

ROZPRAWA DOKTORSKA

Wpływ poziomu białka CYP46A1 w mózgu mysiego modelu Ki150 w kontekście roli metabolizmu cholesterolu w patogenezie ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3.

Mgr Ewelina Jesion

Praca wykonana pod opieką promotora
dr hab. Macieja Figla, prof. IChB PAN

oraz promotora pomocniczego
dr inż. Magdaleny Surdyki

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań 2022



Rozprawa doktorska została wykonana w ramach uczestnictwa w projekcie *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”*, realizowanym wspólnie przez trzy jednostki:

- Politechnikę Poznańską,
- Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

w ramach Umowy o dofinansowanie nr POWR.03.02.00-00-I011/16.

Projekt *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”* jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020.



Dziękuję doktorowi habilitowanemu Maciejowi Figlowi za przekazaną wiedzę,
wsparcie merytoryczne i ukierunkowanie zainteresowań naukowych.

Dziękuję dr inż. Magdalenie Surdyce za nieocenioną motywację i pomoc,
bez których niniejsza praca na pewno by nie powstała,
nieustanną opiekę, ukierowanie prac,
a także wsparcie merytoryczne i eksperymentalne.

Dziękuję kolegom i koleżankom z Zakładu Neurobiologii Molekularnej,
szczególnie Żanecie Kalinowskiej-Pośka,
za współtworzenie wspaniałej drużyny i atmosfery, dzięki której
wykonanie pracy doktorskiej było pełne przyjemności.

Dziękuję wszystkim kolegom i koleżankom
z Instytutu Chemii Bioorganicznej za miłą i radosną atmosferę w pracy.

Dziękuję Rodzicom, Hani i Ilii za wsparcie w dążeniu do celu,
cierpliwość, oraz za to, że zawsze mogę na Was liczyć.

SPIS TREŚCI

1.	Streszczenie	7
2.	Abstract.....	9
3.	Wprowadzenie.....	11
3.1.	Metabolizm cholesterolu w mózgu	11
3.1.1.	Synteza i wydalanie mózgowego cholesterolu	11
3.1.2.	Zaburzenia przemian cholesterolu w mózgu	14
3.2.	Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3)	15
3.2.1.	Genetyka SCA3	16
3.2.2.	Kliniczne objawy SCA3	17
3.2.3.	Białko Ataksyna 3.....	18
3.3.	Terapie genowe	23
3.3.1.	Terapeutyki w terapii genowej SCA3.....	23
3.4.	Zwierzęce modele SCA3.....	26
3.4.1.	Mysie modele w terapii genowej	26
3.4.2.	Model SCA3 knock-in Ki91	27
4.	Cel pracy.....	29
5.	Materiały i Metody	30
5.1.	Materiały	30
5.1.1.	Konstrukty genetyczne – wektory wirusowe AAV	30
5.1.2.	Materiał biologiczny	31
5.1.3.	Oligonukleotydy	31
5.1.4.	Ważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne.....	32
5.1.5.	Roztwory i bufony	33
5.1.6.	Bufory dostępne komercyjnie:.....	33
5.1.7.	Zestawy i materiały komercyjne.....	34
5.1.8.	Przeciwciała	35

5.1.9.	Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe.....	35
5.1.10.	Programy komputerowe i bazy danych	36
5.2.	Metody	37
5.2.1.	Hodowla.....	37
5.2.2.	Izolacja DNA	38
5.2.3.	PCR i elektroforeza kapilarna.....	38
5.2.4.	Operacje stereotaktyczne	39
5.2.5.	Testy behawioralne	40
5.2.6.	Pobór tkanek	41
5.2.7.	Western blot.....	42
5.2.8.	qPCR.....	43
5.2.9.	Barwienia immunofluorescencyjne	45
5.2.10.	Statystyka.....	46
6.	Wyniki	47
6.1.	Schemat metody selektywnej i efektywnej transdukcji populacji komórek mózdzku wektorami wirusowych AAVrh10 oraz AAV-PHP.eB.....	47
6.2.	Transdukcja komórek mózdzku po iniekcjach wektorem AAVrh10.....	48
6.2.1.	Iniekcje lobularne	48
6.2.2.	Iniekcje do jąder głębokich mózdzku	54
6.3.	Transdukcja komórek mózdzku po iniekcjach wektorem AAV-PHP.eB.....	56
6.3.1.	Iniekcje retro-orbitalne	56
6.3.2.	Iniekcje lobularne	57
6.3.3.	Iniekcje do jąder głębokich mózdzku	61
6.4.	Ocena poziomu białka CYP46A1 w nietraktowanym mysim modelu SCA3..	63
6.5.	Wpływ iniekcji lobularnych wektorem AAVrh10 na zmiany behawioralne i parametry molekularne.....	65
6.5.1.	Ocena zmian behawioralnych w mysim modelu typu dzikiego WT.....	65

6.5.2.	Ocena zmian poziomu białka CYP46A1 metodą Western blot w mysim modelu typu dzikiego WT	69
6.6.	Wpływ iniekcji lokalnych wektorem AAV-PHP.eB na zmiany behawioralne i parametry molekularne.....	71
6.6.1.	Ocena zmian behawioralnych po iniekcjach do DCN wektorem AAV-PHP.eB	71
6.6.2.	Mysi model typu dzikiego WT	71
6.6.3.	Mysi model SCA3	75
6.6.4.	Ocena zmian poziomu białka CYP46A1 metodą Western blot po iniekcjach do DCN wektorem AAV-PHP.eB	79
6.6.5.	Ocena zmian poziomu białka CYP46A1 metodą immunofluorescencyjną po iniekcjach do DCN wektorem AAV-PHP.eB	81
6.6.6.	Ocena wyciszenia genu CYP46A1 metodą qPCR po iniekcjach do DCN wektorem AAV-PHP.eB	84
7.	Dyskusja i perspektywy.....	85
8.	Wnioski.....	95
9.	Bibliografia.....	96
10.	Spis wybranych skrótów	121

1. Streszczenie

Zaburzenia przemian cholesterolu w mózgu związane są z przeważającą częścią chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3), jak również chorób neurologicznych takich jak schizofrenia, padaczka czy autyzm. SCA3 jest chorobą neurodegeneracyjną, obecnie nieuleczalną. Jedną z głównych struktur zdegenerowanych w SCA3 jest mózdzek, w którym neurony Purkinjego (PC), grają najważniejszą funkcję w przemianie cholesterolu mózgowego, stanowiąc główne źródło 24-hydroksylazy cholesterolu (CYP46A1). Enzym ten wpływa na ilość cholesterolu w mózgu, poprzez kontrolę wydalania tego związku przez barierę krew-mózg. CYP46A1 jest także kluczowym aktywatorem szlaku mewalonianowego, którego produkty pochodne mają istotny wpływ na szlaki sygnalizacyjne regulujące ważne procesy komórkowe i molekularne, często związane z neurodegeneracją. Dlatego modulacja poziomu CYP46A1 może być podstawą skutecznej terapii SCA3 dostarczanej z udziałem nośników AAV, które już obecnie są stosowane w terapiach genowych.

Skuteczna terapia genowa w chorobach układu nerwowego podawana z pomocą AAV jest uzależniona od osiągnięcia zadowalającej biodystrybucji, która w przypadku SCA3, powinna być skupiona na PC. Na podstawie eksperymentów przeprowadzonych w pracy doktorskiej poznano właściwości wektorów wirusowych AAVrh10 oraz AAV-PHP.eB. Wektory wirusowe o serotypie AAVrh10 oraz AAV-PHP.eB mają zdolność do transportu anterogradowego oraz retrogradowego. Wykorzystując sieć projekcji komórek mózdzku oraz technikę wstrzyknięć bezpośrednich osiągnęliśmy transdukcję szerokiej puli populacji komórek mózdzku z powtarzalnym wzorem transdukcji. Opracowano metodę selektywnych i efektywnych bezpośrednich iniekcji stereotaktycznych z zastosowaniem wymienionych serotypów wektorów wirusowych, w szczególności do transdukcji PC mózdzku, poprzez podanie do jąder głębokich mózdzku (DCN).

Wszelkie zmiany CYP46A1 mogą zmieniać poziom cholesterolu w mózgu, a tym samym wpływać na przebieg i ciężkość fenotypu chorób związanych z jego metabolizmem. Wykazaliśmy, że poziom enzymu CYP46A1 jest obniżony w mózdzku transgenicznych myszy SCA3 Ki150, które wykazują zmiany motoryczne podobne do tych obserwowanych u pacjentów SCA3. Założyliśmy, że zmiany u pacjentów i zmiany fenotypowe u myszy SCA3 Ki150 mogą być związane z zaburzoną gospodarką cholesterolu w mózdzku.

Podanie reagentów shRNA, które modulują poziom *CYP46A1*, do modelu WT i SCA3 Ki150 spowodowały inhibicję ekspresji *CYP46A1*. Testy wykazały poprawę sprawności motorycznej u myszy, które otrzymały shRNA hamujące ekspresję *CYP46A1*, w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych. Przedstawiamy jeden z pierwszych wyników łączących redukcję poziomu *CYP46A1* w mózdzku, z poprawą fenotypu w mysim modelu WT i zaburzeń neurodegeneracyjnych SCA3 Ki150. Prawdopodobnie zmniejszenie ekspresji genu *CYP46A1*, a w konsekwencji obniżenie poziomu białka *CYP46A1*, poprawia funkcjonowanie neuronów Purkinjego, na skutek możliwej aktywacji mechanizmów kompensujących, których zadaniem jest promowanie przeżywalności neuronów. Nasze badania prezentują *CYP46A1* jako potencjalny cel terapeutyczny i wskazują potrzebę szczegółowego i szerszego zrozumienia obniżonej ekspresji *CYP46A1* w SCA3.

2. Abstract

Disorders of cholesterol metabolism in the brain are associated with many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's diseases, spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), and neurological diseases such as schizophrenia, epilepsy, and autism. SCA3 is a neurodegenerative disease, currently incurable. One of the main brain structures degenerated in SCA3 is the cerebellum, where the cerebellar Purkinje neurons (PCs) play an essential function in cholesterol metabolism and are the primary source of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1). The enzyme affects the cholesterol level in the brain by controlling the excretion of this compound across the blood-brain barrier. CYP46A1 is also a vital activator of the mevalonate pathway, whose downstream products affect signaling pathways regulating important cellular and molecular processes often associated with neurodegeneration. Therefore, modulation of CYP46A1 levels may be the basis for effective SCA3 therapy delivered with AAV carriers already being used in gene therapies.

Successful gene therapy in nervous system diseases delivered with AAVs depends on achieving satisfactory biodistribution, which in the case of SCA3, should be focused on PCs. Based on experiments conducted in the dissertation, the properties of AAVrh10 and AAV-PHP.eB viral vectors were discovered. The AAVrh10 and AAV-PHP.eB viral vectors can transport genetic load in anterograde and retrograde directions. Using the cerebellar cell projection network and the direct injection technique, we achieved transduction of a wide pool of cerebellar cell populations with a reproducible transduction pattern. We have developed a method for selective and efficient direct stereotactic injections using the aforementioned viral vector serotypes, particularly for the transduction of cerebellar PCs by administration to the deep cerebellar nuclei (DCN).

Alteration of CYP46A1 can change cholesterol levels in the brain and thus affect the course and disease phenotype severity related to cholesterol metabolism. We have shown that the levels CYP46A1 enzyme are reduced in the cerebellum of SCA3 Ki150 transgenic mice that exhibit motor changes similar to those in SCA3 patients. We hypothesized that the changes in patients and the phenotypic changes in SCA3 Ki150 mice might be related to impaired cerebellar cholesterol metabolism.

Administration of shRNA reagents that modulated CYP46A1 levels to the WT and SCA3 Ki150 models resulted in the inhibition of *CYP46A1* expression. Tests showed improved motor performance in mice that received shRNAs that decreased *CYP46A1*

expression compared to corresponding control groups. We present one of the first results linking the reduction of CYP46A1 levels in the murine with improved phenotype in a mouse model of WT and SCA3 Ki150. Reducing *CYP46A1* gene expression, and consequently a decrease in CYP46A1 protein levels, may improve Purkinje neuronal function by promoting neuronal survival as a result of the possible activation of compensatory mechanisms. We postulate the CYP46A1 as SCA3 therapeutic target, and we underline the necessity of a broader understanding of the role of *CYP46A1* expression level and the mechanism mediating disease amelioration in SCA3.

3. Wprowadzenie

3.1. Metabolizm cholesterolu w mózgu

3.1.1. Synteza i wydalanie mózgowego cholesterolu

Najwyższy poziom cholesterolu wśród wszystkich organów ludzkiego ciała, występuje w mózgu i stanowi on około jednej czwartej części cholesterolu całego organizmu, mimo że jego masa odpowiada tylko około 2% całkowitej masy ciała (J. M. Dietschy i Turley 2001). Ze względu na to, że mózg jest oddzielony od obwodowej puli cholesterolu organizmu przez barierę krew-mózg (BBB), która w prawidłowych warunkach jest nieprzepuszczalna dla lipoprotein osocza, produkcja cholesterolu *in situ* jest bardzo istotna (John M. Dietschy i Turley 2004; John M. Dietschy 2009). Dlatego też aby sprostać zapotrzebowaniu mózgu, cholesterol pochodzi prawie wyłącznie z bardzo aktywnej biosyntezy *de novo* poprzez szlak mewalonianowy. Cholesterol jest niezbędny do prawidłowej synaptogenezy i odgrywa ważną rolę w rozwoju aksonów, uwalnianiu neuroprzekaźników i produkcji neurosteroidów (Camargo, Smit, i Verheijen 2009; John M. Dietschy 2009; Pfrieger i Ungerer 2011; Martín, Pfrieger, i Dotti 2014).

Szlak mewalonianowy prowadzony jest w dwóch równoległych i wzajemnie powiązanych procesach obejmujących serię reakcji enzymatycznych nazwanych ścieżkami Kandutscha-Russella (KR) i Blocha (Kandutsch i Russell 1960; Bloch 1965). Reakcje enzymatyczne tego szlaku przekształcają acetylo-CoA (Rys. 1), w różne sterole i szereg nie sterolowych izoprenoidów, takich jak pirofosforan farnezyli (FPP), pirofosforan geranylogeranyli (GGPP), ubichinon i dolichol (Bloch 1965; Panda, Basak, i Panda 2011). Uważa się, że neurony preferencyjnie posługują się szlakiem KR, podczas gdy komórki glijowe są zależne od szlaku Blocha (J. Zhang i Liu 2015). Komórki odpowiedzialne za syntezę cholesterolu w dorosłym mózgu są nadal przedmiotem dyskusji. Neurony mają niższy wskaźnik syntezy cholesterolu niż astrocyty (Nieweg, Schaller, i Pfrieger 2009) i pozyskują go z astrocytów, w celu utworzenia i utrzymania aksonów, dendrytów i synaps (Mauch i in. 2001; Ullian, Christopherson, i Barres 2004; Pfrieger i Ungerer 2011). Dowiedziono, że supresja syntezy cholesterolu *in vivo* w dorosłych neuronach mózdzku nie wpłynęła na żywotność, kształt i gęstość neuronów, ani na kształt i gęstość synaps (Fünfschilling i in. 2007). Natomiast potwierdzono, że rozwijające się neurony produkują znacznie większe ilości cholesterolu przeliczając na komórkę, niż astrocyty. Sugeruje się, że endogenna synteza steroli w rozwijających się

neuronach jest kluczowym i skomplikowanym procesem podczas rozwoju mózgu (Genaro-Mattos i in. 2019).

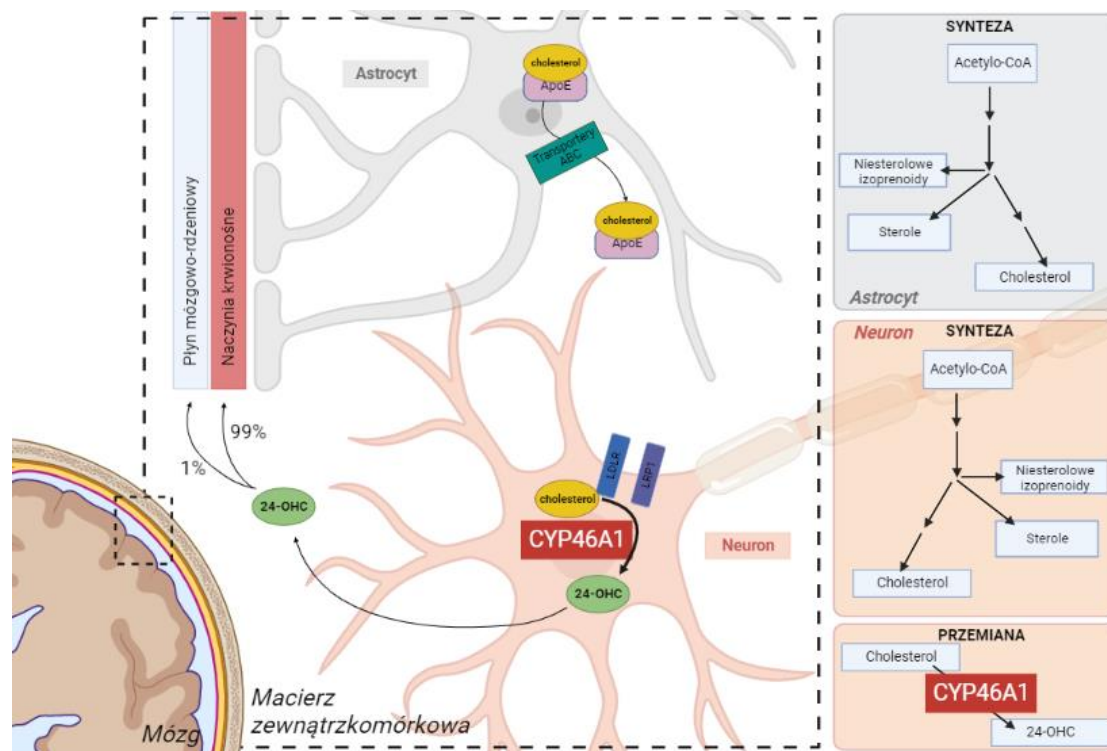
Cholesterol syntetyzowany w astrocytach (Rys.1), łączy się z apolipoproteiną E (ApoE) tworząc lipoproteiny (Mauch i in. 2001). Lipoproteiny następnie wydzielane są do macierzy zewnątrzkomórkowej przez, znajdujące się na błonach komórkowych astrocytów, transportery ABC (ang. ATP-binding cassette; ABC), by następnie uległy przeniesieniu do neuronów (de Chaves i Narayanaswami 2008; Bu 2009). Lipoproteiny zawierające ApoE są pobierane przez dwa ważne funkcjonalnie receptory dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL); receptor LDL (LDLR) i receptor LDL związany z białkiem 1 (LRP1). Chociaż oba są charakterystyczne dla astrocytów i neuronów, LDLR ulega silnej ekspresji w astrocytach, natomiast LRP1 głównie w neuronach (Rebeck i in. 1993). Po endocytozie z udziałem receptora, ApoE jest recyrkulowana do błony plazmatycznej, a cholesterol jest wykorzystywany do przemian i naprawy błony komórkowej, tworzenia osłonek mielinowych, synaptogenezy i uwalniania neuroprzekazników (Petrov, Kasimov, i Zefirov 2017; Gamba i in. 2019; Hussain i in. 2019).

W celu utrzymania stałego poziomu, nadmiar cholesterolu jest metabolizowany przez trzy różne ścieżki. Dwie pierwsze zawierają proces estryfikacji i późniejsze wewnątrzkomórkowe magazynowanie w formie kropelek lipidowych, lub bezpośrednio wydalanie poprzez transportery ABC. Głównym mechanizmem wydalania mózgowego cholesterolu jest jednak jego konwersja w oksysterol, 24S-hydroksycholesterol (24-OHC) (Rys.1), który ma możliwość przekraczania BBB do krążenia ogólnego (99%) napędzanego gradientem stężeń, skąd ulega dalszej eliminacji w wątrobie (Lütjohann i in. 1996; Ingemar Björkhem i in. 1998; Meaney i in. 2002; I. Björkhem 2006). Dlatego, że głównym źródłem pochodzenia 24-OHC jest konwersja w mózgu, jest on uważany za interesujący biomarker w osoczu do potencjalnego monitorowania przemian cholesterolu w mózgu (Lütjohann i in. 1996). Szacuje się, że około 1% 24-OHC syntetyzowanego w mózgu dostaje się do płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF) (Lütjohann i in. 1996; Valerio Leoni 2009). Ponadto, 24-OHC może być wychwytywany przez astrocyty i neurony, zwiększając ekspresję genów zaangażowanych w przemiany cholesterolu (Gamba i in. 2015). Tempo wydalania cholesterolu odpowiada mniej więcej procesowi syntezy cholesterolu *de novo* w mózgu (I. Björkhem, Lund, i Rudling 1997).

Kluczowym enzymem odpowiedzialnym za syntezę 24-OHC, jest 24-hydroksylaza cholesterolu (CYP46A1) należąca do rodziny cytochromu P450 (Meaney i in. 2001). Zlokalizowana jest szczególnie w neuronach hipokampa, mózdzku i kory

mózgowej (Ramirez, Andersson, i Russell 2008). Do głównych funkcji CYP46A1 należy neuronalna odpowiedź na stres (Ingemar Björkhem i in. 1998; Sodero i in. 2011). CYP46A1 bierze udział w aktywacji szlaku mewalonianowego, którego związki pośrednie odgrywają ważną funkcję w neuronalnym transporcie wewnątrzkomórkowym, sygnalizacji, jak i w procesie komórkowej agregacji i autofagii (T. J. Kotti i in. 2006; Sodero i in. 2011).

Co ciekawe, stopniowa utrata CYP46A1 nie powoduje zmian w stężeniu cholesterolu ani innych oksysteroli (Meljon, Wang, i Griffiths 2014). Możliwe, że pośredniczą w tym skomplikowane mechanizmy regulacyjne i sprzężenia zwrotnego do utrzymania równowagi cholesterolu. Natomiast nagłe zaburzenia funkcji CYP46A1 zmieniają stężenie cholesterolu i 24S-OHC (Sodero i in. 2012; Djelti i in. 2015; Bialer i in. 2018; Kacher i in. 2019), co może mieć wpływ na fizjologię mózgu. Pozbawienie lub zahamowanie ekspresji genu CYP46A1, na podstawie którego powstaje białko, powoduje trudności w uczeniu się, zwiększoną śmiertelność neuronów i podwyższenie poziomu peptydów β -amyloidu u myszy (T. J. Kotti i in. 2006; Djelti i in. 2015).



Rysunek 1. Synteza cholesterolu w komórkach, transport cholesterolu pomiędzy astrocytem, a neuronem oraz wydalenie 24-OHC z mózgu do naczyń krwionośnych i płynu mózgowo-rdzeniowego (Gamba i in. 2021). W procesie wieloetapowych reakcji enzymatycznych szlaku mewalonianowego z zastosowaniem acetylo-CoA, produkowany jest mózgowy cholesterol. Pochodzący z astrocytów cholesterol z ApoE, jest wydzielany do macierzy zewnątrzkomórkowej w zależnym od transporterów ABC procesie. W neuronach cholesterol ulega przemianom do 24-OHC, który ma zdolność do przekraczania BBB, jak również może zostać wychwycony przez astrocyty z macierzy zewnątrzkomórkowej (Mohamed i in. 2015).

