. Genetics, 201(2), pp. 377–402. doi: 10.1534/genetics.115.179457.
- Mendonça, L. S. *et al.* (2018) 'Stem Cell-Based Therapies for Polyglutamine Diseases', in: Springer, Cham, pp. 439–466. doi: 10.1007/978-3-319-71779-1\_21.

- de Mezer, M. *et al.* (2011) 'Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 39(9), pp. 3852–3863. doi: 10.1093/nar/gkq1323.
- Michlewski, G. and Krzyzosiak, W. J. (2004) 'Molecular Architecture of CAG Repeats in Human Disease Related Transcripts', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 340(4), pp. 665–679. doi: 10.1016/J.JMB.2004.05.021.
- Miller, J. W. *et al.* (2000) 'Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy.', *The EMBO journal*. EMBO Press, 19(17), pp. 4439–48. doi: 10.1093/emboj/19.17.4439.
- Min, H. J. *et al.* (2013) 'Chaperone-like activity of high-mobility group box 1 protein and its role in reducing the formation of polyglutamine aggregates.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. American Association of Immunologists, 190(4), pp. 1797–806. doi: 10.4049/jimmunol.1202472.
- Miyata, R. *et al.* (2008) 'Oxidative stress in neurodegeneration in dentatorubral-pallidoluysian atrophy.', *Journal of the neurological sciences*. Elsevier, 264(1–2), pp. 133–9. doi: 10.1016/j.jns.2007.08.025.
- Mueller, T. *et al.* (2009) 'CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 18(17), pp. 3334–3343. doi: 10.1093/hmg/ddp274.
- Murmann, Andrea E *et al.* (2018) 'Small interfering RNAs based on huntingtin trinucleotide repeats are highly toxic to cancer cells', *EMBO reports*, p. e45336. doi: 10.15252/embr.201745336.
- Murmann, Andrea E. *et al.* (2018) 'Trinucleotide Repeat Expansion Diseases, RNAi, and Cancer', *Trends in Cancer*. Elsevier Inc., xx. doi: 10.1016/j.trecan.2018.08.004.
- Mykowska, A. *et al.* (2011) 'CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 39(20), pp. 8938–8951. doi: 10.1093/nar/gkr608.
- Nalavade, R. *et al.* (2013) 'Mechanisms of RNA-induced toxicity in CAG repeat disorders', *Cell Death & Disease*. Nature Publishing Group, 4(8), pp. e752–e752. doi: 10.1038/cddis.2013.276.
- Nascimento-Ferreira, I. *et al.* (2011) 'Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado–Joseph disease', *Brain*. Oxford University Press, 134(5), pp. 1400–1415. doi: 10.1093/brain/awr047.
- Neueder, A. (2018) 'RNA-Mediated Disease Mechanisms in Neurodegenerative Disorders', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, p. #pagerange#. doi: 10.1016/J.JMB.2018.12.012.
- Neves-Carvalho, A. *et al.* (2015) 'Dominant negative effect of polyglutamine expansion perturbs normal function of ataxin-3 in neuronal cells.', *Human molecular genetics*. Oxford University Press, 24(1), pp. 100–17. doi: 10.1093/hmg/ddu422.
- Nguyen, H. P. *et al.* (2013) 'Cerebellar Soluble Mutant Ataxin-3 Level Decreases during Disease Progression in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice', *PLoS ONE*. Edited by H. H. Kampinga. Public Library of Science, 8(4), p. e62043. doi: 10.1371/journal.pone.0062043.

- Nicastro, G. *et al.* (2005) 'The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 102(30), pp. 10493–8. doi: 10.1073/pnas.0501732102.
- Nicastro, G. *et al.* (2009a) 'Josephin domain of ataxin-3 contains two distinct ubiquitin-binding sites', *Biopolymers*. Wiley-Blackwell, 91(12), pp. 1203–1214. doi: 10.1002/bip.21210.
- Nicastro, G. *et al.* (2009b) 'Josephin domain of ataxin-3 contains two distinct ubiquitin-binding sites', *Biopolymers*. Wiley-Blackwell, 91(12), pp. 1203–1214. doi: 10.1002/bip.21210.
- Nicastro, G. *et al.* (2010) 'Understanding the Role of the Josephin Domain in the PolyUb Binding and Cleavage Properties of Ataxin-3', *PLoS ONE*. Edited by M. F. Tuite. Public Library of Science, 5(8), p. e12430. doi: 10.1371/journal.pone.0012430.