3.1.2. Zaburzenia przemian cholesterolu w mózgu

Defekty metabolizmu cholesterolu w mózgu mogą przyczyniać się do wielu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak AD, HD, PD, ataksjach rdzeniowo-mózdkowych, choroby Niemann-Pick typu C, stwardnienia rozsianego (MS) czy stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) (Loftus i in. 1997; Korade i Kenworthy 2008; Vance 2012; Boussicault i in. 2016; Vejux i in. 2018; X. Huang i in. 2019; Nóbrega i in. 2019; Sodero 2021).

Badania osocza pacjentów z chorobą Alzheimera wykazały zwiększone stężenie 24-OHC (Lütjohann i in. 2000; Zuliani i in. 2011), podczas gdy w innych badaniach jego poziom był obniżony (Bretillon i in. 2000; Solomon i in. 2009). Poniekąd przytoczone rezultaty mogą świadczyć o tym, że stężenie 24-OHC jest podwyższone na wczesnym lub łagodnym etapie AD, za to ulega zmniejszeniu w bardziej zaawansowanym stadium choroby (Papassotiropoulos i in. 2000; Hughes i in. 2012). Poziom 24-OHC w osoczu jest również obniżony w HD (Valerio Leoni i in. 2008; 2013).

Poziom białka CYP46A1 i metabolitów cholesterolu jest obniżony w mózгах pacjentów AD, HD oraz mysich modeli transgenicznych tych chorób (Burlot i in. 2015; Boussicault i in. 2016). Również 24S-OHC, będący pochodną cholesterolu, jest obniżony w osoczu krwi pacjentów HD (Valerio Leoni i in. 2008; V. Leoni i in. 2011). Zastosowanie terapii genowej opartej na indukowanej nadekspresji genu CYP46A1 w chorobach AD i HD koryguje ich obraz fenotypowy. Podwyższenie poziomu CYP46A1 w mózgu mysiego modelu AD, za pomocą iniekcji wektorów AAV, zapobiega objawom neurodegeneracyjnym i zaburzeniom behawioralnym z bezpośrednim wpływem na patologie wynikające z obecności amyloidu (Hudry i in. 2010) oraz białka tau (Burlot i in. 2015). Podobna strategia terapeutyczna wprowadzona do regionu prądkowia dwóch mysich modeli HD (R6/2 i ZQ175) (Boussicault i in. 2016) koryguje fenotyp chorobowy, redukuje zaburzenia motoryczne, ogranicza atrofię neuronów i ogranicza agregację zmutowanego białka huntingtyny.

Rola przemiany cholesterolu w mózgu w chorobie SCA3 jest nadal mało poznana. Natomiast dowiedziono występowania zaburzonej gospodarki cholesterolu oraz obniżonego poziomu białka CYP46A1 w tkankach mózdzku pobranych od pacjentów SCA3. Jednocześnie zademonstrowano zmniejszoną akumulację agregatów ataksyny-3, ograniczenie neuropatologii i defektów motorycznych związanych z chorobą w modelach SCA3, powiązane z dostarczeniem terapii genowej AAV i nadekspresją genu CYP46A1 (Nóbrega i in. 2019).

3.2. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3)

Ataksję rdzeniowo-mózdkową typu 3 (ang. spinocerebellar ataxia type 3; SCA3) po raz pierwszy opisano w USA w 1972 roku jako nową formę ataksji mózdkowej dziedziczonej autosomalnie dominująco. Zaobserwowano ją u emigrantów pochodzących z Azorów, gdzie częstość występowania jest bardzo wysoka, na należącej do Azorów wyspie Flores – 1/239 (Nakano, Dawson, i Spence 1972; Bettencourt i in. 2008). Średnia częstość występowania SCA3 na świecie wynosi 1–5 / 100 000 (T. Li i in. 2018), a wyższą względną częstotliwość, czyli procent przypadków SCA3 w ogólnej liczbie innych SCA, obserwuje się w Portugalii (57.8%), Brazylii (59.6%), Japonii (43%), Chinach (62.6%) i Niemczech (42%) (L. Schöls i in. 1997; Takano i in. 1998; Vale i in. 2010; de Castilhos i in. 2014; Z. Chen i in. 2018; Buijsen i in. 2019). Natomiast bardzo

niską względną częstotliwość obserwuje się w południowej Afryce i we Włoszech (Bettencourt i Lima 2011).

3.2.1. Genetyka SCA3

SCA3 nazwana również chorobą Machado-Josepha (ang. Machado-Joseph Disease; MJD), jest jedną z neurodegeneracyjnych chorób polyQ (Lieberman, Shakkottai, i Albin 2019). Do tej grupy chorób należy pięć innych ataksji rdzeniowo-mózdkowych (SCA1, 2, 6, 7, 17) (Henry L. Paulson i in. 2017), jak również choroba Huntingtona, zanik jądra zębatego, czerwienego, gałki bladej i jądra Luysa (ang. dentatorubral-pallidoluysian atrophy; DRPLA) oraz rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (ang. spinobulbar muscular atrophy; SBMA) (Stoyas i La Spada 2018). Znanym czynnikiem etiologicznym wszystkich chorób polyQ jest wspólny typ mutacji, ekspansja powtórzeń CAG w odcinkach kodujących odpowiednich genów, przekładająca się na występowanie wydłużonego traktu poliglutaminowego w białku. Ekspansja powtórzeń CAG w SCA3 zlokalizowana jest w egzonie 10 genu ATXN3 (Durr 2010; Gardiner i in. 2019). W genie ataksyny-3 osób zdrowych liczba powtórzeń CAG wynosi zazwyczaj między 14 a 42, natomiast u pacjentów cierpiących na SCA3 liczba powtórzeń CAG podnosi się od 56 do 91 w jednym allelu ATXN3 (Riess i in. 2008; Udo Rüb, Brunt, i Deller 2008; Lima i Raposo 2018). Z SCA3 związane jest również pojęcie premutacji, które polega na niepełnej penetracji choroby, co oznacza, że pacjenci w pojedynczym allelu posiadają od 45 do 55 powtórzeń CAG (Thomas Klockgether, Mariotti, i Paulson 2019). Pomimo, że wartości ciągu powtórzeń charakterystyczne dla niepełnej penetracji choroby nie są w pełni zdefiniowane, występuje przypadek asymptomatycznego pacjenta SCA3 z 68 powtórzeniami CAG (van Alfen i in. 2001). Pojedyncze przypadki o najdłuższym raportowanym ciągu powtórzeń CAG, to te zawierające 86 oraz 83 powtórzeń w genie (Y. X. Zhou i in. 1997). Do rzadkich należą przypadki homozygotycznych pacjentów z SCA3, u których osoba dziedziczy dwie kopie zmutowanego genu ATXN3, co prowadzi do bardziej nasilonych objawów i wcześniejszego początku choroby (Lerer i in. 1996; Sobue i in. 1996; D. R. Carvalho i in. 2008). Choroba SCA3 została związana ze zjawiskiem antycypacji (charakterystycznym dla chorób polyQ SCA), które polega na wcześniejszym pojawianiu się symptomów choroby uwarunkowanej genetycznie o coraz większym nasileniu w następujących po sobie pokoleniach (Maciel i in. 1995; Leotti i in. 2021). Co więcej, ojcowska transmisja zmutowanego genu ATXN3 często wiąże się z

silniejszą ekspansją powtórzeń w kolejnym pokoleniu w porównaniu do transmisji matczynej (McMurray 2010; Orr 2012; Kim i Cho 2015; Souza i in. 2016).

3.2.2. Kliniczne objawy SCA3

Pierwsze objawy SCA3 pojawiają się w około 3-5 dekadzie życia (Udo Rüb i in. 2013). Choroba charakteryzuje się postępującą ataksją mózdkową ze zmiennymi objawami, w tym objawami piramidowymi, dystoniczno-sztywnym zespołem pozapiramidowym, znaczną amiotrofią obwodową i uogólnioną arefleksją oraz postępującą oftalmoplegią zewnętrzną. Rozpoznanie opiera się na podstawie wywiadu z pacjentem oraz wywiadzie rodzinnym (D'Abreu i in. 2010). Diagnoza pacjenta jest ustalana na podstawie molekularnego badania genetycznego, w którym zidentyfikowano heterozygotyczną ekspansję powtórzeń CAG w genie ATXN3. Rezonans magnetyczny mózgu (ang. Magnetic Resonance Imaging; MRI) najczęściej ujawnia atrofię mózdku (Bürk i in. 1996). Najczęściej obserwowanym zaburzeniem jest powiększenie czwartej komory (Onodera i in. 1998), odzwierciedlające zanik mózdku i pnia mózgu. Wyniki badań neurologicznych mają tendencję do ewoluowania w miarę postępu choroby. Spektroskopia rezonansu magnetycznego mózgu (ang. Magnetic Resonance Spectroscopy; MRS) może wykryć wczesne nieprawidłowości neurochemiczne w regionach mózgu w SCA3 (Joers i in. 2018). Pacjenci mają ograniczoną jakość życia, ponieważ choroba postępuje. Śmierć następuje 6 do 29 lat od wystąpienia choroby, głównie z powodu powikłań płucnych i kacheksji (Sequeiros i Coutinho 1993; Dürr i in. 1996; Ludger Schöls i in. 2004; Durr 2010; Vale i in. 2010; Diallo i in. 2018).

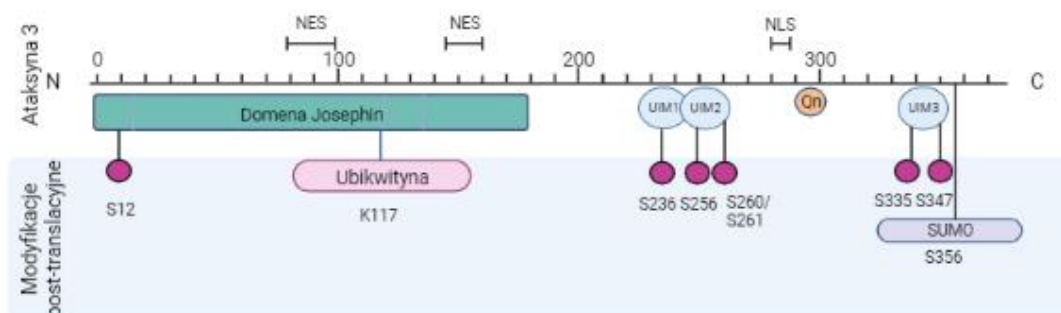
Najsilniejsza degeneracja neuronów obserwowana jest w mózdku (głównie w jądrach głębokich mózdku), kolumnach grzbietowych i drogach rdzeniowo-mózdkowych w rdzeniu kręgowym, a także w pniu mózgu (w tym w istocie czarnej), jądrach podkorowych i samej korze mózgowej. Degeneracja w jądrze zębatym mózdku i jądrach grzbietowych w kolumnach Clarke'a odpowiadają za rozwój ataksji mózdkowej, zaburzenia chodu, równowagi i koordynacji ruchowej, kiedy degeneracja istoty czarnej związana jest z parkinsonizmem. Degeneracja jądra nerwu podjęzykowego i zanik jąder motorycznych zlokalizowanych w pniu mózgu jest przyczyną złożonych zaburzeń motorycznych oczu i języka, zaburzeń mowy (dyzartii) i połykania (dysfagii) (Koeppen 2018). Neurodegeneracja nie jest ograniczona do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), u pacjentów obserwuje się również postępującą neuropatię

obwodową, szczególnie w dystalnych częściach kończyn, prowadzącą do atrofii mięśni i arefleksji (Suga i in. 2014; Linnemann i in. 2016).

3.2.3. Białko Ataksyna 3

Struktura ataksyny-3

Ataksyna-3 jest białkiem o wadze około 42kDa, produkowanym powszechnie w wielu typach komórek tkanek obwodowych i neuronalnych (H. L. Paulson i in. 1997; Trottier i in. 1998; Ichikawa i in. 2001). Białko ataksyny-3 zbudowane jest z końca N z domeną katalityczną Josephin, 2-3 motywów oddziałujących z ubikwityną (UIM), ciągu poliglutaminowego (polyQ) oraz elastycznego końca C (Rys. 2). Co więcej, ataksyna-3 posiada dwa sygnały transportu z jądra do cytoplazmy (ang. nuclear export signals; NES) i jeden sygnał transportu do jądra (ang. nuclear localisation signal; NLS) (Antony i in. 2009).



Rysunek 2. Struktura domenowa i modyfikacje posttranslacyjne ataksyny-3. Ataksyna-3 składa się głównie z N-terminalnej domeny katalitycznej, po której następuje C-końcowy ogon zawierający dwa lub trzy motywy oddziałujące z ubikwityną oraz sekwencję poliglutaminową o zmiennej długości. Te cechy i opisane sygnały lokalizacji subkomórkowej są zamknięte w głównym białym obszarze. Miejsca, na które oddziałuje fosforylacja (fioletowe okrągłe struktury), monoubikwitynacja, sumoilacja są reprezentowane w niebieskim obszarze. Oznaczenia oparto na podstawie sekwencji ATXN3 przedstawionej w Uniprot (P54252). Skróty: Qn, ciąg poliglutaminowy; NES, sygnał eksportu jądrowego; NLS, sygnał lokalizacji jądrowej; UIM, motyw oddziałujący z ubikwityną.

Lokalizacja

Prawidłowe białko ataksyny-3 wykazuje w komórce głównie lokalizację cytoplazmatyczną jednak jest również obecne w jądrze (Trottier i in. 1998; Pozzi i in. 2008; Macedo-Ribeiro i in. 2009). Natomiast białko zmutowane ma tendencję do zwiększonej migracji do jądra i tam podlega agregowaniu niezależnie od lokalizacji

komórek i miejsca neurodegeneracji w mózgu (H. L. Paulson i in. 1997; T. Schmidt i in. 1998; Riess i in. 2008). Lokalizacja ataksyny-3 podlega wpływowi sygnału transportu do jądra pomiędzy aminokwasem 273 do 286 wydłużonego ciągu powtórzeń poliQ, oraz 6 potencjalnych sygnałów transportu z jądra do cytoplazmy, spośród których 2 wykazały znaczną aktywność (Rys. 2) (Antony i in. 2009; 2009; Sowa i in. 2018; Matos, de Almeida, i Nóbrega 2019). Badania nad fosforylacją aminokwasów seryn 236, 240, i 352 przez kinazę białkową CK2 doprowadziły do konkluzji iż to one, spośród pozostałych seryn mają największe znaczenie dla jądrowej lokalizacji ataksyny (Mueller i in. 2009). Fizjologicznie, ataksyna-3 lokalizuje w cytoplazmie, natomiast stresory komórkowe, takie jak stres oksydacyjny lub szok termiczny, wywołują szybką lokalizację jądrową danego białka (Reina, Zhong, i Pittman 2010). Tak więc sygnały lokalizacji jak i modyfikacje posttranslacyjne mają istotny wpływ na wewnątrzkomórkowe miejsce występowania ataksyny-3.

Funkcja ataksyny-3

Ataksyna-3 należy do rodziny proteaz cysteinowych z aktywnością deubikwitynazy (Grasty, Weeks, i Loll 2019). Właściwości biochemiczne UIM oraz domeny Jesephin sugerują, że ataksyna-3 pełni ważną rolę w ścieżkach kontroli jakości i degradacji białek w komórce, czyli autofagii i systemie ubikwityna-proteasom (UPS). Łańcuchy ubikwityny stanowią znacznik do rekrutacji białek posiadających domeny wiążące ubikwitynę, do podjęcia określonej funkcji biologicznej (Zhong i Pittman 2006; Matos, de Almeida, i Nóbrega 2019; Singh i in. 2019). Omawiane białko posiada zdolność do wiązania i cięcia łańcuchów poliubikwitynowych przez wiązanie się do reszty tetraubikwityny połączonej lizynami w pozycji 48 lub 63, którą oznakowane jest docelowe białko. Następnie hydrolizuje połączenie między łańcuchem ubikwityny, a białkiem, usuwając w ten sposób molekularny znacznik (Costa i Paulson 2012; A. L. Carvalho, Silva, i Macedo-Ribeiro 2018). Istotę tego mechanizmu w kontekście całej komórki przedstawia proces deubikwitynacji przez ataksynę-3 takich białek jak RNF8, CHK1 lub bekliny-1. Prawidłowo pełniona funkcja przez ataksynę chroni CHK1 i RNF8 przed przedwczesną degradacją pozwalając na kontrole cyklu komórkowego i naprawę DNA (Tu i in. 2017; Singh i in. 2019). W przypadku bekliny-1, prawidłowo wykonywana funkcja ataksyny-3 chroni to białko, kluczowego aktywatora autofagii, przed degradacją proteasomalną (Hill i in. 2021). Ponadto, ataksyna-3 bierze udział w regulacji degradacji

w procesie autofagii, na drodze bezpośredniego wpływu na znane regulatory autofagii, w tym białka związane z mikrotubulami LC3 i białko związane z receptorem kwasu gamma-aminomasłowego GABARAP (Herzog i in. 2020).

W istocie, rola ataksyny-3 nie ogranicza się wyłącznie do kontroli jakości białek. Ataksyna-3 ma powinowactwo do łańcuchów ubikwityny łączonych przez resztę lizyny w pozycji 63 (k63), w konsekwencji umożliwiając oddziaływanie na wiele innych procesów komórkowych, między innymi translacja, endocytoza czy aktywacja kinaz (Winborn i in. 2008; Z. J. Chen i Sun 2009). Omawiane białko może regulować proces ekspresji genów poprzez zmianę metylacji DNA, sekwestrację białka CBP (ang. CREB-binding protein) czy interakcję z deacetylazą histonową HDAC3 (Chai i in. 2001; Evert i in. 2006; Ding i in. 2020). Pełni także funkcję w istotnych procesach komórkowych związanych z zachowaniem integralności genomu, obroną przed stresem oksydacyjnym i apoptozą (Chakraborty i in. 2020; Tu i in. 2020).

Patofizjologia molekularna i komórkowa w chorobie SCA3

Ważną cechą neuropatologiczną SCA3, wspólną dla innych chorób poliQ, jest występowanie wewnątrzkomórkowych agregatów zawierających zmutowane białko, zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz struktur mózgu dotkniętych neurodegeneracją (Rys. 3) (H. L. Paulson i in. 1997; T. Schmidt i in. 1998; U. Rüb i in. 2006). W dużej mierze są one opisywane jako wewnątrzjądrowe inkluzje oraz agregaty w cytoplazmie komórek, znajdujące się w neuronach oraz we włóknach aksonów regionów mózgu dotkniętych chorobą (Hayashi, Kobayashi, i Furuta 2003; Kay Seidel i in. 2010; K. Seidel i in. 2012). Wewnątrzkomórkowe agregaty zawierają zarówno normalną, jak i zmutowaną ataksynę-3, ubikwitynę, czy też inne białka, w tym białka szoku cieplnego, czynniki transkrypcyjne i inne niż ataksyna-3 białka warunkujące choroby polyQ (H. L Paulson i in. 1997; Perez i in. 1998; Uchihara i in. 2001; Yamada i in. 2001; Hayashi, Kobayashi, i Furuta 2003). Szczegółowa funkcja tych agregatów w procesie patogennym nie jest wciąż wyjaśniona. Natomiast mogą one wywierać szkodliwy wpływ, ze względu na wiązanie i blokowanie funkcjonalnych białek (Todd i in. 2013), lub przeciwnie, mogą mieć charakter protekcyjny, służąc jako złoża do blokowania patogennego białka (T. Takahashi, Katada, i Onodera 2010). Agregaty te mogą pośrednio warunkować chorobę, poprzez wiązanie i blokowanie białek, lub poprzez bezpośrednie zaburzanie funkcji jądra lub transportu aksonalnego (Morfini, Pigino, i Brady 2005). Ważne białka wykryte w agregatach to

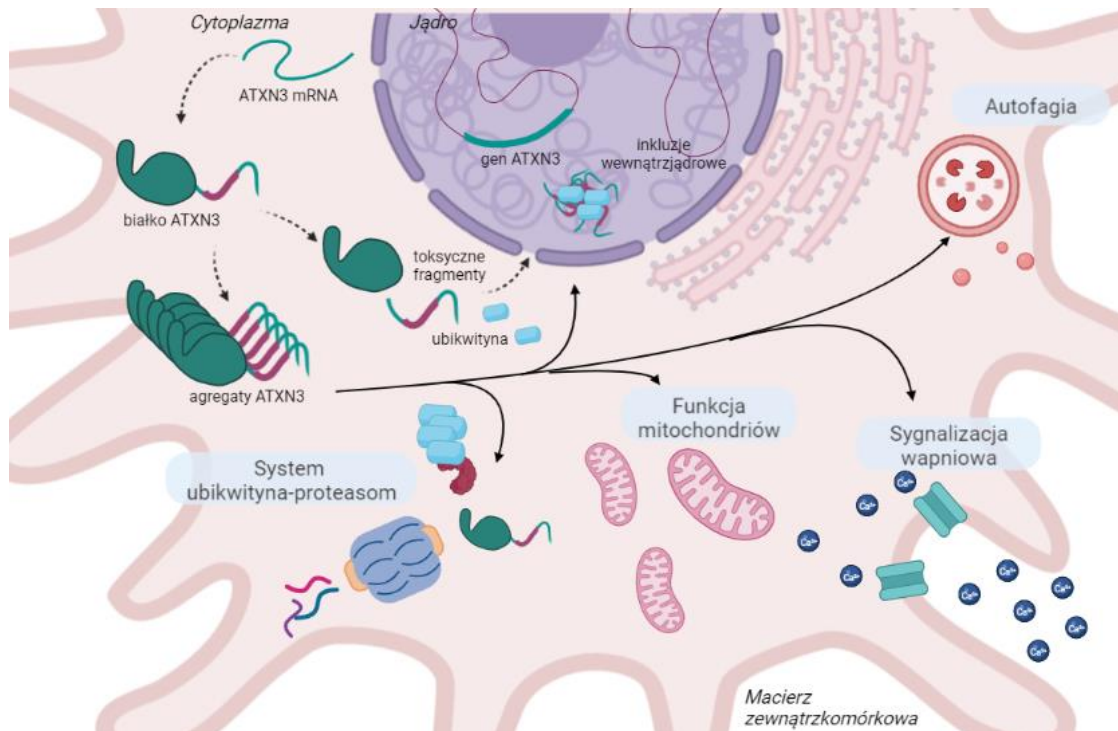
m.in. ubikwityna i białko wiążące kasetę TATA (ang. TATA box-binding protein) (J. Takahashi i in. 2001), czy molekularne interaktory ataksyny-3 (H. Yang i in. 2014), czynniki transkrypcyjne i podjednostki proteasomu, ważne dla funkcji komórkowych (Chai, Koppenhafer, Shoesmith, i in. 1999; Chai, Koppenhafer, Bonini, i in. 1999). Niektóre zaburzenia procesów komórkowych obserwowane w regionach mózgu pacjentów ze SCA3 można powiązać z dysfunkcją aksonów (T. Klockgether i in. 1999; D'Abreu i in. 2009). Agregaty zostały wykryte w aksonach kilku regionów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) pacjentów SCA3 (Kay Seidel i in. 2010; K. Seidel i in. 2012) i uznane za bardziej istotne dla obserwowanej neurodegeneracji niż złogi wewnątrzjądrowe (K. Seidel i in. 2016).

System ubikwityna-proteasom (ang. ubiquitin-proteasome system; UPS) jest głównym szlakiem kontroli jakości białek (ang. protein quality control; PQC), który reguluje wewnątrzkomórkowy poziom białek i bierze udział w likwidacji źle sfałdowanych lub uszkodzonych białek (Rys. 3). Jak wspomniano wyżej, funkcja prawidłowej ataksyny-3 została powiązana ze szlakiem kontroli jakości białek, działając jako białko rekrutujące ubikwitynowane substraty poprzez swoje motywy oddziałujące z ubikwityną (Burnett, Li, i Pittman 2003; Doss-Pepe i in. 2003; Chai i in. 2004; Schmitt i in. 2007). Utrata funkcji ataksyny-3 na skutek posiadania wydłużonego ciągu powtórzeń poliQ w swojej budowie może wpływać na UPS i w ten sposób leżeć u podstaw patogenezy MJD/SCA3. Dowiedziono, że w agregatach wewnątrzkomórkowych ataksyny-3 znajdują się komponenty kompleksu proteasomu (Chai, Koppenhafer, Bonini, i in. 1999; Chai, Koppenhafer, Shoesmith, i in. 1999; Thorsten Schmidt i in. 2002), jak i inne białka zaangażowane w kierowanie białek do proteasomu w celu ich degradacji (de Pril i in. 2004; Bergink i in. 2006).

Autofagia stanowi główny szlak komórkowy przeznaczony do degradacji białek skłonnych do agregacji, w tym białek polyQ (Ravikumar, Duden, i Rubinsztein 2002). W SCA3, zahamowanie autofagii w modelu *Drosophila* MJD/SCA3 zwiększyło toksyczność związaną ze zmutowaną ataksyną-3 (Bilen i Bonini 2007). W tkankach pobranych z mózgow pacjentów SCA3 stwierdzono nieprawidłowe nagromadzenie kilku białek autofagii (LC3, p62 i Atg16L) (Nascimento-Ferreira i in. 2011). Ponadto, stwierdzono kolokalizację białek autofagii z agregatami wewnątrzkomórkowymi w materiale biologicznym pobranym od pacjentów z SCA3 (Mori i in. 2012). Ponad to, jak wyżej wspomniano, prawidłowe białko ataksyny-3 oddziałuje z kluczowym białkiem uczestniczącym w ścieżce autofagii, beklina-1 poprzez trakt poliQ. Wiązanie bekliny-1 z

ataksyną-3 wpływa na większą stabilizację bekliny-1, co daje jej ochronę przed wstąpieniem na drogę degradacji proteasomalnej. Natomiast wydłużony ciąg powtórzeń poliQ w ATXN3 wpływa na destabilizację bekliny-1 i prowadzi do obniżenia jej poziomu, prowadząc do deregulacji procesu autofagii (Ashkenazi i in. 2017).

DNA jest nieustannie narażone na zewnętrzne i wewnętrzne czynniki stresowe prowadzące do pęknięć DNA (Madabhushi, Pan, i Tsai 2014). Uszkodzone lub niepoprawnie naprawione DNA może stać się onkogenne, uaktywniać szlaki proapoptotyczne lub zapoczątkować starzenie się komórek. Komórki wykształciły złożone mechanizmy sygnalizacji i naprawy uszkodzeń DNA, zwane odpowiedzią na uszkodzenia DNA (ang. DNA damage response; DDR), aby przeciwdziałać różnym uszkodzeniom DNA (Jackson i Bartek 2009; Iyama i Wilson 2013). Bardzo częstym zjawiskiem obserwowanym w tkankach pacjentów SCA3 jest wzmożona akumulacja uszkodzeń w DNA (Chatterjee i in. 2015) w mysich modelach SCA3 (Kazachkova i in. 2013). Aktywacja mechanizmów DDR może aktywować ścieżki kontroli jakości białek, w tym UPS i makroautofagię (Xie i Jarosz 2018). Zarówno prawidłowa, jak i zmutowana ATXN3 są szybko rekrutowane do ognisk uszkodzeń DNA w komórkach narażonych na czynniki stresowe (Pfeiffer i in. 2017). ATXN3 wpływa na stabilizację Chk1 (ang. Checkpoint Kinase 1) i p53 (ang. tumor protein 53), których rolą jest opóźnienie progresji cyklu komórkowego i wspieranie naprawy uszkodzeń DNA (H. Liu i in. 2016; Tu i in. 2017). Natomiast obniżanie poziomu niezmutowanej ATXN3 prowadzi do zwiększenia poziomu poliubikwitynowanych podjednostek szlaku DDR (tj. MDC1, Chk1 lub p53), zaburzonej naprawy DNA oraz wzrostu podatności komórek na czynniki stresowe (Chatterjee i in. 2015; Gao i in. 2015; H. Liu i in. 2016).



Rysunek 3. Ścieżki patogenezy w SCA3 związane ze zmutowaną formą ATXN3 wewnątrz komórki (Matos, de Almeida, i Nóbrega 2019; Nóbrega i in. 2019).

3.3. Terapie genowe

Terapie genowe to leczenie polegające na implementowaniu obcych kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) do komórek. Informacja genetyczna transportowana w postaci DNA lub RNA powinna wywierać efekt terapeutyczny. Strategie jakimi posługuje się terapia genowa to między innymi (1) zastąpienie genu powodującego chorobę przez jego zdrową kopię, wykorzystywane w chorobach monogenowych, (2) zmiana ekspresji genów ukierunkowana na RNA, (3) wprowadzenie nowego lub zmodyfikowanego genu do organizmu w zaburzeniach złożonych i chorobach zapalnych, (4) edytowanie genów w celu wprowadzenia ukierunkowanych zmian w genomie gospodarza (D. Wang i Gao 2014). Pomimo, że główny czynnik etiologiczny choroby SCA3 został poznany już dekady temu, oraz ujawniono liczne aspekty patogenezy SCA3, to jest ona nadal nieuleczalna (Ashizawa, Öz, i Paulson 2018; Duarte-Silva i Maciel 2018; McLoughlin i in. 2018).

3.3.1. Terapeutyki w terapii genowej SCA3

Ideą terapii genowej może być celowanie w czynnik etiologiczny SCA3, gen ataksyny-3, w sposób wyciszający lub modyfikujący. Innym podejściem jest terapia ukierunkowana na upośledzone procesy komórkowe i molekularne, w tym zaburzenia

funkcja systemu UPS, zaburzenia procesu autofagii, transkryptomoczną dysregulację, modyfikacje posttranslacyjne, rozpad lub agregację zmutowanego białka, procesy zapalne, stres siateczki śródplazmatycznej, zaburzoną homeostazę gospodarki wapnia, dysfunkcje mitochondriów oraz uszkodzenia neuronów (Katsuno i in. 2014; D. Wang i Gao 2014; Matos, de Almeida, i Nóbrega 2019). Do celowania w patogenezę SCA3 stosuje się dwa główne rodzaje strategii terapeutycznych opartych na oligonukleotydach, i są to antysensowe oligonukleotydy (ang. antisenseoligonucleotides; ASO) oraz interferencje RNA (ang. RNA interference; RNAi).

Antysensowe oligonukleotydy to syntetyczne jednoniciowe cząsteczki DNA zdolne do hybrydyzowania do cząsteczek mRNA za pośrednictwem tworzenia par zasad w myśl zasady Watsona-Cricka. Prowadzą do zmiany funkcji lub sztucznej modulacji ekspresji genów (Zamecnik i Stephenson 1978; Rinaldi i Wood 2018). ASO może działać w dwóch mechanizmach. Pierwszy z nich cechuje się degradacją mRNA zależną lub niezależną od RNAzy H, drugi to mechanizm modulowania procesu splicingu mRNA, w którego rezultacie pomijane są egzony zawierające patologiczną mutację (Sazani i Kole 2003; Evers i in. 2013). Wymienione mechanizmy zostały przetestowane w modelach zwierząt SCA3 z różną efektywnością, uzależnioną od sposobu dostarczenia, celu i czasu interwencji terapeutycznej (Evers i in. 2013; Toonen i in. 2016; 2017; Moore i in. 2017; Kourkouta i in. 2019).

Odkrycie miRNA (ang. micro RNA) dało początek mechanizmom interferencji RNA. miRNA stanowią grupę endogennych, niekodujących, krótkich fragmentów RNA o długości 22 nukleotydów, o właściwościach regulacji wielu procesów komórkowych, począwszy od proliferacji, rozwoju, po śmierć komórki (Fire i in. 1998; Bartel 2004). Na ich podstawie zaprojektowano sztuczne RNAi takie jak miRNA, siRNA (ang. small interfering RNA) czy shRNA (ang. short hairpin RNA). Mogą być dostarczone do ustroju różnymi sposobami (Matos i in. 2018). Natomiast do wnętrza komórki mogą przedostawać się jako siRNA, lub w formie zamkniętej w nośniku, dzięki czemu są w stanie trwale wyciszyć gen przez inkorporowanie do genomu (Han 2018; Nóbrega i in. 2019). W celu allelo-nieselektywnego wyciszenia ekspresji ataksyny-3 wykorzystano miRNA. Wśród konstruktów miRNA redukujących ekspresję prawidłowej i zmutowanej formy ataksyny-3 w hodowli komórek znalazł się miR-25 (F. Huang i in. 2014), w przypadku miR-9, miR-181a i miR-494 zademonstrowano allelo-selektywną inhibicję ekspresji zmutowanej ATXN3 w modelu mysim (Carmona i in. 2017). Cząsteczki siRNA zastosowano w hodowli komórkowej HEK 293T (Y. Li i in. 2004) i mysim

transgenicznym modelu SCA3 (Conceição i in. 2016). Cząsteczki shRNA zbadano w lentiwirusowym szczurzym modelu SCA3 (Alves i in. 2008; 2010) i hodowli fibroblastów pochodzących od pacjentów SCA3 (Kotowska-Zimmer, Ostrovska, i Olejniczak 2020). Na ich podstawie dowiedziono, że zastosowanie RNAi powoduje obniżenie poziomu zmutowanego białka ataksyny-3, przy jednocześnie delikatnym spadku poziomu prawidłowej ataksyny-3. Obserwowano również zmniejszenie liczby inkluzji jądrowych zmutowanego białka oraz złagodzenie objawów fenotypowych charakterystycznych dla omawianej jednostki chorobowej (Alves i in. 2010).

W związku z planowanym trwałym wyciszeniem genu CYP46A1 w komórkach mózdzku mysich modeli, i kierowaniem się zasadą 3R, zdecydowano o zastosowaniu wektorów wirusowych związanych z adenowirusami (ang. Adeno-associated virus; AAV) dla uprzednio wybranych konstruktów shRNA. Wektory wirusowe można łatwo wykorzystać do opracowania ukierunkowanych terapii, ponieważ wykazują tropizm do określonych tkanek i typów komórek (Hudry i Vandenberghe 2019).

Wirusy związane z adenowirusami są małymi, nieosłoniętymi, jednoniciowymi wirusami DNA należącymi do rodziny *Parvoviridae*. Są one uważane za najbardziej obiecujące nośniki terapii genowej ukierunkowanej na OUN, ponieważ są klinicznie bezpieczne i skuteczne w transdukcji dzielących się i dzielących komórek, z długotrwałą ekspresją transgeny (Penaud-Budloo i in. 2018). Genom AAV składa się jedynie z trzech genów, w tym genu replikacji (rep), składania (aap) i kapsydu (cap) (Naso i in. 2017), niezbędnych odpowiednio do wirusowej replikacji, integracji i pakowania (Berns i Giraud 1996; H. Nakai i in. 1999; Musatov i in. 2002). AAV mogą utrzymywać się w komórce gospodarza w stanie episomalnym, przy czym tylko niewielka część integruje do genomu komórki gospodarza (Bouard, Alazard-Dany, i Cosset 2009). Wyizolowano ponad 12 różnych serotypów AAV (Duan 2016), które różnią się między sobą specyficznymi cechami, w tym zależnymi od białek na powierzchni kapsydu (Kaludov i in. 2001; Wu, Asokan, i Samulski 2006; Bell i in. 2011; Shen i in. 2011) różnicami w tropizmie komórkowym (Hiroyuki Nakai i in. 2005; Mandel i in. 2006), różnicami w efektywności transdukcji, oraz różnym wpływem na odpowiedź immunologiczną gospodarza, oraz zdolnością do przekraczania BBB (H. Zhang i in. 2011; D. Yang i in. 2014). Wiele serotypów skutecznie transdukuje neurony i komórki glejowe (Davidson i in. 2000; C. Wang i in. 2003; Burger i in. 2004; Aschauer, Kreuz, i Rumpel 2013). Najczęściej badane serotypy wektorów AAV to 1, 2, 5, 8, 9 i rekombinowany ludzki (rh)10 (Cearley i Wolfe 2006; Klein i in. 2008; Chan i in. 2017).

Rekombinowany serotyp AAV-PHP.eB, będący pochodnym serotypem AAV9, oraz AAVrh10 stanowią obiecujące narzędzia terapii genowej ze względu na udokumentowane właściwości przenikania przez BBB (D. Liu i in. 2021). Potencjał terapeutyczny AAV został przetestowany w wielu różnych zaburzeniach neurologicznych (Kaplitt i in. 2007; Eberling i in. 2008; Christine i in. 2009; Mittermeyer i in. 2012; Rafii i in. 2014; Tardieu i in. 2014; Mendell i in. 2017; Dangouloff i Servais 2019; Martier i in. 2019; Rodrigues i Wild 2020).

3.4. Zwierzęce modele SCA3

Badanie patomechanizmu SCA3 w czasie rozwoju choroby na materiale ludzkim pociąga za sobą liczne ograniczenia. Pomimo, że materiał biologiczny pobrany od pacjentów *post-mortem* zapewnił wiele cennych badań, w przypadku chorób rzadkich ma bardzo małą dostępność. Co więcej, potwierdzono, że w momencie obumarcia mózgu dochodzi do aktywacji ekspresji grupy genów biorących udział w odpowiedzi na stan zapalny (Dachet i in. 2021). W ten sposób może zostać utraconych wiele informacji, co rzutuje na zaburzoną analizę wyników, ważnych dla lepszego poznania chorób neurodegeneracyjnych. Model iPSC pozwala uzyskać neurony z komórek fibroblastów pobranych od pacjentów cierpiących na rzadkie choroby, kultywowane *in vitro* w hodowli 2D (K. Takahashi i Yamanaka 2006). Jednak proces kultywowania spotyka się z licznymi wadami, gdy zaplanowane są długoterminowe eksperymenty terapii genowych. Wśród nich można wyróżnić wystąpienie procesu reprogramowania, ryzyko aktywacji onkogenów, wczesną letalność, wysoki wskaźnik mutacji genu, niestabilność genetyczną, wysoki koszt utrzymania (Valadez-Barba i in. 2020).

3.4.1. Mysie modele w terapii genowej

Najczęściej wykorzystywanym w nauce modelowym organizmem ssaczym jest mysz domowa (łac. *Mus musculus*) (Hickman i in. 2017). Modelowanie myszy tak aby jak najlepiej odzwierciedlały objawy SCA3, polegało na utworzeniu modeli transgenicznych z ekspresją cDNA ludzkiej zmutowanej ataksyny-3 lub jej fragmentu, pod kontrolą egzogenego promotora (Cemal i in. 2002; Goti i in. 2004; Bichelmeier i in. 2007; Colomer Gould i in. 2007; Chou i in. 2008; Boy i in. 2009; 2010; Silva-Fernandes i in. 2010; Hübener i in. 2011). Chociaż modele umożliwiły zbadanie wybranych cech SCA3, tj. badania funkcji skróconych form ataksyny-3, mechanizmu lokalizacji jądrowej, zmian transkrypcyjnych i metabolicznych oraz ścieżki przekazywania sygnału w SCA3,

zawierają wady wynikające z metod ich tworzenia. Defektami modeli mysich mogą być nadmierna liczba kopii transgeny, nienaturalne wzorce ekspresji, niepełna ekspresja białek, brak sekwencji regulatorowych, lub kombinacja tych wad.

Modele typu knock-in

Nienaturalną ekspresję patologicznego genu w modelach transgenicznym i opartym na AAV można ograniczyć przez generowanie zwierząt typu knock-in. Do tej pory utworzono trzy modele typu knock-in SCA3 (Ramani i in. 2015; 2017; Switonski i in. 2015; Haas i in. 2022). Ten typ modeli odznacza ekspresja zmutowanego białka na poziomie zbliżonym do naturalnego, wynikającego z umiejscowienia genu w endogennym locus, w jednej kopii kontrolowane przez naturalny dla tego genu promotor. Do utworzenia modelu knock-in SCA3 można użyć dwie strategie. Wprowadzenie wydłużonego ciągu CAG do genu myszy pod jej naturalnym promotorem, lub zmodyfikowanie mysiego genu w procesie pełnej humanizacji sekwencji kodującej genu ataksyny-3. Takie modele jednak często wykazują łagodny fenotyp i dodatkowo wykazują ekspresję prawidłowej formy mysiej ataksyny-3, co ogranicza śledzenie postępów choroby u takich zwierząt.

3.4.2. Model SCA3 knock-in Ki91

Ki91 to pierwszy myszy model typu knock-in SCA3 utworzony w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN (Switonski i in. 2015). Model ten wykazuje ekspresję ludzkiego genu ATXN3 zawierającego 91 powtórzeń CAG. Wygenerowany został dzięki wprowadzeniu ludzkiego cDNA składającego się z egzonów 8 – 11 genu ATXN3 z 91 powtórzeniami CAG w egzonie 10, w miejsce mysich egzonów i intronów 7-11 mysiego genu ATXN3 (egzon 7 jest hybrydowy). Ze względu na wysokie podobieństwo w mysim i ludzkim genie ATXN3, egzony 1-7 nie musiały być zastępowane (Switonski i in. 2015). Myszy modelu Ki91 SCA3 odzwierciedlają fenotypowe, molekularne i komórkowe cechy patogenezy SCA3. Cechują się późnym początkiem choroby, a defekty koordynacji obserwowane są w testach Rotarod oraz testach prętów statycznych. Molekularnie charakteryzuje je występowanie stanu zapalnego w OUN, zwyrodnienie i obumieranie komórek nerwowych w mózgdzku, oraz formowanie się agregatów białkowych w neuronach. W pracy K. Wiatr 2019 oraz 2021 opisano zmodyfikowany model Ki91. Zwierzęta powstały w wyniku utworzenia par zarodowych myszy heterozygotycznych Ki91 (mut/wt), aby gen ludzkiej zmutowanej ataksyny-3 był obecny na dwóch allelach. Zwierzęta SCA3 Ki91 zawierały od 98 do 123 (Wiatr i in. 2019), oraz od 103 do 132

powtórzeń CAG na pojedynczym zmutowanym allelu ataksyny-3 (Wiatr i in. 2021). Na podstawie wymienionych publikacji podjęto decyzję o zastosowaniu w badaniach pracy doktorskiej mysiego modelu SCA3 Ki150/150, które stanowią grupę myszy homozygotycznych (mut/mut), zawierających zmutowany gen ataksyny-3 o długości od 140 do 163 powtórzeń CAG w pojedynczym allelu, na dwóch allelach.

Model SCA3 Ki91 przedstawia stopniowo postępujący fenotyp. Stadium choroby tych zwierząt podzielono na trzy fazy. Fazę presymptomatyczną do 2 miesiąca życia, w której nie obserwowano żadnych zmian w motoryce myszy, fazę wczesną symptomatyczną między 4 – 8 miesiącem życia, oraz fazę późną symptomatyczną przypadającą na okres po 12 miesiącu życia z progresją do końca życia. Ataksja ruchowa pojawia się po 8 miesiącu życia. Zaburzenia motoryczne przeradzają się w przewlekłą utratę równowagi i koordynacji, połączonej z dystonią i osłabieniem siły mięśniowej w fazie późnej symptomatycznej. W mózgach *ex vivo* 18-miesięcznych myszy ujawniono znaczny globalny zanik oraz zmniejszenie objętości wielu regionów, takich jak kora przyśrodkowo-skroniowa, kora porowata, gruczołowa i ruchowa, ciało modzelowate, prążkowie, septum, pons i podwzgórze (Wiatr i in. 2019; 2021). Agregaty wewnątrzkomórkowe zawierające ataksynę-3 pojawiają się już w fazie wczesnej symptomatycznej, głównie w korze mózgowej i mózdzku. Dominującą formą jest rozproszone białko ataksyny-3, chociaż obecne są też agregaty wewnątrzjądrowe (Wiatr i in. 2019). U zwierząt w fazie późnej symptomatycznej agregaty są obecne również w prążkowie, śródmózgowiu, hipokampie, strukturze mostu oraz jądrach głębokich mózdzku (Wiatr i in. 2021). Zmiany transkrypcyjne obecne u homozygotycznych Ki91 w wieku 10 i 14 miesięcy są charakterystyczne dla markerów uszkodzonych komórek w SCA3 (Wiatr i in. 2019). Zidentyfikowane deregulowane białka powiązane są z prekursorami neuronów oraz oligodendrocytami, metabolizmem energetycznym, procesem apoptozy, organizacją cytoszkieletu, projekcjami neuronalnymi, transportem membranowym i transsynaptycznym (Wiatr i in. 2019). Przez poznanie funkcji deregulowanych białek u zwierząt Ki91 w fazie presymptomatycznej i symptomatycznej udało się znaleźć wspólne połączenie w formie aksonu. Akson to struktura wymagająca wysokiej produkcji energii, efektywnego transportu wzdłuż jego struktury i stanowi lokalizację uwalniania się pęcherzyków aksonalnych. Postulowane jest występowanie zaburzeń energetycznych w neuronach, które nie są spowodowane wcześniejszymi uszkodzeniami aksonu (Wiatr i in. 2021).

4. Cel pracy

Moja praca doktorska należy do badań typu weryfikacja koncepcji naukowej (ang. proof of principle), w której zaplanowane eksperymenty miały na celu potwierdzenie lub zaprzeczenie hipotezie, że dysfunkcja enzymu CYP46A1, odpowiedzialnego za metabolizmu cholesterolu w mózgu odgrywa patogenną rolę w ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 w mysim modelu Ki150. Hipotezę wysunięto na podstawie uprzednio przytoczonych wyników w chorobach AD i HD, w których udowodniono udział CYP46A1 w patomechanizmie chorób neurodegeneracyjnych. W SCA3 jednymi z najsilniej zdegenerowanych komórek w mózdku są komórki Purkiniego, które specyficznie ekspresyjają gen kodujący białko CYP46A1. Zdefiniowanie roli CYP46A1 oraz zaburzonego metabolizmu cholesterolu w mózgu w patomechanizmie SCA3 pozwoli na zaproponowanie skutecznej, celowanej terapii genowej, modulującej poziom ekspresji genu CYP46A1 w mózdku.

Cele szczegółowe pracy doktorskiej:

- Cel 1. Odkrycie warunków transdukcji komórek Purkiniego w mózgu myszy z pomocą wektorów wirusowych typu AAV,
- Cel 2. W związku ze znaczeniem poziomu CYP46A1 w chorobach neurodegeneracyjnych, odkrycie czy obniżenie poziomu białka CYP46A1 w komórkach Purkiniego z pomocą shRNA, po iniekcji domózgowej wektorów AAV, wywoła niekorzystne motoryczne objawy behawioralne przypominające SCA3, w myszach kontrolnych WT,
- Cel 3. Zbadanie czy w modelu Ki150 występuje patogenezą SCA3 związana z obniżonym poziomem białka CYP46A1,
- Cel 4. Zbadanie czy patogenezą i zmiany behawioralne w mysim modelu Ki150 ulegną nasileniu w wyniku dalszego obniżenia poziomu białka CYP46A1 w komórkach Purkiniego z pomocą shRNA po iniekcji domózgowej wektorów AAV.