- Nóbrega, C. *et al.* (2018) 'Molecular Mechanisms and Cellular Pathways Implicated in Machado-Joseph Disease Pathogenesis', in: Springer, Cham, pp. 349–367. doi: 10.1007/978-3-319-71779-1\_18.
- Nóbrega, C. and Pereira de Almeida, L. (eds) (2018) *Polyglutamine Disorders*. Cham: Springer International Publishing (Advances in Experimental Medicine and Biology). doi: 10.1007/978-3-319-71779-1.
- Osowski, C. (2012) *Stress Responses*. Methods in. Edited by C. Osowski. New York: Human Press.
- Padiath, Q. S. *et al.* (2005) 'Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus', *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 133B(1), pp. 124–126. doi: 10.1002/ajmg.b.30088.
- Parfitt, D. A. *et al.* (2009) 'The ataxia protein saccin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1.', *Human molecular genetics*. Oxford University Press, 18(9), pp. 1556–65. doi: 10.1093/hmg/ddp067.
- Paulson, H. (2012a) 'Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3.', *Handbook of clinical neurology*. NIH Public Access, 103, pp. 437–49. doi: 10.1016/B978-0-444-51892-7.00027-9.
- Paulson, H. (2012b) 'Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3', *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, 103, pp. 437–449. doi: 10.1016/B978-0-444-51892-7.00027-9.
- Paulson, H L *et al.* (1997a) 'Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3.', *Neuron*. Elsevier, 19(2), pp. 333–44. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80943-5.
- Paulson, H L *et al.* (1997b) 'Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3.', *Neuron*. Elsevier, 19(2), pp. 333–44. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80943-5.
- Paulson, Henry L. *et al.* (1997) 'Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain', *Annals of Neurology*, 41(4), pp. 453–462. doi: 10.1002/ana.410410408.

- Paulson, H. L. *et al.* (2017) 'Polyglutamine spinocerebellar ataxias-from genes to potential treatments', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 18(10), pp. 613–626. doi: 10.1038/nrn.2017.92.
- Pchitskaya, E., Popugaeva, E. and Bezprozvanny, I. (2018) 'Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases.', *Cell calcium*. NIH Public Access, 70, pp. 87–94. doi: 10.1016/j.ceca.2017.06.008.
- Pereira, C. M. F. (2013) 'Crosstalk between Endoplasmic Reticulum Stress and Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases', *ISRN Cell Biology*. Hindawi, 2013, pp. 1–22. doi: 10.1155/2013/256404.
- Perez, M. K. *et al.* (1998) 'Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 143(6), pp. 1457–70. doi: 10.1083/JCB.143.6.1457.
- Perlman, R. L. (2016) 'Mouse models of human disease: An evolutionary perspective.', *Evolution, medicine, and public health*. Oxford University Press, 2016(1), pp. 170–6. doi: 10.1093/emph/eow014.
- Pfeiffer, A. *et al.* (2017) 'Ataxin-3 consolidates the MDC1-dependent DNA double-strand break response by counteracting the SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4.', *The EMBO journal*. EMBO Press, 36(8), pp. 1066–1083. doi: 10.15252/embj.201695151.
- Pozzi, C. *et al.* (2008a) 'Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 30(2), pp. 190–200. doi: 10.1016/J.NBD.2008.01.011.
- Pozzi, C. *et al.* (2008b) 'Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 30(2), pp. 190–200. doi: 10.1016/J.NBD.2008.01.011.
- Pujana, M. A. *et al.* (1999) 'Spinocerebellar ataxias in Spanish patients: genetic analysis of familial and sporadic cases. The Ataxia Study Group.', *Human genetics*, 104(6), pp. 516–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453742> (Accessed: 14 December 2018).
- Pulst, S.-M. *et al.* (1996) 'Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 14(3), pp. 269–276. doi: 10.1038/ng1196-269.
- Querido, E. *et al.* (2011) 'Stochastic and reversible aggregation of mRNA with expanded CUG-triplet repeats.', *Journal of cell science*, 124(Pt 10), pp. 1703–14. doi: 10.1242/jcs.073270.
- Ramani, B. *et al.* (2015) 'A knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 exhibits prominent aggregate pathology and aberrant splicing of the disease gene transcript', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 24(5), pp. 1211–1224. doi: 10.1093/hmg/ddu532.
- Reina, C. P., Zhong, X. and Pittman, R. N. (2010) 'Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 19(2), pp. 235–249. doi: 10.1093/hmg/ddp482.
- Riess, O. *et al.* (2008) 'SCA3: Neurological features, pathogenesis and animal models', *The Cerebellum*. Springer-Verlag, 7(2), pp. 125–137. doi: 10.1007/s12311-008-0013-4.