5. Materiały i Metody

5.1. Materiały

5.1.1. Konstrukty genetyczne – wektory wirusowe AAV

AAVrh10

- **AAVrh10_shCYP46A1_eGFP** (Molecular Biology Service Technology Platform Inserm U1089, Nantes, France), stężenie $7,7 \times 10^{11}$ vg/ml.

Zawartość konstruktów:

- shRNA genu *CYP46A1* pod kontrolą promotora PU6
- gen reporterowy *eGFP* pod kontrolą promotora kinazy fosfoglicerynianowej (PGK)
- sekwencje odwróconych powtórzeń terminalnych wektora AAV2

- **AAVrh10_shScramble_eGFP** (Molecular Biology Service Technology Platform Inserm U1089, Nantes, France), stężenie $3,5 \times 10^{12}$ vg/ml.

Zawartość konstruktów:

- shRNA Scramble pod kontrolą promotora PU6
- gen reporterowy *eGFP* pod kontrolą promotora kinazy fosfoglicerynianowej (PGK)
- sekwencje odwróconych powtórzeń terminalnych wektora AAV2

AAV-PHP.eB

- **AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP** (Molecular biology and virus service, IGBMC, Strasbourg, France), stężenie $2,6 \times 10^{13}$ vg/ml.

Zawartość konstruktów:

- shRNA genu *CYP46A1* pod kontrolą promotora PU6
- gen reporterowy *eGFP* pod kontrolą promotora cytomegalowirusa (CMV)
- sekwencje odwróconych powtórzeń terminalnych wektora AAV2

- **AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP** (Molecular biology and virus service, IGBMC, Strasbourg, France), stężenie $3,8 \times 10^{13}$ vg/ml.

Zawartość konstruktów:

- shRNA Scramble pod kontrolą promotora PU6
- gen reporterowy *eGFP* pod kontrolą promotora cytomegalowirusa (CMV)
- sekwencje odwróconych powtórzeń terminalnych wektora AAV2

Transkrypty shCYP46A1 oraz shScramble mają identyczną sekwencję w obu serotypach wektorów wirusowych użytych w eksperymentach pracy doktorskiej

(AAVrh10 i AAV-PHP.eB) i zostały wybrane na podstawie wyników badań wykonanych przez Djelti, F (2015) (Djelti i in. 2015).

Przygotowanie i przechowywanie wektorów wirusowych

Zamówione wektory wirusowe otrzymano w 10 probówkach pojemności 100 μ l. Każdorazowo do operacji stereotaktycznych rozmrażano taką liczbę probówek, która zostanie wykorzystana, aby nie doprowadzić do zmiany miana wektorów wirusowych przy wielokrotnym rozmrażaniu materiału. Podczas operacji stereotaktycznych wektory wirusowe doprowadzano do zadanego stężenia za pomocą roztworu jałowej soli fizjologicznej.

5.1.2. Materiał biologiczny

Mysie modele użyte w eksperymentach

Do prac związanych z analizą wyciszenia ekspresji genu CYP46A1 stosowano myszy model kontrolny C57BL (WT) zakupiony z The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA), oraz myszy transgeniczne odzwierciedlające fenotyp choroby ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 SCA3 Ki150/150. Hodowla myszy prowadzona była w Zwierzętarńi w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii (WCZT, Poznań, Polska).

5.1.3. Oligonukleotydy

Tabela 1. Sekwencje oligonuklotydów

Nazwa	Sekwencja 5'->3'
eGFP_F	GACGACGGCAACTACAAGA
eGFP_R	CATGATATAGACGTTGTGGCT
CYP46A1_F_II	CACCCTGGCAAAGTTCATGC
CYP46A1_R_II	CAGAACCTCATCGTCCTGAGC
ITR_F	GGCACAGGACTTACTCCACA
ITR_R	CGGTGCAGTGGTCAGAGTTT
β -actin_F	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT
β -actin_R	ATGGAGGGGAATACAGCCC
Intron 9 genu ataksyny 3 F	TCCTCTCTAGGATGGCTTTG
Intron 9 genu ataksyny 3 R	TAAACGCCCTACCTATTTG

Region CAG ludzkiej ataksyny 3 F	GGAAGAGACGAGAAGCCTAC
Region CAG ludzkiej ataksyny 3 R	TCACCTAGATCACTCCCAAAGT

Tabela 2. Sekwencja shRNA wyciszające ekspresję genu *Cyp46a1*

Nazwa:	Nić sens	Pętla	Nić antysens
shCYP46A1	GTATGGTCCTGTTGTAAGAGT CAATGT	TTGATATCCG	ACATTGACTCTTACAACAGGA CCATAC
shScramble	GTCTTCTAGATTTGTGAGAGG GAACTT	TTGATATCCG	AAGTTCCTCTCACAAATCTA GAAGAC

5.1.4. Ważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne

- Chlorek sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- Etanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- Kwas octowy (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- Tris-base (Bioshop Canada Inc., Burlington, Kanada)
- Wodorotlenek sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- Sacharoza (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- Agaroz (EURx, Gdańsk, Polska)
- EDTA (PoCh, Gliwice, Polska)
- Kwas borowy (Chempur, Piekary Śląskie, Polska)
- Roztwór zamykający Mounting medium Fluoroshield™ (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- Triton X-100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Chloroform cz.d.a. (PoCh, Gliwice, Polska)
- Formaldehyd (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- SDS (Bioshop Canada Inc., Burlington, Kanada)
- 4% roztwór paraformaldehydu (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Sól fizjologiczna 0.9% NaCl (Polpharma, Starogard Gdański, Polska)
- Isotek 1000 mg/g płyn do sporządzania inhalacji parowej (Centrowet-Cezal, Poznań, Polska)
- Vidisic, żel do oczu (DR MANN PHARMA, Berlin, Niemcy)
- Tribiotic, maść (KATO LABS, Warszawa, Polska)
- Opokan (Meloxicam 1mg/kg m.c.) (AFLOFARM, Pabianice, Polska)

5.1.5. Roztwory i bufor

Western blot

Bufor PB do izolacji białek, 3x stężony	
Tris	60 mM
SDS	2%
Sacharoza	10%
PMSF	2 mM

Bufor obciążający do białek, 3x stężony	
Tris pH 6.8	150 mM
SDS	6%
β-merkaptotanol	16%
Glicerol	30%
Błękit bromofenolowy	3%

Bufor do elektroforezy	
Tris	25 mM
Glicyna	190 mM
SDS	0,1%

Bufor do elektrotransferu	
Tris	25 mM
Glicyna	192 mM
Metanol	20%

TBS-T, pH 7.4	
Tris	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1%

TBST-M	
Tris	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1%
Mleko	5%

Roztwór Ponceau S do barwienia białek na membranie	
Ponceau S	0,5%
Kwas octowy	1%

TBE	
Tris	1 M
Kwas borowy	1 M
EDTA	20 mM

5.1.6. Bufory dostępne komercyjnie:

- Bufor do ligazy T4, 10x stężony (Promega, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone)
- Bufor do polimerazy GoTaq Flexi, 5x stężony (Promega, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone)
- Bufor PBS (Bioshop Canada Inc., Burlington, Kanada)

5.1.7. Zestawy i materiały komercyjne

- Zestaw do izolacji DNA - Spin Column Genomic DNA Kit (Bio Basic Inc., Markham, Canada)
- Polimeraza DNA GoTaq Flexi 5 U/μl (Promega, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone)
- Simple safe (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- Mieszanina dNTP o całkowitym stężeniu 40mM (EURx, Gdańsk, Polska)
- Marker długości DNA - Perfect Plus 1 kb DNA Ladder (EURx, Gdańsk, Polska)
- TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Żele komercyjne BIO-RAD Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels, 4-15% 15-dołkowe (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Membrana nitrocelulozowa do analiz typu Western Amersham™Protran™0,45 μm NC (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone)
- Marker wielkości białek - Pageruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji – High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Zestaw do oznaczania białka metodą BCA – Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Odczynniki Chemiluminescent Western Blot (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- Butle z tlenem medycznym (Air Products, Poznań, Polska)
- Traktowana DEPC woda wolna od nukleaz (EURx, Gdańsk, Polska)

5.1.8. Przeciwciała

Tabela 3. Lista przeciwciał I i II rzędowych

Przeciwciała I-rzędowe				
Nazwa	Gospodarz	Rozcieńczenie WB	Rozcieńczenie IF	Producent
Anty-CYP46A1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000	1:100	ProteinTech
Anty-GFP	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:100	-	Hybridoma
Anty-GAPDH	<i>Mus musculus</i>	1:10000	-	ProteinTech
Anty-lamina B	<i>Mus musculus</i>	1:10000	-	ProteinTech
Anty-kalneksyna	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:2000	-	Sigma Aldrich
Anty-ataksyna 3	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:1000	1:1000	ProteinTech
Anty-GFAP	<i>Mus musculus</i>	-	1:1000	BDPharmingen
Anty-Calbindyna	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	-	1:2500	Frontier
Anty-NEUN	<i>Mus musculus</i>	-	1:200	Millipore
Anty-NEFH	<i>Mus musculus</i>	-	1:50	Hybridoma
Przeciwciała II-rzędowe				
Anty-mysie *	<i>Equus asinus</i>	1:5000	-	Jackson ImmunoResearch
Anty-królicze *	<i>Equus asinus</i>	1:5000	-	Jackson ImmunoResearch
Anty-królicze-Cy3	<i>Equus asinus</i>	-	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anty-królicze-Alexa647	<i>Equus asinus</i>	-	1:500	Jackson ImmunoResearch

*HRP – peroksydaza chrzanowa

5.1.9. Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe

- Aparat do elektroforezy pionowej Mini-Protean®Tetra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Aparat do transferu mokrego Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- pH-metr Seven Easy (Mettler Toledo, Warszawa, Polska)
- Aparat do elektroforezy poziomej (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Mikroskop konfokalny Leica TCS SP5 (Leica microsystems, Wetzlar, Niemcy)
- Mikroskop konfokalny Opera Phenix™ (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Sonikator Sonoplus mini20 BANDELIN (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- System dokumentacji żeli G:box (Syngene, Cambridge, Wielka Brytania)
- Homogenizator TissueRuptor (Qigen, Hilden, Niemcy)

- Termocykler ProFlex™ 3 x 32-well (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Termocykler do qPCR CFX Connect™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Termomikser TS-100 (Biosan, Józefów, Polska)
- Wirówka multi spin MSC-600 (Biosan, Józefów, Polska)
- Wirówka 5424R (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- Wirówka Mikro120 (Hettich, Lusowo, Polska)
- Zasilacz do elektroforezy PowerPac™Basic (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Aparat RotaRod model 47600 (Ugo Basile, Włochy)
- Aparat StaticRod (własna konstrukcja; opracowana na podstawie publikacji Deacon (2013) oraz Switonski (2015) (Deacon 2013; Switonski i in. 2015)
- Aparat stereotaktyczny (RWD Life Science, San Diego, Stany Zjednoczone)
- System pompy infuzyjnej (KD Scientific Inc., Holliston, Stany Zjednoczone)
- Mieszadło (SunLab, Warszawa, Polska)
- Pompa do perfuzji (własna konstrukcja)
- Systemy do znieczulania i anestezji zwierząt (RWD Life Science, San Diego, Stany Zjednoczone)
- 10- μ l-strzykawki Hamilton z igłą 26G (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- Nici chirurgiczne wchłaniające (Madens, Poznań, Polska)
- Maty grzewcze do klatek operowanych myszy (RWD Life Science, San Diego, Stany Zjednoczone)
- Maty grzewcze dla zwierząt w trakcie operacji stereotaktycznych (RWD Life Science, San Diego, Stany Zjednoczone)

5.1.10. Programy komputerowe i bazy danych

- GeneSys – analiza żeli agarozowych i membran w metodzie Western blot (Syngene, Cambridge, Wielka Brytania)
- ImageJ – analiza zdjęć mikroskopowych oraz membran w metodzie Western blot (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)

- Peak Scanner 1.0 – analiza ilości powtórzeń CAG w elektroforezie kapilarnej (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- Leica Angle Two™ - oprogramowanie stereotaktyczne ATLAS (MYNEUROLAB.COM, VWR International, Radnor, Pensylwania, Stany Zjednoczone)
- GraphPad Prism v.6.01 – statystyczna analiza wyników (GraphPad Software, San Diego California USA)
- Tecan Infinite – analiza stężenia białka metodą BCA (Tecan Group AG, Männedorf, Szwajcaria)
- BioRender – tworzenie obrazków (BioRender.com)

5.2. Metody

5.2.1. Hodowla

Zwierzęta w doświadczeniach były utrzymywane w stałych ściśle określonych i kontrolowanych warunkach, tj. w temperaturze 22°C +/- 2°C, wilgotności powietrza 55-60 %, w cyklu dobowym 12 godzin światła (ciągłość 12 godzinna)/12 godzin ciemności, w pomieszczeniu doświadczalno-bytowym, w którym wymiana powietrza jest na poziomie 8-15 wymian/h. Pomieszczenie wykonane jest w sposób spełniający normy dotyczące pomieszczeń przeznaczonych dla zwierząt laboratoryjnych zgodnie z „Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2016r. w sprawie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać ośrodek oraz minimalnych wymagań w zakresie opieki nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku”. Myszy były utrzymywane w regale klatkowym IVC (indywidualnie wentylowane klatki, 54-krotna wymiana powietrza w klatce na godzinę) wyposażonym w klatki o powierzchni podłogi 550 cm² i wysokości 14 cm, wyposażone w filtr zewnętrzny, oznaczone tabliczką. Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody pitnej oraz pożywienia dla myszy (łac. ad libitum). Na każdą klatkę przypadało po 2-5 osobników, dla których zapewniano urozmaicenia w postaci drewnianych klocków oraz bawełnianych kokonów, na ściółce osikowej odpylonej wymienianej co najmniej 1 raz w tygodniu (lub w zależności od potrzeb).

Mysi model kontrolny C57BL

Myszy zostały pozyskane z Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA).

Mysi model Ki150/150

Mysi model Ki150/150 został stworzony w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk. Zwierzęta te mają podłoże genetyczne myszy C57BL.

5.2.2. Izolacja DNA

DNA zostało wyizolowane z końcowego odcinka ogona. Do izolacji DNA z pozyskanego materiału biologicznego wykorzystano komercyjny zestaw Spin Column Genomic DNA Kit (Bio Basic Inc., Markham, Canada). Genotypy zostały zdeterminowane przez reakcję PCR z GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, USA). Warunki reakcji łańcuchowej polimerazy to 3 min w 94 °C, 12× (35s w 94°C, [45s w 64°C – 0,5°C/cykl], 45s w 72°C), 25× (35s w 94°C, 30s w 58°C, 45s w 72°C) oraz 2 min w 72°C. Produkty reakcji PCR rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE wybarwionym SimplySafe (EURx, Gdańsk, Polska).

5.2.3. PCR i elektroforeza kapilarna

W celu zweryfikowania ilości powtórzeń CAG w grupie myszy modelu Ki150/150 wykonywano reakcję PCR z użyciem GoTaq Flexi DNA Polymerase, i zastosowano znacznik 6-FAM na jednym z primerów potrzebny do elektroforezy kapilarnej. Warunki przebiegu łańcuchowej reakcji polimerazy to 5 min w 94°C, 30× (20s w 94°C, 10s w 60°C, 30s w 72°C) oraz 7 min w 72°C. Produkty reakcji PCR rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE, zwizualizowane przy pomocy SimplySafe (EURx, Gdańsk, Polska). Jednocześnie w celu oznaczenia ich wielkość używając ABI 3130xl Analityzer zlecono przeprowadzenie elektroforezy kapilarnej na uzyskanych produktach reakcji PCR w Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Wynik elektroforezy kapilarnej analizowano indywidualnie w programie Peak Scanner 1.0 (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Ponieważ obecność powtórzeń CAG w fragmentach PCR spowalnia ich elektroforetyczną migrację, przygotowano krzywą kalibracyjną składającą się z zweryfikowanych sekwencyjnie fragmentów o wielkości 21, 69, 81, 91 i 97 CAG i wykorzystano ją do oceny dokładnej liczby powtórzeń CAG w analizowanych próbach.

5.2.4. Operacje stereotaktyczne

Myszy poddane zostały operacjom stereotaktycznych wstrzyknięć domózgowych wektorów wirusowych AAV w znieczuleniu ogólnym mieszkanką tlenu i izofluranu w komorze systemu do anestezji wziewnej. Cały system zbudowany jest z parownika izofluranu, tlenu medycznego, przepływomierza i zaworu do ręcznej kontroli przepływu gazowej mieszaniny znieczulającej. Parametry przepływu izofluranu z gazem nośnym (tlen medyczny) utrzymywane są na poziomie 2,5 – 3 % podczas operacji. Powierzchnia około zabiegowa została zdezynfekowana i przykryta folią, w celu zmniejszenia ryzyka zakażenia. Po uprzednim sprawdzeniu głębokiej anestezji zwierzęcia testem refleksu kończyny tylnej, zwierzę przeniesiono do ramki stereotaktycznej, gdzie dalej pozostawało pod znieczuleniem ogólnym podanym przez stożek nosowy. Głowa zwierzęcia była unieruchomiona za pomocą kołków dousznych i stożka donosowego z uchwytem na górne zęby. Oczy zabezpieczano przed wysychaniem za pomocą lubrykantu. Podczas operacji zwierzę jest ogrzewane przez podkład grzejący dedykowany dla ramki stereotaktycznej, a temperatura ciała jest kontrolowana przez termometr rektalny. Na głowie myszy, w miejscu operowanym, pozbyto się części sierści. Powierzchnię skóry przemywano wodnym roztworem jodiny, wykonano nacięcie. Do uwidocznienia Bregmy użyto jałowego roztworu nadtlenu wodoru. Bregma stanowi punkt odniesienia do iniekcji śródmiąższowych (intraparenchymalnych). Wykorzystując aparat stereotaktyczny z oprogramowaniem ATLAS, określono koordynaty w miejscu których, za pomocą igły 30G nawiercono otwór w czaszce. Terapeutyki zostały podane przez igłę 26G-przytwierdzoną do 10- μ l-strzykawki Hamilton wykorzystując system pompy infuzyjnej (KD Scientific Inc. Holliston, Stany Zjednoczone). pompy pracowały ze stałą prędkością 0,3 μ l/min. Procedura zakłada pozostawienie igły w miejscu wstrzyknięcia przez 5 min po zakończonej infuzji, w celu uniknięcia wycieku roztworu. Skórę zszywano rozpuszczalnymi nićmi chirurgicznymi. Na świeżo zszytą ranę nakładano masę z antybiotykiem. Zwierzęta pozostawały pod stałą opieką pooperacyjną. Otrzymywały podskórne zastrzyki środka przeciwbólowego Opokanu (Meloxicam 1mg/kg m.c.) (AFLOFARM, Pabianice, Polska).

Operacje stereotaktycznie obejmowały lobulę IV-V i VIII mózdzku oraz jądra głębokie mózdzku (DCN ang. Deep Cerebellar Nuclei).

Tabela 4. Koordynaty do iniekcji stereotaktycznych.

Koordynaty lobul mózdzku		
ML	AP	DV
0.0	-6.4	-1.6
0.0	-7.4	-1.9
Koordynaty jąder głębokich mózdzku		
ML	AP	DV
-1.2	-6.4	-3.0
1.2	-6.4	-3.0

ML-Medial-Lateral; AP-Anterior-Posterior; DV-Dorsal-Ventral

5.2.5. Testy behawioralne

Wszystkie badania behawioralne były wykonywane bez znajomości genotypu zwierząt i rodzaju zastosowanego reagenta.

Testy punktacji fenotypu (ang. Phenotype scoring test)

Wykonano testy punktowe przeznaczone do oceny fenotypu ataksji w modelach mysich (Guyenet i in. 2010). W skład testów punktowych fenotypu wchodzi 4 analizy; test krawędzi (ang. ledge test), zaciskania kończyn tylnych (ang. hindlimb clasping), chód (ang. gait) oraz kifoza (ang. kyphosis). Na ogólny wynik testów fenotypu myszy transgenicznym modelu Ki150 SCA3 oraz myszy kontrolnych C57BL składała się suma punktów zebranych z 4 testów (skala 0-3, gdzie 0 oznacza brak objawów fenotypowych, minimalny zsumowany wynik=0, maksymalny wynik=12).

Test Rotarod

Test Rotarod zakłada badanie myszy przez 3 następujące po sobie dni, a każda sesja dzienna obejmowała 5-minutową próbę treningową na aparacie Rotarod przy prędkości 4 RPM. Po odpoczynku trwającym 30 minut, myszy poddawano 3 kolejnym 5 minutowym próbom w warunkach liniowego przyspieszenia prędkości od 4 – 40 RPM w czasie 300s. Parametr czasu upadku myszy z pręta rejestrowano dla każdej próby. Maksymalny mierzony czas dla myszy to 300s, po tym okresie zatrzymywano rejestrację, a mysz wracała do klatki. Dane z dnia treningowego nie były uwzględniane w analizach statystycznych.

Test prętów statycznych (ang. StaticRod test)

Konfiguracja i protokół testu prętów statycznych zostały zaadaptowane z publikacji Deacon (Deacon 2013), z modyfikacjami. 5 drewnianych prętów o długości 60 cm, o średnicach 35 mm, 28 mm, 21 mm, 17 mm i 9 mm, reprezentujących różne stopnie trudności umieszczono na dedykowanej półce, 60 cm nad podłogą. Pod prętami umieszczono materac zapobiegający zranieniu myszy podczas sporadycznych upadków. Na półce rozsypano ściółkę, aby zachęcić myszy do podążania w kierunku półki. Rejestrowano czas obrotu myszy i czas przejścia przez pręt. Myszy otrzymywały maksymalny wynik 30s, jeśli nie udało im się odwrócić, spadły, odwróciły się do góry nogami na pręcie, nie udało im się przejść, lub jakakolwiek kombinacja tych zachowań w danym czasie. Myszy poddawano jednemu dniu treningowemu, a następnie były testowane przez 3 kolejne dni. Dane z dnia treningowego nie były uwzględniane w analizach statystycznych.

Pomiar masy ciała

Wszystkie myszy biorące udział w eksperymentach i operacjach stereotaktycznych były poddawane pomiarom masy ciała. Monitorowanie masy ciała odbywało się w ściśle określonych, równych odstępach czasu przypadających na dni testów behawioralnych.

5.2.6. Pobór tkanek

Grupy myszy poświęcano za pomocą perfuzji przez sercowej. Zwierzęta znajdowały się pod głęboką anestezją podczas całego zabiegu. Kolejne zwierzęta, pojedynczo przytwierdzano do podłoża, w pozycji grzbietowej, część brzuszną zwilżono 60% roztworem etanolu. Wykonano cięcie przez powłokę zewnętrzną i ścianę jamy brzusznej poniżej jamy klatki piersiowej. Następnie wykonano małe nacięcie przepony, które kontynuowano na całej jej długości, aby odsłonić jamę opłucnową. Nacięto żebra aż do obojczyka po obu stronach klatki piersiowej. Ostrożnie przycięto tkanki połączone z sercem. Szybkim i delikatnym ruchem umieszczono igłę w lewej komorze serca przez koniuszek serca, z jednoczesnym przecięciem prawego przedsionka serca. Przeprowadzono perfuzję roztworem PBS o temperaturze 4°C, 30ml na mysz. W zależności od kierunku dalszych eksperymentów immunopatologicznych, genomicznych, proteomicznych, odpowiednio mózg umieszczano w roztworze 4% PFA (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), lub rozpracowano

metodą selektywnej dyssekcji na struktury opuszki węchowej (OB ang. Olfactory bulb), kory mózgu (CTX ang. Cortex), mózdzku (CERE ang. Cerebellum), prążkowiec (ang. Striatum), hipokamp (HP ang. Hippocampus), pień mózgu (P, M ang. Pons, Medulla), międzymózgowie (M, ang. Midbrain), podwzgórze (T, H ang. Thalamus i Hypothalamus).

5.2.7. Western blot

Izolacja i pomiar stężenia białka

Struktury mózgu zebrano podczas selektywnej dyssekcji. Tkanki w probówkach natychmiast zanurzone w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C . W celu izolacji białek dodano 300-500 μl (w zależności od wielkości struktury) 1x buforu PB i homogenizowano. Proces ten przeprowadzono za pomocą TissueRuptor (Qigen, Hilden, Niemcy), a następnie sonikatora Sonoplus mini20 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone) przy parametrach pracy: 20s., 60 % mocy, 2 cykle, 4°C . Próby pozostawiono na 20 min w temperaturze 4°C , następnie wirowano przy 10000 RPM, przez 10 min w temperaturze 4°C . W kolejnym etapie lizy supernatant przeniesiono do nowo przygotowanych probówek i powtórzono proces wirowania jeszcze raz.

Stężenie białka mierzono korzystając z zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone), zgodnie z instrukcją producenta, i programu Tecan (Tecan Group AG, Männedorf, Szwajcaria). Odczyt 96-dółkowej płytki odbywał się przy długości fali 562 nm. Stężenie w próbach przeliczono na podstawie sporządzonej krzywej standardowej stężenia BCA z zestawu.

Elektroforetyczny rozdział białka w warunkach denaturujących

Elektroforetyczny rozdział białek prowadzono w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących standardowo stosując żel komercyjny 4-15% (4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, Bio-Rad). Próby na żel przygotowano dodając do otrzymanych lizatów bufor obciążający zawierający 2-merkaptoetanol, 1x stężony bufor PB i inkubując 5min w 95°C . Na żel наносzono próbki o objętości odpowiadającej 25 μg całkowitego białka na dołek. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 20 min przy napięciu 70V, po czym podwyższono wartość napięcia do 150V, a rozdział prowadzono przez kolejne 2 godziny w aparacie Mini-Protean® Tetra (Bio-Rad). Do określenia masy molekularnej rozdzielanych białek użyto marker wielkości białek Pageruler™ Prestained Protein Ladder, o zakresie białek od 10 kDa do 180 kDa.

Transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową

Białka były transferowane w module Mini Trans-Blot® Module (Bio-Rad), mokrą metodą. Wycięto membrany nitrocelulozowe o wielkości porów 0,45µm, oraz bibuły Whatmann. Żel, bibuły Whatmann i gąbki inkubowano w buforze do transferu przez 10 min. Membranę nitrocelulozową przygotowano przez wypłukanie jej w wodzie przez 1 min, a następnie w buforze do transferu. W plastikowym pojemniku wypełnionym buforem do transferu umieszczono kolejno w następującej kolejności plastikową kasetę, gąbkę, 3 bibuły Whatmann, membranę nitrocelulozową, żel poliakrylamidowy, 3 bibuły Whatmann i gąbkę. Kasetę zamknięto uprzednio wyzbywając się pęcherzy powietrza pomiędzy warstw, umieszczono w aparacie do transferu mokrego, zalano buforem do transferu, dodano wkład chłodzący oraz mieszadło magnetyczne. Warunki transferu mokrego to 90V przez 1,5 godziny w temperaturze 4°C. Efektywność procesu sprawdzono przez wybarwienie membrany roztworem Ponceau S.

Detekcja białek

W celu wypłukania roztworu Ponceau S membranę płukano 3x TBS-T przez 10 min na mieszadle (SunLab, Warszawa, Polska). Następnie, membranę blokowano 5 % roztworem odtłuszczonego mleka w buforze TBS-T przez 1 godzinę, w celu uniknięcia niespecyficznego wiązania się do niej przeciwciał. Po tym czasie membranę płukano 3x TBS-T przez 10 min i inkubowano przez noc w 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym przygotowanym w buforze TBS-T zawierającym 5% mleko (Tab. 2). Zakończono inkubację, membranę płukano 3x w TBS-T przez 10 min. i inkubowano przez 1 godzinę z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym, sprzężonym z peroksydazą chrzanową w buforze TBS-T z 5% mlekiem. Po tym czasie membranę płukano 3x w TBS-T przez 10 min, i za pomocą substratu dla peroksydazy chrzanowej (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) przeprowadzano detekcję białek. Membranę zamknięto pomiędzy dwoma warstwami plastikowej folii, zapobiegając jej wysychaniu, a sygnał odczytano za pomocą systemu G:box.

5.2.8. qPCR

Izolacja RNA i oznaczenie jego stężenia

Tkanki pobrano do próbek uprzednio napełnionych TriReagentem (MRC, Cincinnati, OH, USA), natychmiastowo zanurzono je w ciekłym azocie. W zależności od wielkości tkanki dostosowano objętość TriReagentu od 300 do 800µl/struktura.

Całkowite RNA izolowano stosując homogenizator Tissue Ruptor (Qigen, Hilden, Niemcy), zgodnie z instrukcjami producenta. Roztwór po homogenizacji w objętości 200µl przeniesiono do świeżych probówek, dopełniono TriReagentem do objętości 1ml, dodano 200µl chloroformu, wstrząsano i odstawiono na 15min w temperaturze pokojowej. Następnie wirowano próby przez 15min w warunkach 12000g, w temperaturze 4°C. Po wirowaniu zebrano roztwór warstwy przezroczystej do nowych probówek, dodano izopropanolu i worteksowano przez 15 s. Próby inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej, po czym wirowano je przez 10 min w 12000g, w 4°C. Usunięto supernatant, a pelet rozpuszczono w 1 ml 75% roztworu etanolu, próby worteksowano i wirowano w 7500g przez 5 min w temperaturze 4°C. RNA osuszono na termomikserze (Biosan, Józefów, Polska) w 37°C oraz zawieszono w 30-40µl wodzie wolnej od RNAz (EURx, Gdańsk, Polska).

Po izolacji stężenie i czystość RNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 230 nm, 260 nm i 280 nm korzystając ze spektrofotometru NanoDrop. 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.

Synteza cDNA

Syntezę cDNA wykonano przy użyciu MultiScribe™ odwrotnej transkryptazy (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) według protokołu producenta. Przygotowano 2x stężony RT master mix. Do reakcji użyto 500 ng całkowitego RNA wyizolowanego wcześniej z materiału biologicznego. Warunki przebiegu reakcji syntezy cDNA to 10 min w 25 °C, 120 min w 37 °C, 5 min w 85 °C, oraz ∞ w 4 °C.

PCR w czasie rzeczywistym (, ang. quantitative PCR; qPCR)

Amplifikację uzyskanego cDNA przeprowadzono w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 9 µl dwukrotnie stężonego roztworu EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone), 1 µl matrycy oraz pary specyficznych starterów (200 nM każdy). 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 β -aktyny. Reakcje amplifikacji cDNA przeprowadzano używając termocyklera CFX Connect™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Parametry użytego programu to 40× (30s w 95°C, 15s w 95°C, 30s w 60°C), po czym następował odczyt płytki. Krzywa topnienia 5 s 65°C -> 95°C (0,5°C/s). Wydajność amplifikacji par starterów wyliczano na podstawie wyników uzyskanych z serii 10-krotnych rozcieńczeń matrycy. Wyznaczano w tym celu krzywą regresji na podstawie uzyskanych 5 punktów pomiarowych i współczynnik nachylenia prostej. Po zakończeniu reakcji wartości względnej ekspresji dla każdego transgenu obliczono metodą E z użyciem β -aktyny jako genu referencyjnego, który oznaczano jednocześnie z badanymi transkryptami.

5.2.9. Barwienia immunofluorescencyjne

Przygotowanie skrawków mózgowych na mikrotomie

Zebrano mózgi, utrwalono je w 4% PFA przez 48 h, a następnie poddano kriokonserwacji w gradientowym stężeniu roztworu sacharozy (10-20-30%) w PBS przez 72 h.

20 μ m przekroje koronalne i sagitalne wycinków mózgu myszy były cięte przy użyciu kriostatu w temperaturze -20°C (Leica), by następnie zostały zebrane na szkiełkach SuperFrost Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone). Sekcje były poddawane trwającemu 24h procesowi suszenia bezpośrednio po krojeniu w temperaturze pokojowej, po czym przechowywane w zamrażarkach w temperaturze -20°C.

Immunofluorescencja

Skrawki inkubowano w 0,1% roztworze Tritonu X-100 w PBS przez 1 godzinę, w temperaturze pokojowej (RT) z mieszaniem. Sekcje płukano 3x po 5 min w roztworze PBS, i zablokowano poprzez inkubację w 4% roztworze normalnej surowicy koziej (NGS ang. Normal Goat Serum) w PBS przez 1 godzinę. Dla metody barwienia immunofluorescencyjnego, skrawki mózgu inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z pierwszorzędowym przeciwciałem.

Następnie z przeciwciałem drugorzędowym znakowanym Cy3 i AlexaFluor647 (1:500). Ostatnim etapem było barwienie sekcji barwnikiem jądrowym Hoechst 33342 (Sigma) w stosunku 1:1,000. Skrawki wypłukano w roztworze PBS, potem w wodzie MiliQ, na szkiełko nakropiono krople Mounting Medium Fluoroshield (Sigma), położono ostrożnie szkiełko nakrywkowe.

Wizualizacja biodystrybucji eGFP

Preparaty wizualizowano korzystając z systemu mikroskopowego Opera LX (PerkinElmer).

Wizualizacja wybranych markerów neurologicznych

Obrazy konfokalne pozyskiwano przy użyciu systemu mikroskopowego Opera LX (PerkinElmer) z użyciem obiektywów 20× i 40×. Immersję wodną zastosowano przy obiektywie 40×. Parametry mocy lasera nie zmieniały się podczas akwizycji obrazów i wynosiły 50-70%, nakładanie się zdjęć utrzymano na poziomie 5% dla zdjęć jakościowych, dla zdjęć wykorzystanych do analiz ilościowych nakładanie się zdjęć (ang. overlapping) utrzymano na poziomie 0%, czas ekspozycji 100 ms. Obrazy były przetwarzane przy użyciu oprogramowania ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

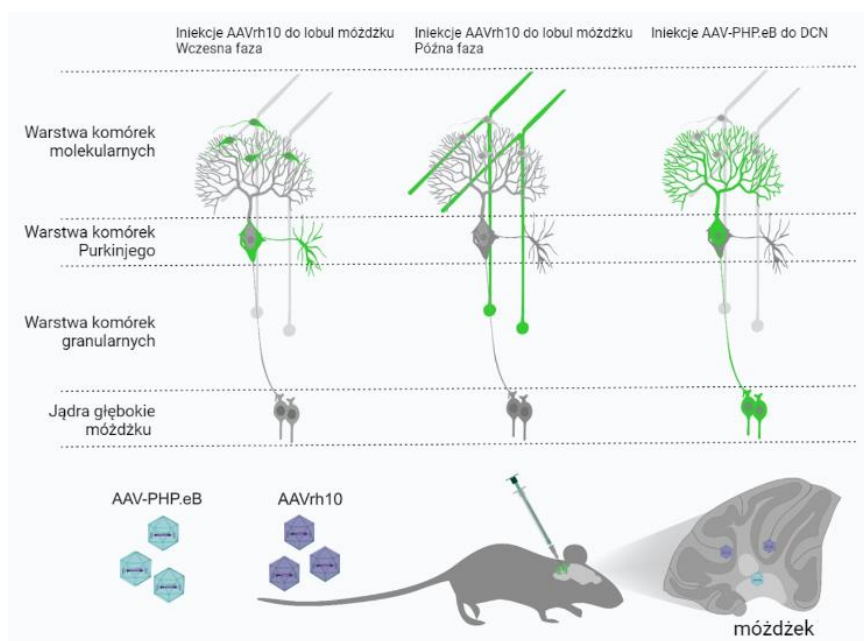
5.2.10. Statystyka

Do analiz statystycznych testów behawioralnych, pomiaru wagi zwierząt w pięciu punktach czasowych zastosowano dwuczynnikowy test ANOVA, połączony z testem post hoc LSD Fishera. Kalkulacje statystyczne danych uzyskanych z analiz białkowych metody western blot oraz metody immunofluorescencyjnej przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowego testu ANOVA, połączonego z testem post hoc Mann-Whitneya. Analizy statystyczne otrzymanych danych przeprowadzono w przypadku PCR w czasie rzeczywistym za pomocą analizy wariancji jednoczynnikowego testu ANOVA, połączonego z testem post hoc Mann-Whitneya. Do analiz użyto danych z trzech powtórzeń danego eksperymentu. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano używając programu GraphPad Prism v.6.01 (GraphPad Software, San Diego California USA), różnice między wartościami uznawano za istotnie statystycznie gdy $p < 0,05$. Wyniki liczbowe przedstawiono jako wartość średnią \pm SEM. Szczegóły statystyczne eksperymentów (test statystyczny, wartość n) znajdują się w wynikach i legendzie rysunków.

6. Wyniki

6.1. Schemat metody selektywnej i efektywnej transdukcji populacji komórek mózdzku wektorami wirusowych AAVrh10 oraz AAV-PHP.eB

W mózdzku wyróżnić można kilka warstw i struktur, z wieloma typami komórek, w tym komórkami Purkiniego (ang. Purkinje cells) neuronami granularnymi (ang. granular cells), neuronami gwiaździstymi (ang. stellate cells) i neuronami koszykowymi (ang. basket cells). Wszystkie populacje komórek są ściśle powiązane ze sobą, poprzez ich projekcje aksonalne i dendrytyczne, tworząc idealny układ eksperymentalny do badania retrogradowego dostarczania terapii opartych na wektorach wirusowych typu AAV do interesujących nas komórek.



Rysunek 4. Mózdzek składa się z warstwy molekularnej (ang. molecular layer; ML), warstwy granularnej (ang. granular layer; GL) i warstwy komórek Purkiniego (ang. Purkinje cell layer; PCL), w których wyróżnić można różne populacje komórkowe, w tym komórki Purkiniego, komórki granularne, neurony gwiaździste i koszykowe. Wektory wirusowe typu AAVrh10 i AAV-PHP.eB umieszczone w pobliżu zakończeń aksonalnych w ramach lokalnej iniekcji do lobul lub jąder głębokich mózdzku (DCN), mogą selektywnie transdukować neuronów mózdzku, takie jak komórki Purkiniego i komórki granularne.

Zielony kolor: komórki transdukowane przez wektory wirusowe AAV, komórki koszykowe i gwiaździste z ekspresją eGFP po iniekcjach AAVrh10 do lobul mózdzku we wczesnej fazie; komórki granularne i ich aksony z ekspresją eGFP po iniekcjach AAVrh10 do lobul mózdzku w późnej fazie; komórki Purkiniego oraz DCN z ekspresją eGFP po iniekcjach do DCN mózdzku.

Naszym głównym celem było opracowanie metody lokalnego dostarczenia reagentów shRNA w formacie AAV do komórek Purkiniego mózdzku. Komórki te ekspresują enzym CYP46A1, którego obniżenie z pomocą reagentów shRNA jest jednym z celów eksperymentalnych opisanych w pracy. Zaletą lokalnej iniekcji wektora AAV_shRNA jest jego selektywne dostarczenie do tkanki, redukcja dawki i efektów niepożądanych w porównaniu do iniekcji systemowej. Założyliśmy, że odpowiednio przeprowadzone iniekcje lokalne pozwalają na lepszą dystrybucję w populacjach komórek mózdzku, przy wykorzystaniu efektu retrogradowości AAV. Dlatego schemat eksperymentalny uwzględniał możliwość dostarczenia wektorów wirusowych AAVrh10 i AAV-PHP.eB w pobliżu zakończeń aksonalnych. Takie ukierunkowane wstrzyknięcia do lobul pozwalają umieścić wektor w pobliżu zakończeń aksonów neuronów granularnych, koszyczkowych i interneuronów. Natomiast wstrzyknięcia do jąder głębokich mózdzku (DCN) umieszczają AAV w pobliżu zakończenia aksonalne komórek Purkiniego (Rys. 4). Wykazaliśmy, że wektor wirusowy AAVrh10 wstrzyknięty do lobul, w wczesnej fazie, transdukuje komórki gwiaździste i koszyczkowe warstwy molekularnej. W późniejszej fazie, na skutek transportu retrogradowego dochodzi do transdukcji komórek granularnych. Wektor AAV-PHP.eB umieszczone w DCN, czyli w okolicy zakończeń aksonalnych komórek Purkiniego wywołują ich selektywną transdukcję (Rys. 4). W związku z silną predyspozycją do transportu retrogradowego, oba serotypy mają zdolność do selektywnej transdukcji komórek Purkiniego, dzięki czemu stanowią ważne narzędzie do ukierunkowanego i efektywnego dostarczenia narzędzi terapii genowej.

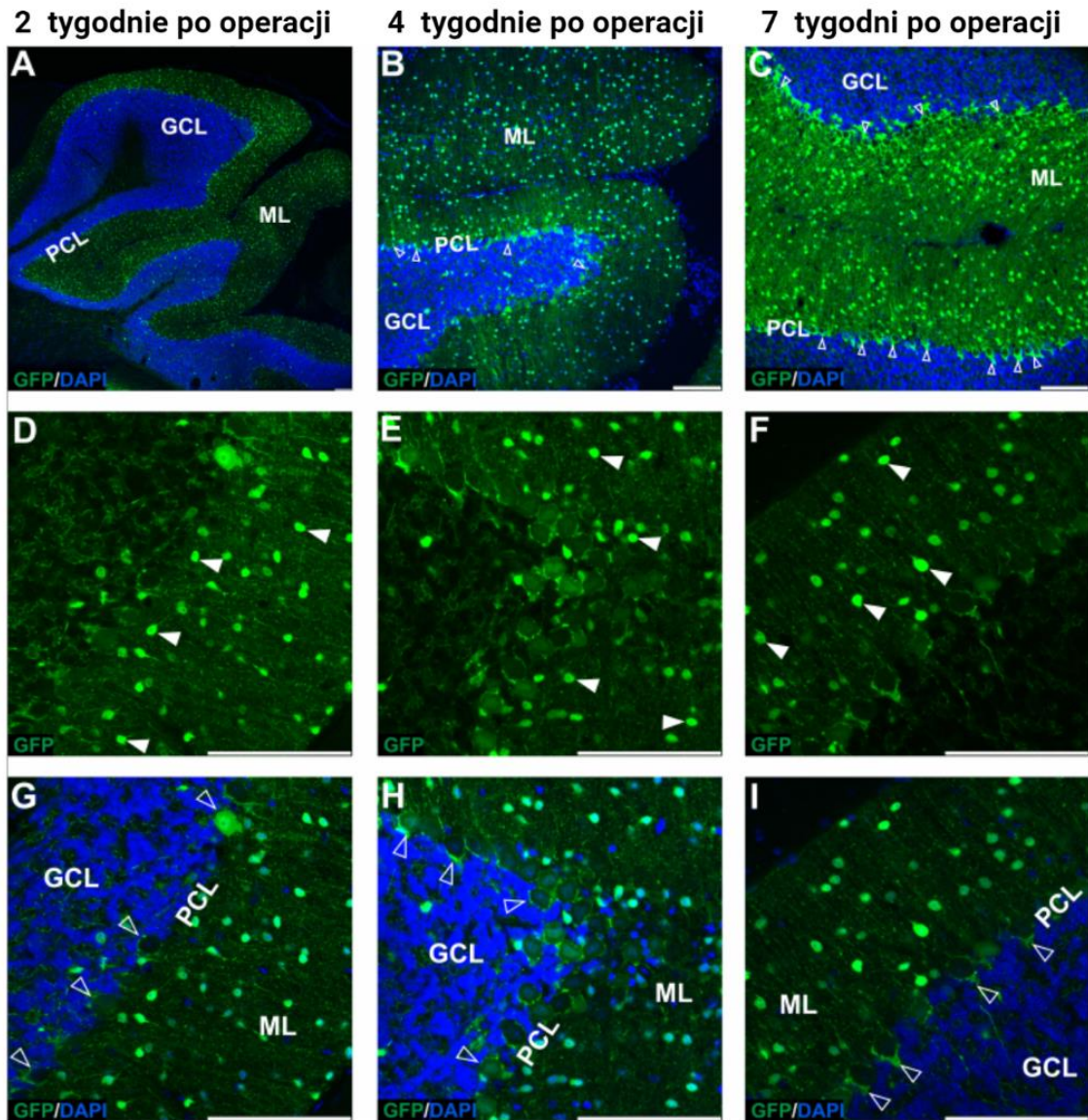
6.2. Transdukcja komórek mózdzku po iniekcjach wektorem AAVrh10

6.2.1. Iniekcje lobularne

Wczesny wzór transdukcji

Transkrypt kodujący eGFP został wstrzyknięty śródmiąższowo w lobulę IV-V oraz VIII mózdzku w nośniku wirusowym AAVrh10. Obserwacji poddano wzory transdukcji uzyskane po 2, 4 oraz 7 tygodniach po iniekcjach stereotaktycznych. Sygnał transdukcji eGFP wczesnej fazy (do 7 tygodnia po iniekcji) lokował się głównie w szerokiej gamie komórek warstwy molekularnej mózdzku, lobul zlokalizowanych blisko miejsca iniekcji. Natomiast nie zauważono efektu transdukcji w komórkach warstwy Purkiniego, oraz warstwy granularnej mózdzku (Rys. 5). Komórki warstwy molekularnej

z pozytywnym sygnałem eGFP, to prawdopodobnie (bazując na charakterystyce morfologicznej) komórki gwiaździste oraz komórki koszykowe. Odpowiednie populacje neuronów rozproszonych wzdłuż warstwy molekularnej, u których zaszła transdukcja eGFP, zostały przedstawione na rycinie (Rys. 5D-I). Pierwotnie sygnał z warstwy komórek Purkinjego został przypisany jedynie ciałom tych komórek. Jednak bardziej wnikliwa analiza mikroskopowa oraz większe powiększenie ujawniło, że sygnał eGFP układał się ciasno wokół ciała komórek Purkinjego, stanowiąc koszyki około komórkowe; struktury formowane przez komórki koszykowe, znane jako pędzelek (ang. pinceau) (Rys. 5B-C, G-I) (Brown et al., 2019). Na podstawie przedstawionych rysunków (Rys. 5) wnioskowaliśmy, że iniekcje lobularne do mysiego mózdzku wektora wirusowego AAVrh10_eGFP, do punktu czasowego 7 tygodni po operacji stanowią wzorzec dla transdukcji komórek ML mózdzku, z wyłączeniem komórek Purkinjego. AAVrh10 wstrzyknięty do lobul mózdzku wywołuje wczesną transdukcję w komórkach gwiaździstych i koszykowych (Rys. 4, 5).