- Ristic, G. *et al.* (2018) 'Toxicity and aggregation of the polyglutamine disease protein, ataxin-3 is regulated by its binding to VCP/p97 in *Drosophila melanogaster*', *Neurobiology of Disease*. Elsevier, 116(December 2017), pp. 78–92. doi: 10.1016/j.nbd.2018.04.013.
- Rodrigues, A.-J. *et al.* (2007) 'Functional genomics and biochemical characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3', *The FASEB Journal*. Federation of American Societies for Experimental Biology, 21(4), pp. 1126–1136. doi: 10.1096/fj.06-7002com.
- Rodrigues, A.-J. *et al.* (2010) 'Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1803(10), pp. 1154–1163. doi: 10.1016/J.BBAMCR.2010.07.004.
- van Roon-Mom, W. M. C. *et al.* (2005) 'TATA-binding protein in neurodegenerative disease', *Neuroscience*. Pergamon, 133(4), pp. 863–872. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.03.024.
- Roussel, B. D. *et al.* (2013) 'Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease.', *The Lancet. Neurology*. Elsevier, 12(1), pp. 105–18. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70238-7.
- Rüb, U., de Vos, R. A. ., *et al.* (2002) 'Degeneration of the external cuneate nucleus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease)', *Brain Research*. Elsevier, 953(1–2), pp. 126–134. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03278-X.
- Rüb, U., de Vos, R. A. I., *et al.* (2002) 'Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus.', *Brain : a journal of neurology*, 125(Pt 9), pp. 2115–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183356> (Accessed: 14 August 2018).
- Rüb, U. *et al.* (2003) 'The nucleus raphe interpositus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease)', *Journal of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, 25(2), pp. 115–127. doi: 10.1016/S0891-0618(02)00099-6.
- Rüb, U. *et al.* (2004) 'Damage to the reticulotegmental nucleus of the pons in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3.', *Neurology*. Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology, 63(7), pp. 1258–63. doi: 10.1212/01.WNL.0000140498.24112.8C.
- Rüb, U. *et al.* (2004) 'Degeneration of the central vestibular system in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients and its possible clinical significance', *Neuropathology and Applied Neurobiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 30(4), pp. 402–414. doi: 10.1111/j.1365-2990.2004.00554.x.
- Rüb, U., Brunt, E. R., *et al.* (2006) 'Degeneration of ingestion-related brainstem nuclei in spinocerebellar ataxia type 2, 3, 6 and 7', *Neuropathology and Applied Neurobiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 32(6), pp. 635–649. doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00772.x.
- Rüb, U., de Vos, R. A. I., *et al.* (2006) 'Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3): Thalamic Neurodegeneration Occurs Independently from Thalamic Ataxin-3 Immunopositive Neuronal Intranuclear Inclusions', *Brain Pathology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 16(3), pp. 218–227. doi: 10.1111/j.1750-3639.2006.00022.x.
- Rüb, U., Brunt, E. R. and Deller, T. (2008) 'New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease).', *Current opinion in neurology*, 21(2), pp. 111–6. doi: 10.1097/WCO.0b013e3282f7673d.

- Rué, L. *et al.* (2016) 'Targeting CAG repeat RNAs reduces Huntington's disease phenotype independently of huntingtin levels', *The Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 126(11), pp. 4319–4330. doi: 10.1172/JCI83185.
- Sang, T.-K. and Jackson, G. R. (2005) 'Drosophila models of neurodegenerative disease.', *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. Am. Soc. for Experimental NeuroTherapeutics, 2(3), pp. 438–46. doi: 10.1602/neurorx.2.3.438.
- Sanpei, K. *et al.* (1996) 'Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 14(3), pp. 277–284. doi: 10.1038/ng1196-277.
- Sasaki, H. *et al.* (1995) 'CAG repeat expansion of Machado-Joseph disease in the Japanese: analysis of the repeat instability for parental transmission, and correlation with disease phenotype.', *Journal of the neurological sciences*. Elsevier, 133(1–2), pp. 128–33. doi: 10.1016/0022-510X(95)00175-2.
- Saunders, H. M. and Bottomley, S. P. (2009) 'Multi-domain misfolding: understanding the aggregation pathway of polyglutamine proteins', *Protein Engineering Design and Selection*. Oxford University Press, 22(8), pp. 447–451. doi: 10.1093/protein/gzp033.
- Scaglione, K. M. *et al.* (2011) 'Ube2w and ataxin-3 coordinately regulate the ubiquitin ligase CHIP.', *Molecular cell*. Elsevier, 43(4), pp. 599–612. doi: 10.1016/j.molcel.2011.05.036.
- Scherzed, W. *et al.* (2012) 'Pathoanatomy of Cerebellar Degeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 2 (SCA2) and Type 3 (SCA3)', *The Cerebellum*. Springer-Verlag, 11(3), pp. 749–760. doi: 10.1007/s12311-011-0340-8.
- Schlachetzki, J. C. M. *et al.* (2013) 'Studying neurodegenerative diseases in culture models', *Revista Brasileira de Psiquiatria*. Associação Brasileira de Psiquiatria, 35(suppl 2), pp. S92–S100. doi: 10.1590/1516-4446-2013-1159.
- Schmidt, J. and Schmidt, T. (2018) 'Animal Models of Machado-Joseph Disease', in: Springer, Cham, pp. 289–308. doi: 10.1007/978-3-319-71779-1\_15.
- Schmidt, T *et al.* (1998) 'An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients.', *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 8(4), pp. 669–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804376> (Accessed: 20 July 2018).
- Schmidt, Thorsten *et al.* (1998) 'An Isoform of Ataxin-3 Accumulates in the Nucleus of Neuronal Cells in Affected Brain Regions of SCA3 Patients', *Brain Pathology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 8(4), pp. 669–679. doi: 10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x.
- Schmidt, T. *et al.* (2002) 'Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions.', *Annals of neurology*, 51(3), pp. 302–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891825> (Accessed: 31 July 2018).
- Schmitt, I. *et al.* (2007) 'Inactivation of the mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 362(3), pp. 734–739. doi: 10.1016/J.BBRC.2007.08.062.
- Schöls, L. *et al.* (1996) 'Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation.', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. BMJ Publishing Group Ltd, 61(5), pp. 466–70. doi: 10.1136/JNRP.61.5.466.



- Seidel, K. *et al.* (2010) 'Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3', *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag, 120(4), pp. 449–460. doi: 10.1007/s00401-010-0717-7.
- Seidel, K. *et al.* (2012) 'Cellular protein quality control and the evolution of aggregates in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)', *Neuropathology and Applied Neurobiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 38(6), pp. 548–558. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01220.x.
- Seirafi, M., Kozlov, G. and Gehring, K. (2015) 'Parkin structure and function.', *The FEBS journal*. Wiley-Blackwell, 282(11), pp. 2076–88. doi: 10.1111/febs.13249.
- Sequeiros, J. and Coutinho, P. (1993) 'Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease.', *Advances in neurology*, 61, pp. 139–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8421964> (Accessed: 14 August 2018).
- Shieh, S.-Y. and Bonini, N. M. (2011) 'Genes and pathways affected by CAG-repeat RNA-based toxicity in Drosophila', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 20(24), pp. 4810–4821. doi: 10.1093/hmg/ddr420.
- Shimohata, T. *et al.* (2000) 'Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 26(1), pp. 29–36. doi: 10.1038/79139.
- Shiple, M. M., Mangold, C. A. and Szpara, M. L. (2016) 'Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line.', *Journal of visualized experiments : JoVE*. MyJoVE Corporation, (108), p. 53193. doi: 10.3791/53193.
- Silva-Alvarez, C. *et al.* (2013) 'Canonical Wnt signaling protects hippocampal neurons from A $\beta$  oligomers: role of non-canonical Wnt-5a/Ca(2+) in mitochondrial dynamics.', *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media SA, 7, p. 97. doi: 10.3389/fncel.2013.00097.
- Silva-Fernandes, A. *et al.* (2014) 'Chronic Treatment with 17-DMAG Improves Balance and Coordination in A New Mouse Model of Machado-Joseph Disease', *Neurotherapeutics*. Springer US, 11(2), pp. 433–449. doi: 10.1007/s13311-013-0255-9.
- Simoës, A. T. *et al.* (2012) 'Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease', *Brain*. Oxford University Press, 135(8), pp. 2428–2439. doi: 10.1093/brain/aws177.
- Sobczak, K. *et al.* (2003) 'RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 31(19), pp. 5469–82. doi: 10.1093/NAR/GKG766.
- Sobczak, K. and Krzyzosiak, W. J. (2005) 'CAG repeats containing CAA interruptions form branched hairpin structures in spinocerebellar ataxia type 2 transcripts.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 280(5), pp. 3898–910. doi: 10.1074/jbc.M409984200.