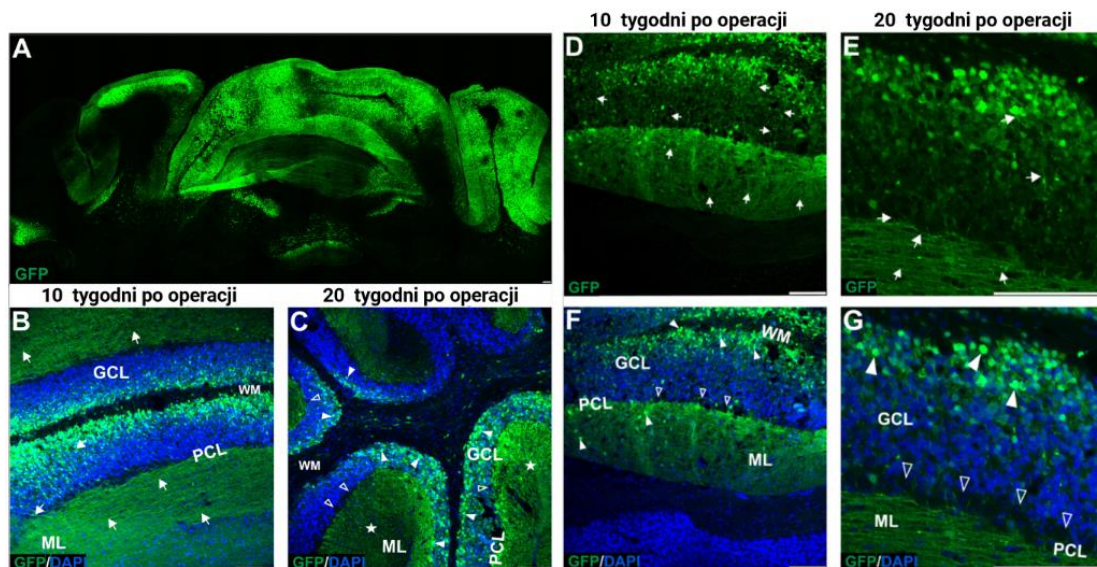
Rysunek 5. Wczesna faza transdukcji mózdzku myszy po wstrzyknięciach lobulowych wektora AAVrh10_eGFP. Wzorec transdukcji został określony na podstawie obrazowania komórek eGFP+ 2 tygodnie (A, D, G), 4 tygodnie (B, E, H) i 7 tygodni po iniekcji (C, F, I). Komórki eGFP+ obserwowano w ML, groty strzałek (D-F), wskazują na małe ciała komórkowe, a ich położenie charakterystyczne sugeruje, że są to komórki gwiaździste. Co ważne, nie zaobserwowano sygnału eGFP w komórkach Purkinjego. Ponadto, silny sygnał eGFP+ obserwowano w charakterystycznych strukturach zwanych pinceau, owiniętych wokół eGFP-ujemnych ciał komórek Purkinjego (niewypełnione groty strzałek, B-C, G-I). Takie specyficzne struktury są od dawna znane wyłącznie jako części projekcji komórek koszykowych.

Na rysunku A-C, G-I zielone barwienie eGFP połączono z niebieskim barwieniem jąder komórkowych DAPI. Groty strzałek: komórki eGFP+ w ML. Niewypełnione groty strzałek: koszyczki okołokomórkowe i pinceau; GCL - warstwa komórek granulanych; ML - warstwa molekularna; PCL - warstwa komórek Purkinjego. Przekroje koronalne. Skala: 100 μ m w prawym dolnym rogu obrazów. Transdukcja komórek Purkinjego i komórek ziarnistych: mniej niż 1%; N=3 zwierząt.

Późny wzór transdukcji

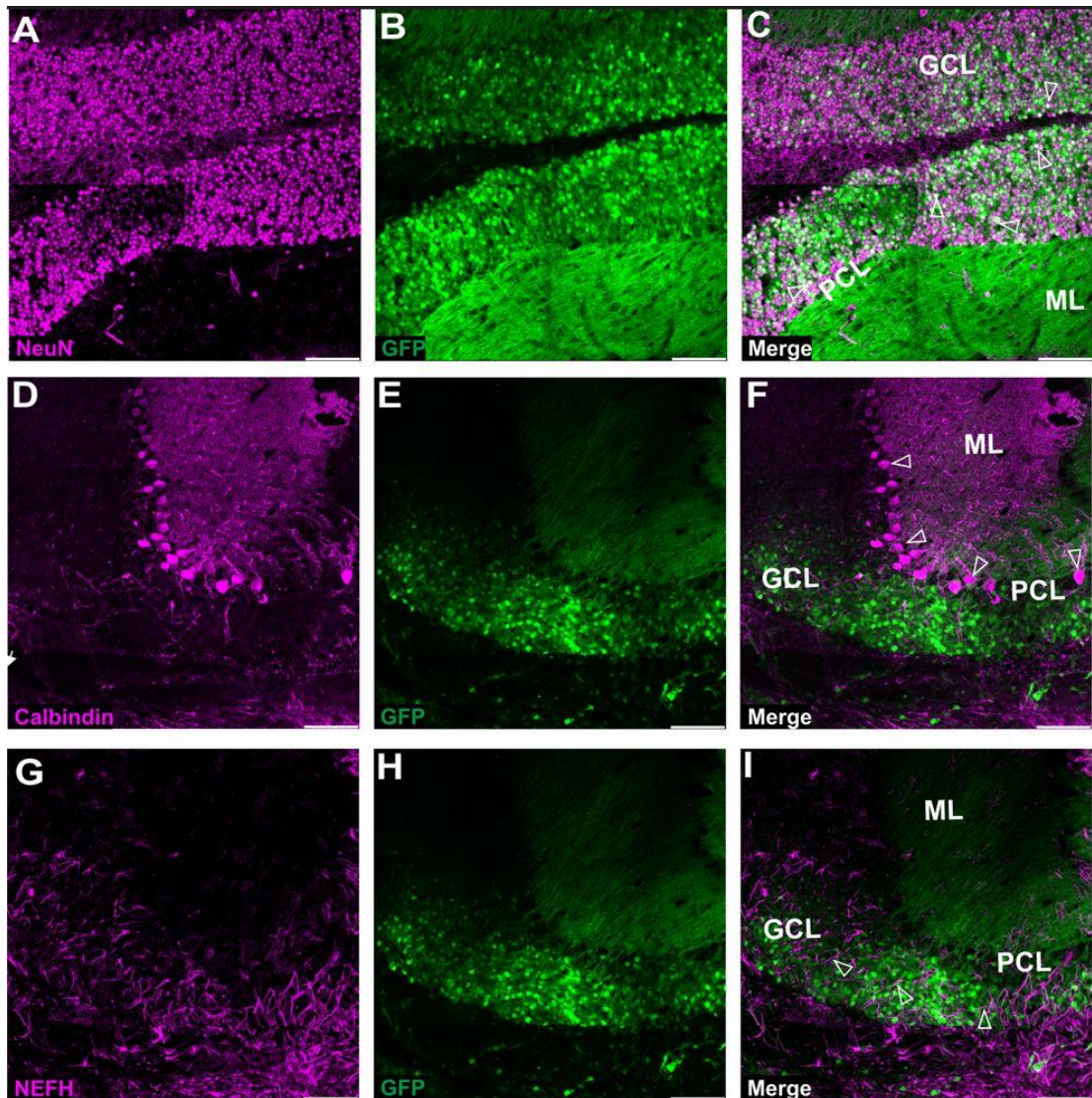
W analizie późnego stadium, w punkcie czasowym 10 i 20 tygodni po operacji zauważono, że wzór transdukcji w mózdzku po zastosowaniu wektora wirusowego AAVrh10_eGFP uległ zmianie. Pomiędzy 10, a 20 tygodniem sygnał ekspresji eGFP był również widoczny w warstwie granularnej mózdzku (Rys. 6). Co więcej w późnym stadium po iniekcjach, sygnał pochodził również z aksonów komórek GL, które prowadziły przez PCL, sięgając do ML, w której układały się równoległe do ML (Rys. 6B, D-E). Jednocześnie zauważyliśmy, że transdukcja komórek granularnych obejmowała wiele lokalizacji w mózdzku sugerując szeroką dystrybucję zastosowanego AAV. Efektywność transdukcji była bardzo wysoka, sięgnęła $87,5\% \pm 2,5\%$, w warstwie komórek granularnych w regionie miejsca iniekcji (ang. region of injection; ROI) (Rys. 6A), oraz w bardziej odległym od miejsca iniekcji regionie wynosiła $65\% \pm 9\%$ (Rys. 3A, G) (\pm SEM, N=3 zwierzęta). W związku z bardzo gęstym usieciowaniem GL przez komórki granularne, obliczenia statystyczne wykonano na podstawie zmierzenia intensywności fluorescencji komórek eGFP+, oraz manualnego liczenia komórek GL. W późnych punktach czasowych wart odnotowania jest fakt zanikającej w czasie ekspresji eGFP w komórkach warstwy molekularnej i struktur pinceau. Obserwowaliśmy jedynie nieliczne komórki eGFP+ w ML. Włókna równoległe (ang. parallel fibers) uchwycono w przekroju koronalnym mózgu (Rys. 6B, D-G). W sekcjach sagitalnych włókna równoległe tworzą kropkowane pola w ML na Rysunku 6C. Po upływie 10 tygodni zanikający z ML sygnał eGFP pojawił się w komórkach warstwy granularnej. Dystrybucja eGFP w GL była intensywniejsza w głębszych regionach tej warstwy, co wskazuje na znane jako najstarsze filogenetycznie komórki granularne (Rys. 6F-G). Komórki transdukowane przez AAVrh10_eGFP zostały zidentyfikowane na podstawie badania immunohistochemicznego. Kolokalizacja w komórkach granularnych wystąpiła przez nałożenie się dwóch sygnałów; pochodzących z transdukcji eGFP oraz markera komórek granularnych NeuN (Rys. 7A-C). Markery pozostałych populacji komórek mózdzku nie uległy kolokalizacji z sygnałem eGFP (Rys. 7). Poprzez barwienie Kalbindyną wizualizowało ciała, aksony oraz drzewa dendrytyczne PC (Rys. 7D-F) potwierdzając brak kolokalizacji z kanałem eGFP w tych komórkach. Projekcje neurofilamentu wybarwione markerem NEFH w obu warstwach GL i ML były eGFP negatywne sugerując brak dystrybucji w komórkach koszykowych i projekcji PC w późnym stadium po iniekcjach lobularnych (Wiatr et al., 2021) (Rys. 7G-I). AAVrh10 za

pośrednictwem transportu retrogradowego transdukuje komórki granularne w późnej fazie.



Rysunek 6. Późna faza transdukcji mózdzku myszy po wstrzyknięciach lobulowych wektora wirusowego AAVrh10 kodującego eGFP. Wizualizowanie transdukowanych komórek eGFP⁺ przeprowadzono w punkcie czasowym 10 (B, D, F) i 20 tygodni od iniekcjach (A, C, E, G). Sygnał eGFP obserwowano w okrągłych ciałach komórkowych warstwy granularnej GL (groty strzałek, B-C, F-G). Zarówno po 10, jak i 20 tygodniach od iniekcji, sygnał z eGFP obserwowano w aksonach biegnących w warstwie komórek granularnych (strzałki, D-E) oraz poprzecznych włóknach biegnące w ML (strzałki, B,D-E, gwiazdki C). Podobnie jak w przypadku wczesnego stadium transdukcji, sygnał eGFP nie był obserwowany w komórkach Purkiniego (niewypełnione groty strzałek wskazują eGFP ujemne ciała PC, C, F, G). Panele E, G wskazują ciała i aksony GC pod większym powiększeniem. Niewypełnione groty strzałek: Ciała komórek Purkiniego. Strzałki: ekspresja eGFP we włóknach poprzecznych lub aksonach komórek granularnych. Gwiazdki: włókna poprzeczne na przekroju poprzecznym. GCL - warstwa komórek granularnych; ML - warstwa molekularna; PCL - warstwa komórek Purkiniego; WM - istota biała A, B, D-G przekroje koronalne, C przekroje sagitalne. Skala: 100 μ m w prawym dolnym rogu obrazów. Efektywność transdukcji komórek granularnych po lobularnych iniekcjach z zastosowaniem AAVrh10 (późne stadium): 65% \pm 9% SEM; N=3 zwierzęta.

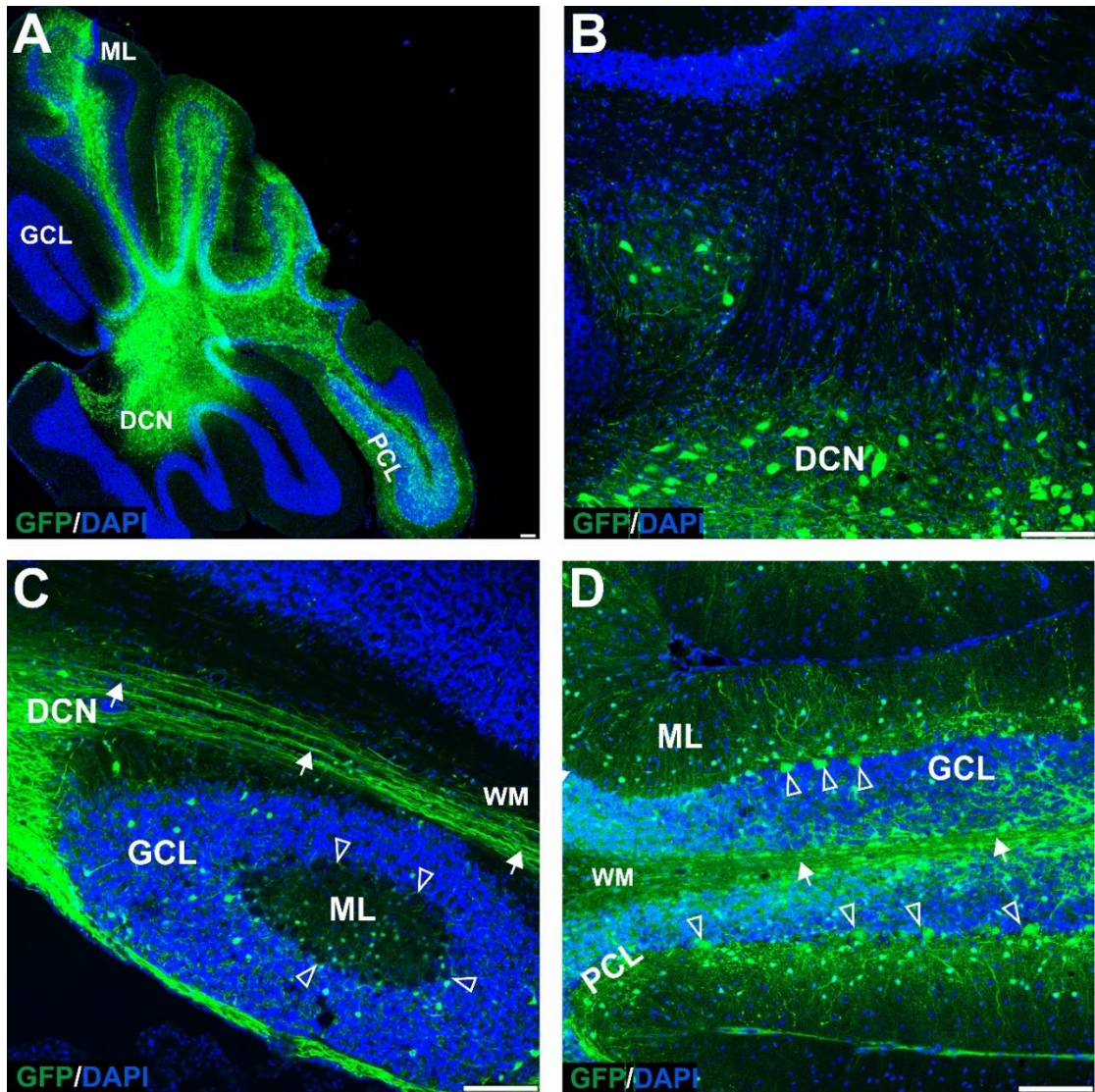
Podsumowując, późne stadium transdukcji z zastosowaniem wektora wirusowego AAV serotypu rh10 wykazało przemieszczenie sygnału eGFP⁺ skutkujące prawie wyłączną transdukcją komórek granularnych z jednoczesnym znakowaniem ich proksymalnych aksonów i dystalnych włókien poprzecznych.



Rysunek 7. Barwienie ko-immunofluorescencyjne skrawków mózdzku myszy pomiędzy 10, a 20 tygodniem po lobularnych iniekcjach z zastosowaniem wektora wirusowego AAVrh10. Zielony sygnał eGFP został przedstawiony razem z NeuN (fioletowy), lub kalbindyną 1 (fioletowy), lub neurofilamentem NEFH (fioletowy). Marker komórek ziarnistych, NeuN, pojawił się w miejscu komórek emitujących zielone światło, w procesie nakładania dając sygnał koloru białego (C). Barwienie dla markera komórek Purkiniego, kalbindiny 1 (D), nie wykazało kolokalizacji z sygnałem eGFP (F) Marker NEFH, który jest odpowiedzialny za barwienie projekcji komórek Purkiniego i koszykowych w mózdzku (Wiatr i in., 2021) również nie kolokalizował z sygnałem eGFP (I). Puste grotki strzałek: komórki granularne (C) lub ciała komórek Purkiniego (F) lub neurofilamenty (I). GCL - warstwa komórek granularnych; ML - warstwa molekularna; PCL - warstwa komórek Purkiniego. Przekrój koronalny. Skala: 100 μm w prawym dolnym rogu obrazów. Niewielkie niedopasowanie złożonych obrazów w panelach A-C wynika z właściwości optycznych Opera Phenix. Obrazy uzyskane od N=3 zwierzęta.

6.2.2. Iniekcje do jąder głębokich mózdzku

Bardzo uboga transdukcja komórek PC po iniekcjach lobularnych AAVrh10 skłoniła nas do zastosowania nowej metody dostarczania wybranego wektora AAV. Początkowo wstrzyknięcia w lobule mózdzkowe spowodowały dystrybucje eGFP w komórkach ML, następnie sygnał translokował do aksonów GC i komórek GL odległych od miejsca iniekcji. Wzór transdukcji jak i pośrednia dystrybucja ciał komórek dalszych od regionu iniekcji wskazuje na retrogradową formę transportu wektorów wirusowych wzdłuż aksonów. Aksony PC przechodzą przez istotę białą i formują synapsy na neuronach DCN. Wiedza ta skłoniła nas do dedukcji, że efektywną transdukcję PC można osiągnąć przez iniekcje AAVrh10_eGFP do DCN i transport wektorów wzdłuż aksonów. Wykonane przez nas iniekcje do DCN, wykazały, że DCN został efektywnie stransdukowany przez AAVrh10_eGFP, a silny sygnał był widoczny nawet 10 tygodniu od iniekcji stereotaktycznej (Rys. 8A). Co więcej, sygnał lokalizował się w odległych od miejsca iniekcji regionach mózdzku (Rys. 8A), wzdłuż aksonów (Rys. 8C) jak również w kilku ciałach komórek Purkinjego (Rys. 8D). Neurony należące do DCN (Rys. 8B) oraz aksony istoty białej (Rys. 8C-D) również emitowały sygnał eGFP. Pomimo rozległej transdukcji w istocie białej, jedynie nieliczne PC ekspresjonowały eGFP ($13\% \pm 5\%$ efektywnej transdukcji w PC; \pm SEM N=3 osobniki) (Rys. 8D).



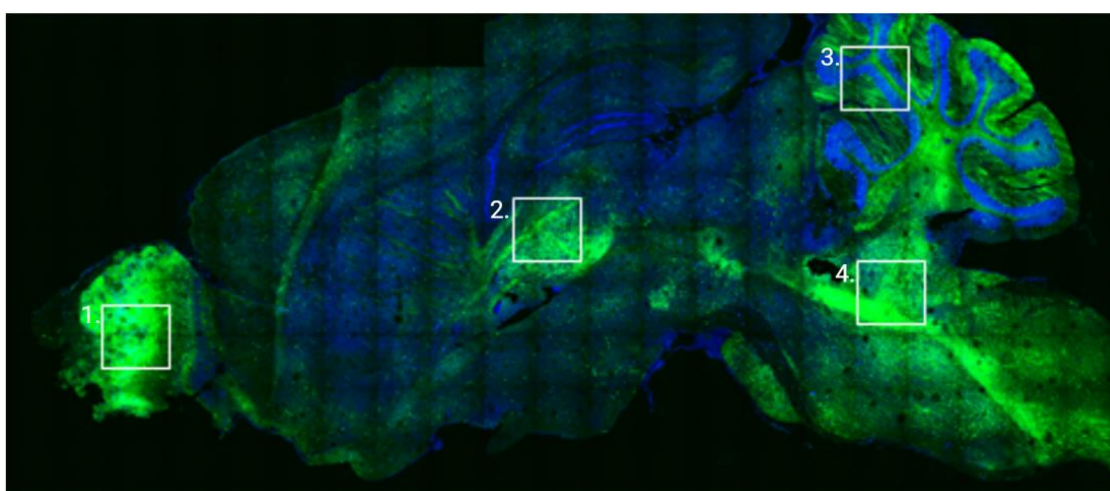
Rysunek 8. Transdukcja mózdzku myszy po iniekcji do jąder głębokich mózdzku wektora AAVrh10 kodującego eGFP. Zielony sygnał eGFP+ obserwowano w DCN (A, B) i w istocie białej (A-D), w neuronach DCN (B), komórkach Purkiniego oraz komórkach warstwy molekularnej i granularnej (D).

Niewypełnione grotty strzałek: Ciała komórek Purkiniego. Strzałki: ekspresja eGFP w aksonach komórek Purkiniego. DCN – jądra głębokie mózdzku, GCL – warstwa komórek granularnych; ML – warstwa molekularna; PCL – warstwa komórek Purkiniego; WM – istota biała. Przekroje sagittalne. Skala: 100 μ m w prawym dolnym rogu obrazów. Efektywność transdukcji komórek Purkiniego po iniekcjach do DCN z zastosowaniem AAVrh10: $13\% \pm 5\%$ (\pm SEM; N=3 zwierzęta).

6.3. Transdukcja komórek mózdzku po iniekcjach wektorem AAV-PHP.eB

6.3.1. Iniekcje retro-orbitalne

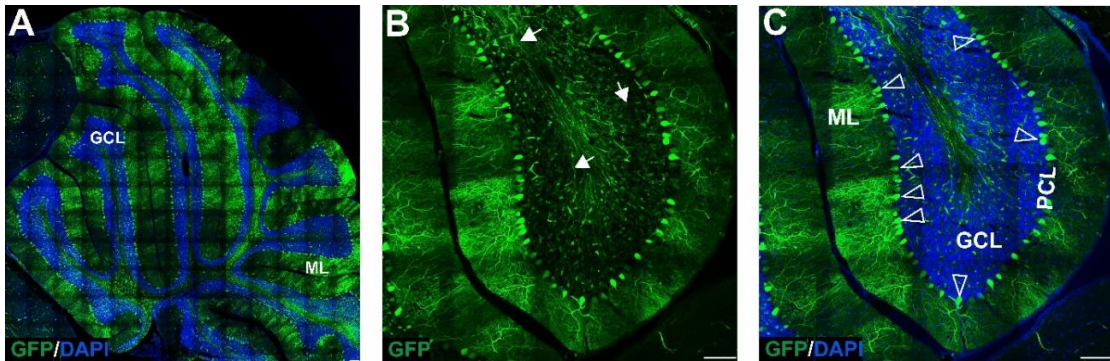
Ze względu na systemowe dostarczanie wektora AAV-PHP.eB drogą retro-orbitalną, oceny dystrybucji sygnału eGFP dokonano w obrębie całego mózgu. Jak pokazano na przekroju sagitalnym transdukcji uległo wiele struktur mózgowych (Rys. 9). Szczególnie silny sygnał eGFP (Rys. 9) obserwowany był w opuszcze węchowej (1), wzgórzu (2), mózdzku (3) i pniu mózgu (4). Ponadto ubogo stransdukowana została kora mózgowa, prążkowie, hipokamp czy podwzgórze.



Rysunek 9. Wzór transdukcji 2 tygodnie po wstrzyknięciu retro-orbitalnym AAV-PHP.eB_eGFP (A-C). Sygnał eGFP obserwowano w strukturze (1) opuszki węchowej, (2) wzgórzu, (3) mózdzku, szczególnie w PC, i (4) pniu mózgu. Transdukcja eGFP została przedstawiona do oceny biodystrybucji. Przekroje sagitalne. Skala: 100µm w prawym dolnym obrazów. Obrazy uzyskane od N=3 zwierząt.

Wektor wirusowy AAV-PHP.eB jest zdolny do przekraczania bariery krew mózg, skutkując efektywną transdukcją komórek Purkiniego w mózdzku, po systemicznych retro-orbitalnych iniekcjach (Hordeaux et al., 2019). Co więcej, efekt silnej transdukcji, bardzo intensywny sygnał eGFP w komórkach Purkiniego mózdzku, zauważono już w punkcie czasowym 2 tygodnie po iniekcji. Ekspresjonowany eGFP znajdował się we wszystkich częściach komórek Purkiniego (Rys. 10A-C), w tym w ciałach, drzewach dendrytycznych PC (Rys. 10C; niewypełnione groty strzałek) i aksonach przebiegających przez istotę białą oraz warstwę granularną. Transdukcja za pomocą AAV-PHP.eB_eGFP była relatywnie selektywna w stosunku do PC, co wskazuje na wysoki tropizm serotypu

do tej populacji komórek. Co ciekawe, komórki granularne oraz ich aksony w większości nie wykazywały sygnału eGFP po podaniu retro-orbitalnym.



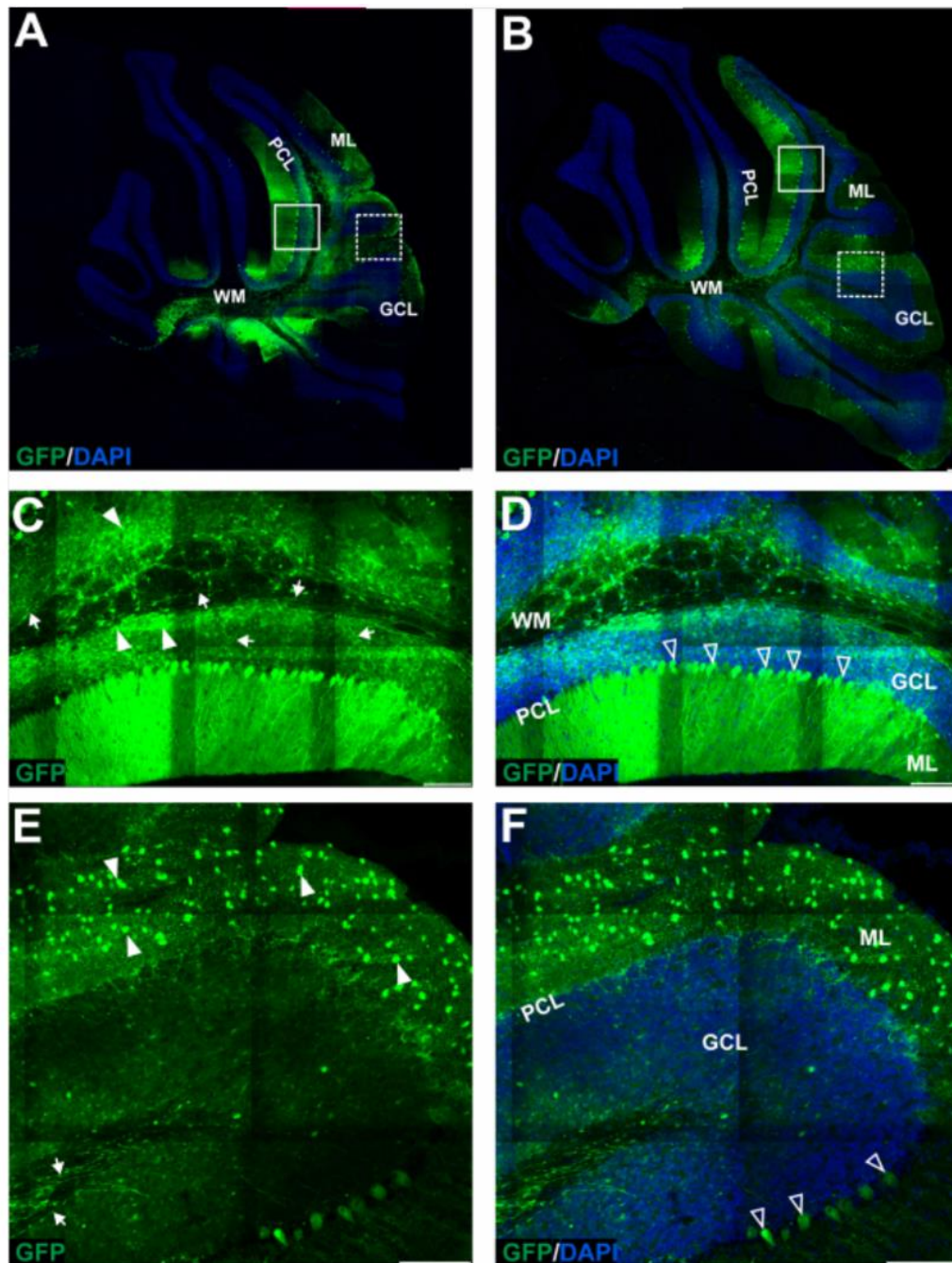
Rysunek 10. Wzór transdukcji 2 tygodnie po wstrzyknięciu retro-orbitalnym AAV-PHP.eB_eGFP (A-C). Sygnał eGFP obserwowano w aksonach PC w istocie białej (B), ciałach PC i ich drzewach dendrytycznych (C). Sygnał eGFP bardzo słaby w GCL.

Niewypełnione groty strzałek: komórki Purkiniego; niewypełnione strzałki: aksony PC. DCN - jądra głębokie mózdzku, GCL - warstwa komórek granularnych; ML - warstwa molekularna; PCL - warstwa komórek Purkiniego; WM - istota biała. Transdukcja eGFP została przedstawiona do oceny biodystrybucji. Przekroje sagitalne. Skala: 100µm w prawym dolnym rogu obrazów. Obrazy uzyskane od N=3 zwierząt.

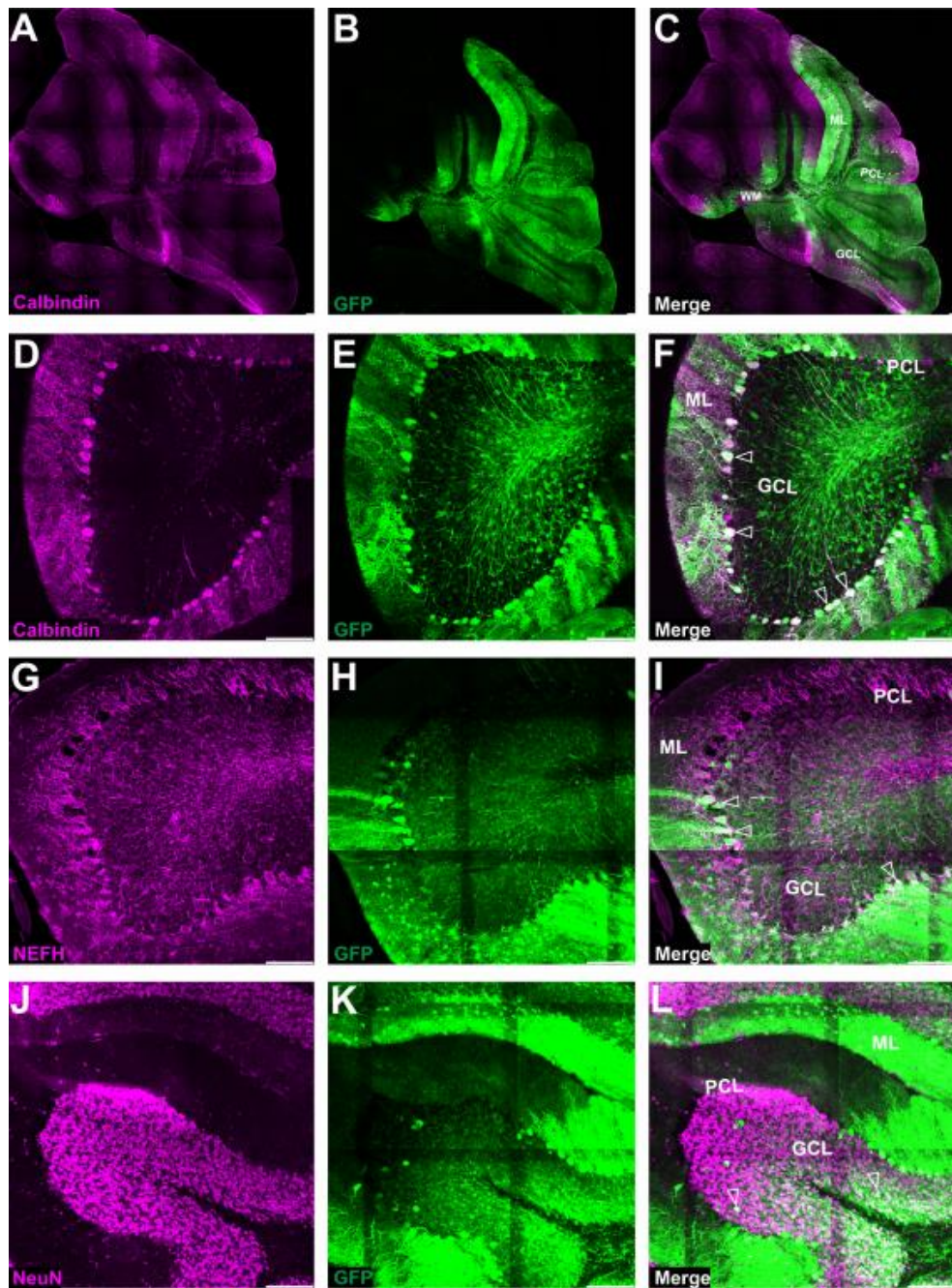
6.3.2. Iniekcje lobularne

Odkąd dowiedliśmy, że ogólnoustrojowe podanie AAV-PHP.eB wykazało jednorodną transdukcję komórek PC z silnym sygnałem eGFP, zbadaliśmy możliwość lokalnego podania serotypu w celu zawężenia transdukcji jedynie do PC. W związku z tym wykonaliśmy podwójne iniekcje AAV-PHP.eB do lobul mózdzku, by następnie pobrać struktury mózgu po 4 (Rys. 11A) i 7 (Rys. 11B) tygodniach. Zaobserwowano 2 różne wzory transdukcji płatów mózdzku. Pierwszy wzorzec w lobulach cechował się wysoką ekspresją eGFP w komórkach Purkiniego (ciała komórek, dendryty i aksony) oraz komórkach granularnych (Rys. 11A, B). Drugi wzór transdukcji zaprezentowany w kilku lobulach charakteryzował się silnym sygnałem eGFP w komórkach ML z jednoczesnym bardzo słabym sygnałem pochodzącym z niewielu komórek PC (Rys. 11A, B). Wykonaliśmy barwienia immunohistochemiczne z kolokalizacją sygnału immunofluorescencyjnego, w którym żółty sygnał to połączenie eGFP oraz sygnału pochodzącego z PC (Kalbindyna), neurofilamentu (NEFH), i komórek granularnych (NeuN) po iniekcjach lobularnych mózdzku (Rys. 12). Barwienie immunohistochemiczne z przeciwciałem anti-NEFH (Rys. 12G) wykazało liczne projekcje neuronalne zlokalizowane w GL i ML, oraz w pobliżu warstwy PC wykazując

pewną kolokalizację z eGFP (Rys. 12I). Podsumowując, lokalne iniekcje do lobul mózdkowych zademonstrowały nieregularny wzór transdukcji, w którym transdukcji uległo wiele populacji komórek w ROI, ze zmiennym składem transdukowanych komórek. Taki wzór transdukcji dowodzi, że promotor CMV użyty do ekspresji eGFP w konstrukcie AAV-PHP.eB cechuje się bardzo wysoką skutecznością w transdukowaniu różnych populacji komórek mózdku.



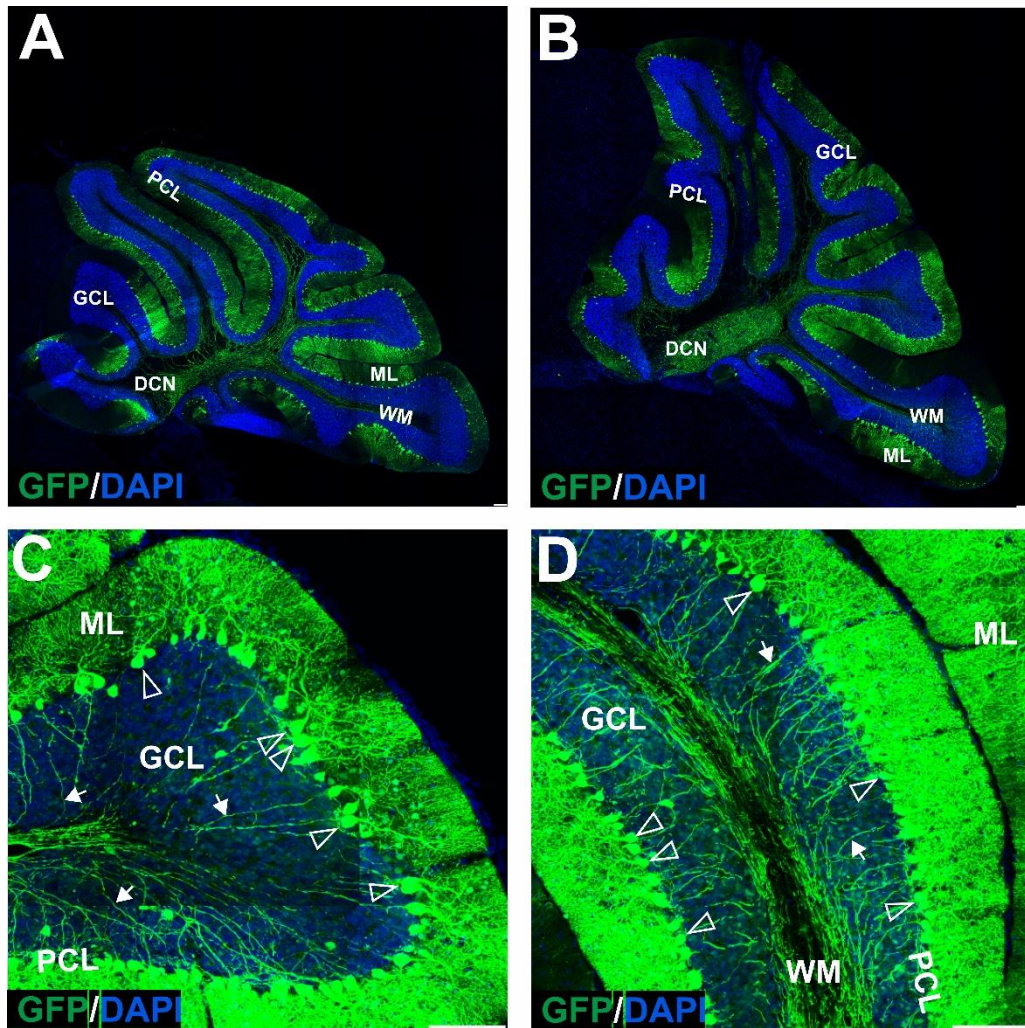
Rysunek 11. Transdukcja mózdzku myszy po wstrzyknięciu wektora wirusowego AAV-PHP.eB kodującego eGFP w lobule mózdzku. Zielony sygnał w komórkach eGFP+ na sekcjach sagitalnych był widoczny 4 (A, C-F) i 7 (B) tygodni po iniekcji. Obserwowano dwa wzorce transdukcji: wzorec 1 oznaczony kwadratem o linii ciągłej (A, B), a wzorec 2 oznaczony kwadratem o linii przerywanej (A, B) i przedstawiony odpowiednio w C-D i E-F (4 tygodnie). Oba wzorce wykazały różne typy i liczbę transdukowanych komórek w ML, PCL i GCL. Niewypełnione grotty strzałek: pozytywnie transdukowane przez eGFP komórki Purkinjego. Grotty strzałek: komórki eGFP pozytywne; Strzałki: aksony PC z sygnałem z eGFP. GCL - warstwa komórek granularnych; ML - warstwa molekularna; PCL - warstwa komórek Purkinjego; WM - istota biała. Przekroje sagitalne. Skala: 100 μ m w prawym dolnym rogu obrazów. Obrazy uzyskane od N=3 zwierząt.



Rysunek 12. Barwienie koimmunofluorescencyjne skrawków mózdzku myszy po lobularnych iniekcjach z zastosowaniem wektora AAV-PHP.eB kodującego eGFP. Zielony sygnał eGFP przedstawiono razem z kalbindyną 1 (fioletowy) lub NEFH (fioletowy), lub NeuN (fioletowy). Sygnał kolokalizacji (biały) jest obecny dla wszystkich populacji komórek w mózdzku, wskazując na transdukcję komórek Purkiniego (kalbindyna 1; A, D), komórek koszykowych (NEFH widoczny w koszykach wokoło komórek Purkiniego; G) i komórek granularnych (NeuN w GCL; J). Niewypełnione grotty strzałek: Ciała komórek Purkiniego (C) lub koszyczki okołokomórkowe (F) lub komórki granularne (I). GCL - warstwa komórek granularnych; ML - warstwa molekularna; PCL - warstwa komórek Purkiniego. Mikroobrazy zawierające jedynie kanał eGFP były demonstrowane osobno dla oceny biodystrybucji. Przekrój sagitalny. Skala: 100 μ m w prawym dolnym rogu obrazów. Obrazy uzyskane od N=3 zwierząt.

6.3.3. Iniekcje do jąder głębokich mózdzku

Poprzednie eksperymenty z zastosowaniem iniekcji AAVrh10 w region DCN wskazały na zdolność transportowania sygnału eGFP za pośrednictwem aksonów PC. Zatem w celu reprodukcji schematu transdukcji wykorzystano region DCN do iniekcji za pomocą nośnika AAV-PHP.eB_eGFP. Wykonano bezpośrednie iniekcje do lewego i prawego DCN. Tak jak w przypadku serotypu AAVrh10, AAV-PHP.eB dostarczony do zakończeń nerwowych PC, spowodował bardzo efektywną transdukcję w punktach czasowych 4 i 7 tygodni po wykonanych iniekcjach (Rys. 13A, B). W lobulach mózdzku obserwowano bardzo intensywny sygnał pochodzący praktycznie wyłącznie z ciał PC i ich drzew dendrytycznych oraz projekcji aksonalnych biegnących przez GL i istotę białą. Wzór transdukcji PC uzyskany po iniekcjach w DCN nie różnił się w intensywności i efektywności transdukcji pomiędzy punktem czasowym 4 oraz 7 tygodni po iniekcjach ($93\% \pm 2\%$ (\pm SEM; N=3 zwierzęta)) (Rys. 13A, B). W związku z tym pominięto iniekcje kolejnych grup zwierząt w późniejszych punktach czasowych zgodnie z zaleceniami zasady 3R. Doszliśmy do wniosku, że wektor wirusowy AAV-PHP.eB_eGFP dostarczany do DCN mózdzku zapewnia skuteczną transdukcję PC i może służyć jako skuteczny model dostarczania bezpośredniej terapii genowej do tych komórek. AAV-PHP.eB wstrzyknięty do DCN, w okolicy zakończeń aksonalnych komórek Purkinjego powoduje ich selektywną transdukcję.

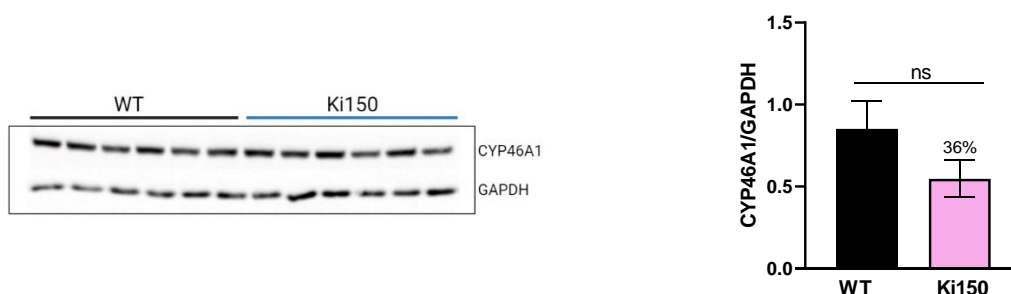


Rysunek 13. Transdukcja mózdzku myszy po wstrzyknięciu wektora wirusowego AAV-PHP.eB kodującego eGFP do jąder głębokich mózdzku. Silny zielony sygnał był obserwowany w całym ML mózdzku i był zlokalizowany prawie wyłącznie w komórkach Purkiniego na sekcjach sagitalnych 4 (A, C-D) i 7 (B) tygodni po iniekcji. Wzór transdukcji pod większym powiększeniem pokazano w C-D, 4 tygodnie po iniekcji. Sygnał eGFP obserwowano we wszystkich subkomórkowych strukturach PC, w tym ciałach, drzewach dendrytycznych (niewypełnione grotty strzałek) oraz aksonach (strzałki).
 DCN - deep cerebellar nuclei, GCL - granule cell layer; ML - molecular layer; PCL - Purkinje cell layer; WM - white matter Przekrój sagitalny. Skala: 100µm w prawym dolnym rogu obrazów. Wydajność transdukcji komórek Purkiniego przy iniekcji do DCN: 93% ± 5% (±SEM; N=3 zwierzęta).