- Song, A.-X. *et al.* (2010) 'Structural Transformation of the Tandem Ubiquitin-Interacting Motifs in Ataxin-3 and Their Cooperative Interactions with Ubiquitin Chains', *PLoS ONE*. Edited by V. N. Uversky. Public Library of Science, 5(10), p. e13202. doi: 10.1371/journal.pone.0013202.
- Song, M. and Rossi, J. J. (2017) 'Molecular mechanisms of Dicer : endonuclease and enzymatic activity', 0(December 2016), pp. 1603–1618. doi: 10.1042/BCJ20160759.

- Soong, B. *et al.* (1997) 'Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds.', *Annals of neurology*, 41(4), pp. 446–52. doi: 10.1002/ana.410410407.
- Sowa, A. S. *et al.* (2018) 'Karyopherin  $\alpha$ -3 is a key protein in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 controlling the nuclear localization of ataxin-3.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 115(11), pp. E2624–E2633. doi: 10.1073/pnas.1716071115.
- Stochmanski, S. J. *et al.* (2012) 'Expanded ATXN3 frameshifting events are toxic in Drosophila and mammalian neuron models', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 21(10), pp. 2211–2218. doi: 10.1093/hmg/ddx036.
- Stopford, M. J. *et al.* (2017a) 'C9ORF72 hexanucleotide repeat exerts toxicity in a stable, inducible motor neuronal cell model, which is rescued by partial depletion of Pten', *Human Molecular Genetics*. Narnia, 26(6), pp. 1133–1145. doi: 10.1093/hmg/ddx022.
- Stopford, M. J. *et al.* (2017b) 'C9ORF72 hexanucleotide repeat exerts toxicity in a stable, inducible motor neuronal cell model, which is rescued by partial depletion of Pten', *Human Molecular Genetics*. Narnia, 26(6), pp. 1133–1145. doi: 10.1093/hmg/ddx022.
- Streets, A. M. *et al.* (2013) 'Simultaneous Measurement of Amyloid Fibril Formation by Dynamic Light Scattering and Fluorescence Reveals Complex Aggregation Kinetics', *PLoS ONE*. Edited by I. Georgakoudi. Public Library of Science, 8(1), p. e54541. doi: 10.1371/journal.pone.0054541.
- Subramony, S. H. and Currier, R. D. (1996) 'Intrafamilial variability in Machado-Joseph disease', *Movement Disorders*. Wiley-Blackwell, 11(6), pp. 741–743. doi: 10.1002/mds.870110625.
- Sudarsky, L. and Coutinho, P. (1995) 'Machado-Joseph disease.', *Clinical neuroscience (New York, N.Y.)*, 3(1), pp. 17–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7614089> (Accessed: 14 August 2018).
- Sun, X. *et al.* (2015) 'Nuclear retention of full-length HTT RNA is mediated by splicing factors MBNL1 and U2AF65.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 5, p. 12521. doi: 10.1038/srep12521.
- Sutton, J. R. *et al.* (2017) 'Interaction of the polyglutamine protein ataxin-3 with Rad23 regulates toxicity in Drosophila models of Spinocerebellar Ataxia Type 3', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 26(8), pp. 1419–1431. doi: 10.1093/hmg/ddx039.
- Switonski, P. M. *et al.* (2015) 'A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines the genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD', *Neurobiology of Disease*. Elsevier B.V., 73, pp. 174–188. doi: 10.1016/j.nbd.2014.09.020.
- Sznajder, Ł. J. *et al.* (2019) 'Short Tandem Repeat Expansions and RNA-Mediated Pathogenesis in Myotonic Dystrophy', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 20(13), p. 3365. doi: 10.3390/ijms20133365.
- Tait, D. *et al.* (1998) 'Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix.', *Human molecular genetics*, 7(6), pp. 991–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9580663> (Accessed: 20 July 2018).
- Takahashi, N. *et al.* (1999) 'Synthesis of long trinucleotide repeats in vitro', *Neuroscience Letters*. Elsevier, 262(1), pp. 45–48. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00031-2.

- Takahashi, T. *et al.* (2008) 'Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 17(3), pp. 345–356. doi: 10.1093/hmg/ddm311.
- Takahashi, T., Katada, S. and Onodera, O. (2010) 'Polyglutamine Diseases: Where does Toxicity Come from? What is Toxicity? Where are We Going?', *Journal of Molecular Cell Biology*. Oxford University Press, 2(4), pp. 180–191. doi: 10.1093/jmcb/mjq005.
- Takiyama, Y. *et al.* (1993) 'The gene for Machado–Joseph disease maps to human chromosome 14q', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 4(3), pp. 300–304. doi: 10.1038/ng0793-300.
- Takiyama, Y. *et al.* (1994) 'A clinical and pathologic study of a large Japanese family with Machado-Joseph disease tightly linked to the DNA markers on chromosome 14q.', *Neurology*, 44(7), pp. 1302–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035935> (Accessed: 14 August 2018).
- Takiyama, Y. *et al.* (1995) 'Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease.', *Human molecular genetics*, 4(7), pp. 1137–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8528200> (Accessed: 14 August 2018).
- Taneja, K. L. *et al.* (1995) 'Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 128(6), pp. 995–1002. doi: 10.1083/JCB.128.6.995.
- Teixeira-Castro, A. *et al.* (2011) 'Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 20(15), pp. 2996–3009. doi: 10.1093/hmg/ddr203.
- Todd, P. K. and Paulson, H. L. (2009) 'RNA mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders', *Annals of Neurology*. Wiley-Blackwell, 67(3), p. NA-NA. doi: 10.1002/ana.21948.
- Todi, S. V *et al.* (2007) 'Cellular turnover of the polyglutamine disease protein ataxin-3 is regulated by its catalytic activity.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 282(40), pp. 29348–58. doi: 10.1074/jbc.M704126200.
- Todi, S. V *et al.* (2009) 'Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3.', *The EMBO journal*. EMBO Press, 28(4), pp. 372–82. doi: 10.1038/emboj.2008.289.
- Todi, S. V *et al.* (2010) 'Activity and cellular functions of the deubiquitinating enzyme and polyglutamine disease protein ataxin-3 are regulated by ubiquitination at lysine 117.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(50), pp. 39303–13. doi: 10.1074/jbc.M110.181610.
- Toonen, Lodewijk J A *et al.* (2018) 'Transcriptional profiling and biomarker identification reveal tissue specific effects of expanded ataxin-3 in a spinocerebellar ataxia type 3 mouse model.', *Molecular neurodegeneration*. BioMed Central, 13(1), p. 31. doi: 10.1186/s13024-018-0261-9.

- Toonen, Lodewijk J. A. *et al.* (2018) 'Transcriptional profiling and biomarker identification reveal tissue specific effects of expanded ataxin-3 in a spinocerebellar ataxia type 3 mouse model', *Molecular Neurodegeneration*. BioMed Central, 13(1), p. 31. doi: 10.1186/s13024-018-0261-9.
- Toulouse, A. *et al.* (2005) 'Ribosomal frameshifting on MJD-1 transcripts with long CAG tracts', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 14(18), pp. 2649–2660. doi: 10.1093/hmg/ddi299.
- Trockenbacher, A. *et al.* (2001) 'MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 29(3), pp. 287–294. doi: 10.1038/ng762.
- Trottier, Y. *et al.* (1998) 'Heterogeneous Intracellular Localization and Expression of Ataxin-3', *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 5(5), pp. 335–347. doi: 10.1006/NBDI.1998.0208.
- Tsoi, H. *et al.* (2011) 'Perturbation of U2AF65/NXF1-mediated RNA nuclear export enhances RNA toxicity in polyQ diseases', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 20(19), pp. 3787–3797. doi: 10.1093/hmg/ddr297.
- Tsoi, H. *et al.* (2012) 'CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 109(33), pp. 13428–33. doi: 10.1073/pnas.1204089109.
- Tu, Y. *et al.* (2017) 'Ataxin-3 promotes genome integrity by stabilizing Chk1', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(8), pp. 4532–4549. doi: 10.1093/nar/gkx095.
- Uchihara, T. *et al.* (2002) 'Attenuated nuclear shrinkage in neurons with nuclear aggregates - A morphometric study on pontine neurons of Machado-Joseph disease brains', *Experimental Neurology*, 178(1), pp. 124–128. doi: 10.1006/exnr.2002.8028.
- Urbanek, M. O. *et al.* (2016) 'Nuclear speckles are detention centers for transcripts containing expanded CAG repeats', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, 1862(9), pp. 1513–1520. doi: 10.1016/J.BBADIS.2016.05.015.
- Vinatier, G. *et al.* (2015) 'Quantification of Ataxin-3 and Ataxin-7 aggregates formed in vivo in Drosophila reveals a threshold of aggregated polyglutamine proteins associated with cellular toxicity', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(4), pp. 1060–1065. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.071.
- Wagner, S. D. *et al.* (2016) 'Dose-Dependent Regulation of Alternative Splicing by MBNL Proteins Reveals Biomarkers for Myotonic Dystrophy', *PLOS Genetics*. Edited by G. A. Cox. Public Library of Science, 12(9), p. e1006316. doi: 10.1371/journal.pgen.1006316.
- Wang, E. T. *et al.* (2012) 'Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins.', *Cell*. Elsevier, 150(4), pp. 710–24. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.041.
- Wang, G. *et al.* (2000) 'Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B.', *Human molecular genetics*, 9(12), pp. 1795–803. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915768> (Accessed: 30 July 2018).

- Wang, H., Ying, Z. and Wang, G. (2012) 'Ataxin-3 regulates aggresome formation of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) by editing K63-linked polyubiquitin chains.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(34), pp. 28576–85. doi: 10.1074/jbc.M111.299990.
- Wang, L.-C. *et al.* (2011) 'Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*', *Cellular and Molecular Life Sciences*. SP Birkhäuser Verlag Basel, 68(7), pp. 1255–1267. doi: 10.1007/s00018-010-0522-4.
- Wang, Q., Li, L. and Ye, Y. (2006) 'Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3.', *The Journal of cell biology*. Rockefeller University Press, 174(7), pp. 963–71. doi: 10.1083/jcb.200605100.
- Warrick, J. M. *et al.* (1998) 'Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*.'', *Cell*. Elsevier, 93(6), pp. 939–49. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81200-3.
- Warrick, J. M. *et al.* (2005) 'Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism.'', *Molecular cell*. Elsevier, 18(1), pp. 37–48. doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.030.
- Watanabe, H. *et al.* (1998) 'Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6.'', *Clinical genetics*, 53(1), pp. 13–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550356> (Accessed: 14 August 2018).
- Waugh, A. *et al.* (2002) 'RNAML: a standard syntax for exchanging RNA information.'', *RNA (New York, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 8(6), pp. 707–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088144> (Accessed: 20 March 2019).
- Weishäupl, D. *et al.* (2019) 'Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms.'', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 294(2), pp. 644–661. doi: 10.1074/jbc.RA118.005801.
- Weissman, A. M. (2001) 'Themes and variations on ubiquitylation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 2(3), pp. 169–178. doi: 10.1038/35056563.
- Wiatr, K. *et al.* (2019) 'Altered Levels of Proteins and Phosphoproteins, in the Absence of Early Causative Transcriptional Changes, Shape the Molecular Pathogenesis in the Brain of Young Presymptomatic Ki91 SCA3/MJD Mouse', *Molecular Neurobiology*. Springer US, pp. 1–35. doi: 10.1007/s12035-019-01643-4.
- Wills, N. M. and Atkins, J. F. (2006) 'The potential role of ribosomal frameshifting in generating aberrant proteins implicated in neurodegenerative diseases.'', *RNA (New York, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 12(7), pp. 1149–53. doi: 10.1261/rna.84406.
- Winborn, B. J. *et al.* (2008) 'The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains.'', *The Journal of biological chemistry*, 283(39), pp. 26436–43. doi: 10.1074/jbc.M803692200.
- Wojciechowska, M. *et al.* (2014) 'RAN translation and frameshifting as translational challenges at simple repeats of human neurodegenerative disorders', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 42(19), pp. 11849–11864. doi: 10.1093/nar/gku794.

- Wojciechowska, M. and Krzyzosiak, W. J. (2011) 'Cellular toxicity of expanded RNA repeats: focus on RNA foci', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 20(19), pp. 3811–3821. doi: 10.1093/hmg/ddr299.
- Xia, G. and Ashizawa, T. (2015) 'Dynamic changes of nuclear RNA foci in proliferating DM1 cells.', *Histochemistry and cell biology*. NIH Public Access, 143(6), pp. 557–64. doi: 10.1007/s00418-015-1315-5.
- Xicoy, H., Wieringa, B. and Martens, Gerard J M (2017) 'The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review.', *Molecular neurodegeneration*. BioMed Central, 12(1), p. 10. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0.
- Yamada, M. *et al.* (2001) 'Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease.', *Acta neuropathologica*, 101(2), pp. 140–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11271368> (Accessed: 14 August 2018).
- Yamaura, H., Hirai, H. and Yanagihara, D. (2013) 'Postural dysfunction in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3', *Neuroscience*. IBRO, 243, pp. 126–135. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.044.
- Yang, H. *et al.* (2018) 'PolyQ-expanded huntingtin and ataxin-3 sequester ubiquitin adaptors hHR23B and UBQLN2 into aggregates *via* conjugated ubiquitin', *The FASEB Journal*. Federation of American Societies for Experimental Biology Bethesda, MD, USA, 32(6), pp. 2923–2933. doi: 10.1096/fj.201700801RR.
- Yu, A. *et al.* (2014a) 'Protein aggregation can inhibit clathrin-mediated endocytosis by chaperone competition.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(15), pp. E1481-90. doi: 10.1073/pnas.1321811111.
- Yu, A. *et al.* (2014b) 'Protein aggregation can inhibit clathrin-mediated endocytosis by chaperone competition.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 111(15), pp. E1481-90. doi: 10.1073/pnas.1321811111.
- Yu, Y.-C. *et al.* (2009) 'Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease', *Journal of Neuroscience Research*. Wiley-Blackwell, 87(8), pp. 1884–1891. doi: 10.1002/jnr.22011.
- Yu, Z., Teng, X. and Bonini, N. M. (2011) 'Triplet Repeat–Derived siRNAs Enhance RNA–Mediated Toxicity in a Drosophila Model for Myotonic Dystrophy', *PLoS Genetics*. Edited by C. E. Pearson. Public Library of Science, 7(3), p. e1001340. doi: 10.1371/journal.pgen.1001340.
- Yuan, Y. *et al.* (2007) 'Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 35(16), pp. 5474–5486. doi: 10.1093/nar/gkm601.
- Yusuf, M. *et al.* (2013) 'Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y.', *Neurogenetics*. Springer, 14(1), pp. 63–70. doi: 10.1007/s10048-012-0350-9.
- Zamore, P. D. *et al.* (2000) 'RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.', *Cell*. Elsevier, 101(1), pp. 25–33. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80620-0.

- Zawacki, T. M. *et al.* (2002) 'Executive and emotional dysfunction in Machado-Joseph disease', *Movement Disorders*. Wiley-Blackwell, 17(5), pp. 1004–1010. doi: 10.1002/mds.10033.
- Zeng, L. *et al.* (2018) 'Loss of the Spinocerebellar Ataxia type 3 disease protein ATXN3 alters transcription of multiple signal transduction pathways.', *PLoS one*. Public Library of Science, 13(9), p. e0204438. doi: 10.1371/journal.pone.0204438.
- Zhang, K. (2015) 'Endoplasmic reticulum stress response and transcriptional reprogramming', *Frontiers in Genetics*. Frontiers, 5, p. 460. doi: 10.3389/fgene.2014.00460.
- Zhang, N. and Ashizawa, T. (2017) 'RNA toxicity and foci formation in microsatellite expansion diseases.', *Current opinion in genetics & development*. NIH Public Access, 44, pp. 17–29. doi: 10.1016/j.gde.2017.01.005.
- Zhang, Q. *et al.* (2016) 'Assessing a peptidyl inhibitor-based therapeutic approach that simultaneously suppresses polyglutamine RNA- and protein-mediated toxicities in patient cells and *Drosophila*.' , *Disease models & mechanisms*. The Company of Biologists Ltd, 9(3), pp. 321–34. doi: 10.1242/dmm.022350.
- Zhang, Q. *et al.* (2018) 'A peptidyl inhibitor for neutralizing expanded CAG RNA-induced nucleolar stress in polyglutamine diseases.', *RNA (New York, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 24(4), pp. 486–498. doi: 10.1261/rna.062703.117.
- Zheng, J. Q. (2000) 'Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions', *Nature*, 403(6765), pp. 89–93. doi: 10.1038/47501.
- Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2011) 'Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community', *Cell Calcium*. Churchill Livingstone, 50(3), pp. 211–221. doi: 10.1016/J.CECA.2011.03.003.
- Zhong, X. and Pittman, R. N. (2006) 'Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates', *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 15(16), pp. 2409–2420. doi: 10.1093/hmg/ddl164.
- Zhou, Y. X. *et al.* (1997) 'Machado-Joseph disease in four Chinese pedigrees: molecular analysis of 15 patients including two juvenile cases and clinical correlations.', *Neurology*, 48(2), pp. 482–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040742> (Accessed: 14 August 2018).
- Zu, T. *et al.* (2011) 'Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108(1), pp. 260–5. doi: 10.1073/pnas.1013343108.
- Zuker, M. (2003) 'Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 31(13), pp. 3406–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824337> (Accessed: 20 March 2019).
- Zuker, M. and Jacobson, A. B. (1998) 'Using reliability information to annotate RNA secondary structures.', *RNA (New York, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4(6), pp. 669–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622126> (Accessed: 20 March 2019).