6.4. Ocena poziomu białka CYP46A1 w nietraktowanym mysim modelu SCA3

Metoda Western blot

Zanim wykonano badania zmian poziomu białka CYP46A1 w mysim modelu choroby SCA3 po zastosowaniu terapii genowej, postanowiono zweryfikować, czy tak jak u pacjentów z chorobą SCA3, w transgenicznym modelu SCA3 obserwuje się znamienne spadki poziomu CYP46A1 w tkance mózgu. Okazuje się, że w izolatach mózdzku myszy transgenicznych SCA3 Ki150 poziom białka CYP46A1 jest obniżony. Tendencja spadkowa pomiędzy poziomem białka CYP46A1 w izolatach pochodzących od myszy SCA3, w stosunku do myszy kontrolnych WT w tym samym wieku sięga 36% (Rys. 14). Poziom białka oceniono metodą Western blot, obliczenia statystyczne przeprowadzono z zastosowaniem testu Mann-Whitneya, w tkankach myszy stanowiących grupy nietraktowane dwóch modeli, odpowiednio myszy kontrolnych WT oraz myszy Ki150 w wieku 7 miesięcy. W modelu Ki150 w wieku 7 miesięcy występują już objawy fenotypowe związane ze SCA3 (Wiatr i in. 2019).

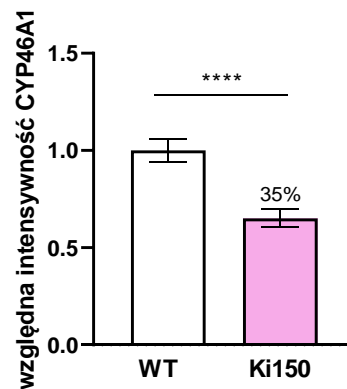
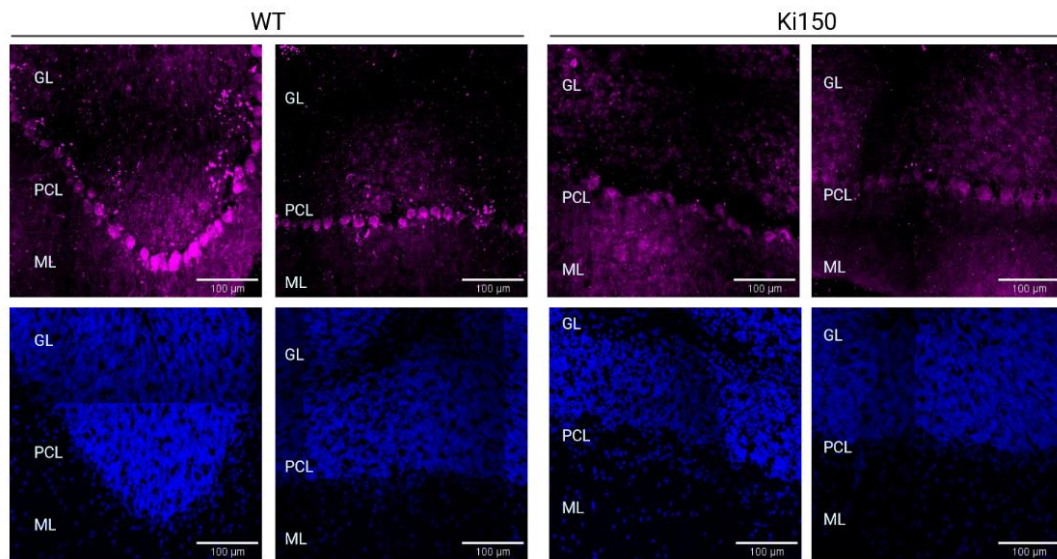


Rysunek. 14. Reprezentatywny Western blot enzymu 24-hydroksylazy cholesterolu półkul mózdzku myszy nietraktowanych modelu WT oraz Ki150. Analiza ilościowa białka CYP46A1 metodą Western blot mózdzku obu modeli wskazuje na delikatny spadek jego poziomu w mysim modelu transgenicznym Ki150, (n=3 dla WT, n=3 dla Ki150). Test Mann-Whitneya, $p=0,5333$. Białko CYP46A1 znormalizowano o białko referencyjne GAPDH.

Barwienia immunofluorescencyjne

Wykonano analizę immunofluorescencyjną skrawków mózgu myszy transgenicznych modelu Ki150 i odpowiadającym im wiekowo kontrolnym myszom WT jednej płci (7-miesięczne myszy). Poziom białka CYP46A1 analizowano szczególnie w ciałach komórek Purkinjego. Wyniki wykazały ~ 35% redukcję poziomu białka

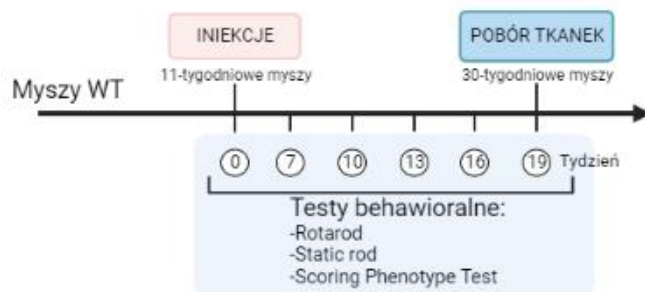
CYP46A1 w ciałach PC myszy SCA3 (test Mann-Whitneya, $p < 0,0001$) ($n=3$ dla WT; $n=3$ dla Ki150) (Rys. 15).



Rysunek 15. Reprezentatywne obrazy barwienia immunofluorescencyjnego enzymu 24-hydroksylazy cholesterolu skrawków mózdzków 30-tygodniowych myszy nietraktowanych modelu dzikiego WT oraz SCA3 Ki150. Wielopłaszczyznowe obrazowanie fluorescencyjne mikroskopu konfokalnego Opera Phenix skrawków sagitalnych mózdzków ujawniło różnice w intensywności sygnału pochodzącego z barwienia immunofluorescencyjnego z zastosowaniem przeciwciała anti-CYP46A1 pomiędzy dwoma modelami zwierząt. Analiza wykazała obniżenie poziomu białka CYP46A1 u myszy Ki150 o ok. 35%, ($n=3$ dla WT; $n=3$ dla Ki150). (Test Mann-Whitneya, $p < 0,0001$. Jądra były barwione za pomocą 4',6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI). Skala: 100 μm . GL-warstwa granularna, PCL-warstwa komórek Purkinjego, ML-warstwa molekularna.

6.5. Wpływ iniekcji lobularnych wektorem AAVrh10 na zmiany behawioralne i parametry molekularne

6.5.1. Ocena zmian behawioralnych w mysim modelu typu dzikiego WT



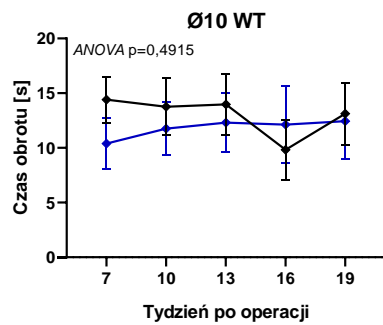
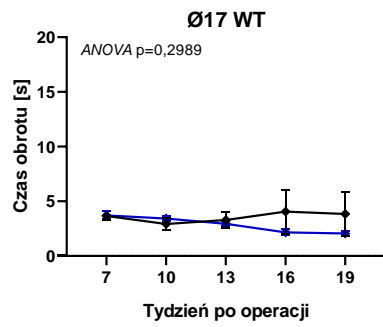
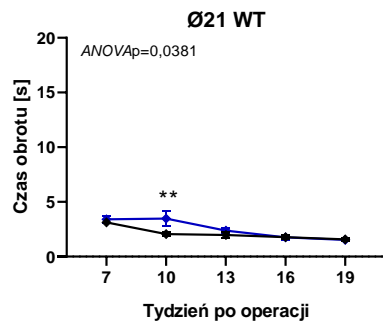
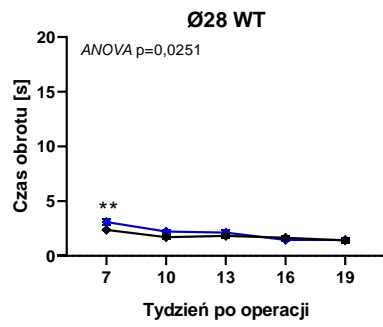
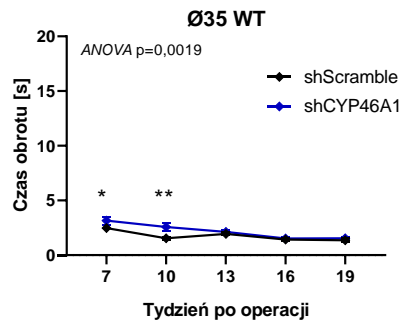
Rysunek 16. Schemat osi czasu dla myszy typu dzikiego WT, poddanych procedurze iniekcji stereotaktycznych do lobul mózdzku z użyciem wektorów wirusowych AAVrh10 w wieku 11 tygodni. Myszy przez 19 tygodni uczestniczyły w testach behawioralnych, w tym, teście rotarod, teście prętów statycznych oraz testach punktacji fenotypu, po czym poświęcano je w 30 tygodniu życia i pobrano tkanki.

Zbadaliśmy neurotoksyczną rolę zaburzenia poziomu CYP46A1 *in vivo*. W tym celu przeprowadziliśmy kilka testów behawioralnych mierzących sprawność ruchową zwierząt. Zastosowaliśmy sekwencję shRNA, która, jak wykazano, hamuje ekspresję CYP46A1 *in vitro* i *in vivo* (Djelti et al., 2015). Użyliśmy wektor wirusowy AAVrh10 do dostarczenia konstruktów shRNA oraz konstruktów shScramble (sekwencja kontrolna, która nie jest skierowana na sekwencję mRNA CYP46A1), za pośrednictwem iniekcji do lobul mózdzku myszy w wieku 11 tygodni (Rys. 16). Zanim wykonano iniekcje na mysim modelu transgenicznym odzwierciedlającym fenotyp chorobowy SCA3 Ki150/150, badania przeprowadzono na grupie myszy kontrolnych modelu C57BL (WT) ograniczając cierpienie grupy myszy fenotypowych (z jednostką chorobową).

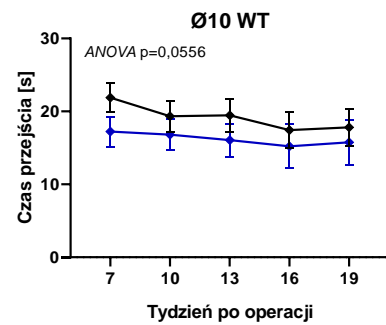
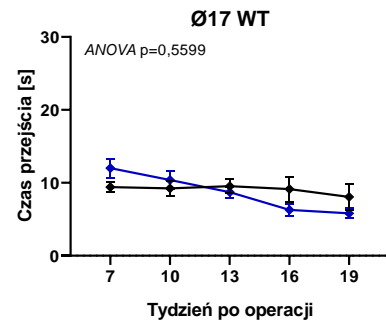
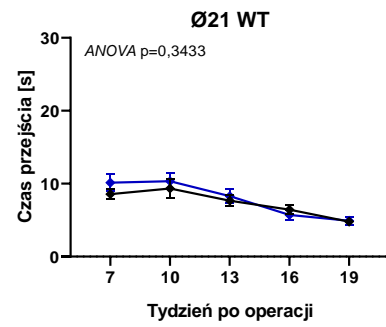
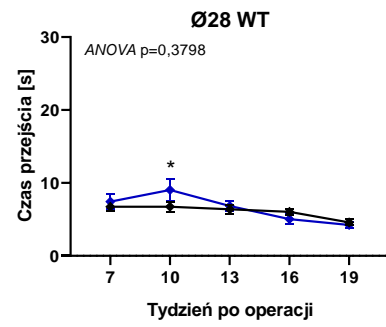
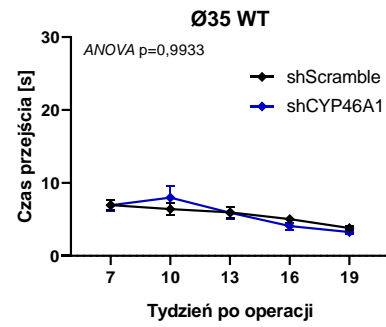
Konsekwencje obniżenia poziomu CYP46A1 związane z nagromadzeniem się cholesterolu oceniono w 5 punktach czasowych testu prętów statycznych. Test prętów statycznych jest jednym z najefektywniejszych testów behawioralnych do mierzenia postępów zmian fenotypowych w mysich modelach chorób neurodegeneracyjnych. Zwierzęta modelu WT grupy shCYP46A1 i shScramble, w 5 punktach czasowych otrzymywały podobne wyniki czasu obrotu oraz czasu przejścia na każdym pręcie. Przez okres 19 tygodni obserwacji dwóch grup myszy parametry mierzone w teście prętów statycznych, różniły się nieznacznie. Znaczące statystycznie wartości w czasie obrotu (Rys. 17A) w grupie myszy nastrzykniętych shCYP46A1 otrzymano na prętach o

średnicy 35, 28 oraz 21 mm (odpowiednio dwuczynnikowa ANOVA, $p=0,0019$; $p=0,0251$; $p=0,0381$). Post-hoc test LSD Fishera wykazał, że różnice były obserwowane w tygodniu 7 na pręcie 35 i 28 mm oraz w 10 tygodniu od iniekcji na pręcie 35 i 21 mm. Przejście po pręcie stanowi dla myszy o wiele cięższe zadanie niż obrócenie się na skraju prętów różnej średnicy. Dlatego też istotne statystycznie różnice (Rys. 17B) wychwycone jedynie w czasie przejścia po pręcie o średnicy 28 mm (dwuczynnikowa ANOVA $p=0,3433$; test LSD Fishera w 10 tygodniu od iniekcji $p<0,05$) co sugeruje bardzo znikomy wpływ cząsteczki shRNA wyciszającej gen CYP46A1 na zmiany sprawności motorycznej zwierząt.

A

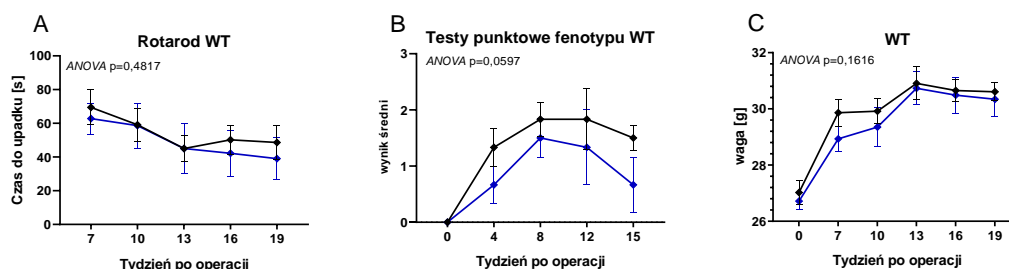


B



Rysunek 17. Testy prętów statycznych myszy WT wykonane w przedziale czasowym 7 – 19 tygodni po wstrzyknięciach lobularnych wektorów AAVrh10_shCYP46A1_eGFP oraz AAVrh10_shScramble_eGFP. 11-tygodniowe myszy modelu WT poddano iniekcjom lokalnym do lobul mózdzku za pomocą AAVrh10_shCYP46A1 lub AAVrh10_shScramble. Ocena zmian behawioralnych na podstawie czasu obrotu (A), oraz czasu przejścia (B) po przecie o średnicy 35, 28, 21, 17, 10 mm, zwierząt jednej płci (n=14 dla shScramble, n=12 dla shCYP46A1) Myszy poświęcono w 30 tygodniu życia. Testy behawioralne do oceny równowagi i koordynacji myszy ujawniły brak zmian motorycznych w grupie myszy traktowanych mRNA shCYP46A1 w porównaniu z myszami kontrolnymi z cząsteczką shScramble. Dwuczynnikowa ANOVA, $p < 0,05$; post-hoc test LSD Fishera, $p < 0,05$.

Nie zaobserwowaliśmy żadnych deficytów motorycznych u myszy WT w teście rotarod, myszy WT po operacjach stereotaktycznych miały zbliżone wyniki do tych sprzed operacji. W żadnym z badanych punktów czasowych nie obserwowano statystycznie istotnych różnic w czasie do upadku myszy z grupy shCYP46A1 w porównaniu do myszy, którym podano cząsteczkę kontrolną (Rys. 18A) (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,4817$; test LSD Fishera, $p > 0,05$). Podobnie do testu rotarod, wyniki w testach punktacji fenotypu myszy z shCYP46A1 również nie odbiegały od tych uzyskanych przez myszy nastrzyknięte cząsteczką kontrolną shScramble we wszystkich analizowanych punktach czasowych eksperymentu (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,0597$; test LSD Fishera, $p > 0,05$) (Rys. 18B). Masa ciała w obu grupach miała tendencję wzrostową, bez znaczących różnic spowodowanych terapeutykami (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,1616$; test LSD Fishera, $p > 0,05$) (Rys. 18C). Do analiz statystycznych testów rotarod, testu prętów statycznych, testów punktacji fenotypu i pomiaru wagi użyto zwierzęta płci męskiej.



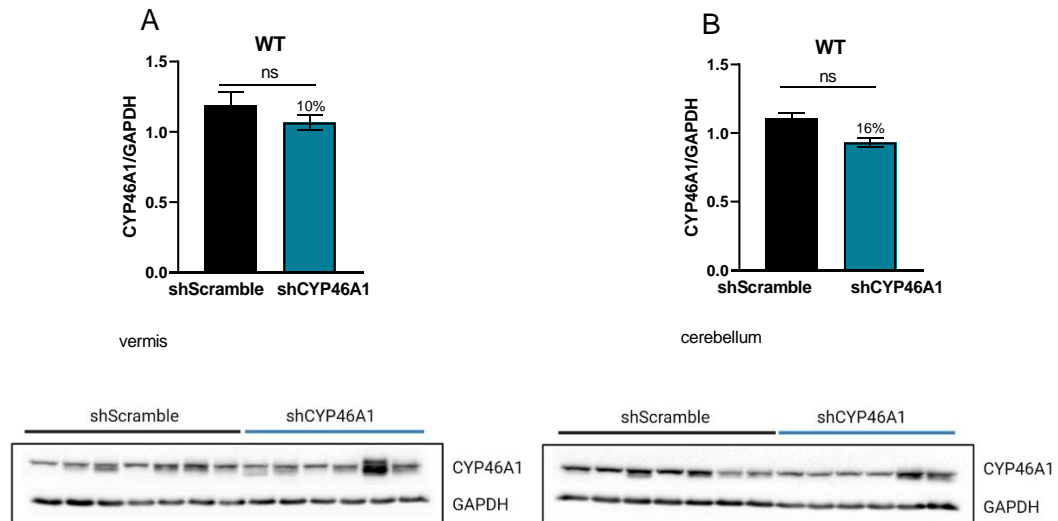
Rysunek 18. (A) Test rotarod, (B) test punktacji fenotypu, oraz (C) waga myszy WT wykonane w przedziale czasowym 0 – 19 tygodni po wstrzyknięciach lobulowych wektorów AAVrh10_shCYP46A1_eGFP oraz AAVrh10_shScramble_eGFP. Ocena zmian behawioralnych na podstawie: oznaczenia parametru czasu do upadku myszy w teście rotarod, sumarycznego wyniku otrzymanego z oceny punktowej 4 podrzędnych parametrów fenotypowych w teście punktacji fenotypu, oraz oceny wagi zwierząt. Zwierzęta jednej płci (n=14 dla shScramble, n=12 dla shCYP46A1). Brak różnic w zachowaniu zwierząt z shCYP46A1 w teście równowagi i sprawności fizycznej rotarod oraz testach punktacji fenotypu. Waga zwierząt z shCYP46A1 nie ulegała zmianie w porównaniu do myszy z cząsteczką shScramble we wszystkich 6 punktach czasowych. (dwuczynnikowa ANOVA, $p > 0,05$; post-hoc test LSD Fishera $p > 0,05$).

W wyniku wstrzyknięć AAVrh10 do lobul mózdzku myszy WT nie obserwowano założonych, ewidentnych zmian fenotypowych, analizowanych w testach behawioralnych. Delikatne odchylenia grupy z shCYP46A1 od wyników grupy kontrolnej prawdopodobnie nie mają dużego znaczenia biologicznego.

6.5.2. Ocena zmian poziomu białka CYP46A1 metodą Western blot w mysim modelu typu dzikiego WT

Białko CYP46A1, kodowane przez gen *CYP46A1* jest wysoce konserwatywnym enzymem z rodziny cytochromu P450. Jego funkcją jest konwertowanie cholesterolu powstałego *in situ* w mózgu do postaci 24S-hydroksycholesterolu w celu utrzymania równowagi syntezy i wydalania cholesterolu przez barierę krew-mózg (Bjorkhem et al., 1998; Russell et al., 2009). Analiza poziomu tego białka w strukturze dwóch półkul mózdzku, oraz robaku u myszy modelu WT traktowanych wektorami AAVrh10 transportującymi cząsteczkę kontrolną lub wyciszającą ekspresję genu *CYP46A1*,

wykazała brak obniżenia poziomu tego białka w strukturze robaka mózdzku (10%, Rys. 19A), który jednocześnie był bezpośrednim regionem iniekcji (test Mann-Whitneya, $p > 0,05$). Wynik eksperymentu nie uzyskał wartości statystycznie istotnych, natomiast zaobserwowano trend spadkowy (16%) poziomu białka CYP46A1 w obu półkulach nastrzykniętych cząsteczką shCYP46A1 (test Mann-Whitneya, $p > 0,05$) (Rys. 19B).



Rysunek. 19. Reprezentatywny Western blot enzymu 24-hydroksylazy cholesterolu półkul mózdzku 20 tygodni po wstrzyknięciu wektorów AAVrh10_shScramble_eGFP oraz AAV- rh10_shCYP46A1_eGFP myszy WT. Analiza ilościowa białka CYP46A1 metodą Western blot w robaku (A) oraz półkulach mózdzku (B) 20 tygodni po wstrzyknięciu wektora AAVrh10_shScramble_eGFP oraz AAVrh10_shCYP46A1_eGFP (n=7 dla shScramble, n=6 dla shCYP46A1). Test Mann-Whitneya $p > 0,05$. CYP46A1 znormalizowano o białko referencyjne GAPDH.

Na podstawie wyników analiz grupy myszy WT, poddanych obustronnym iniekcjom wektorów wirusowych AAVrh10_shCYP46A1 i AAVrh10_shScramble, zdecydowano o wyeliminowaniu tego serotypu wektora wirusowego z dalszych eksperymentów. Decyzję podjęto w oparciu o obserwowaną ubogą transdukcję w komórkach PC. Tropizm wektora wirusowego, pomimo użycia dwóch regionów iniekcji tkanki neurologicznej (lobule lub DCN mózdzku), nie spełniał wymogów transdukcji komórek Purkiniego. Komórki Purkiniego są kluczowym typem komórek neuronalnych, które odpowiadają za syntezę enzymu CYP46A1. Poprzez optymalizację koordynat dla iniekcji domózgowych wektorów wirusowych AAVrh10 uzyskano różne wzory silnej transdukcji komórek mózgu, które były powtarzalne. Wektor nie był jednak

ukierunkowany na komórki Purkiniego. Z tego względu u myszy traktowanych cząsteczką shRNA wyciszającą gen *CYP46A1* efekt uzyskanego wyciszenia nie był zadowalający i obserwowano jedynie subtelne zmiany fenotypowe w testach behawioralnych. Ponadto analiza Western blot struktury, która uległa bezpośredniej iniekcji, wykazała tendencję spadkową, jednak nie osiągając istotnego obniżenia poziomu białka *CYP46A1*. Zaniechano dalszych eksperymentów bazujących na wektorze wirusowym AAVrh10.

6.6. Wpływ iniekcji lokalnych wektorem AAV-PHP.eB na zmiany behawioralne i parametry molekularne

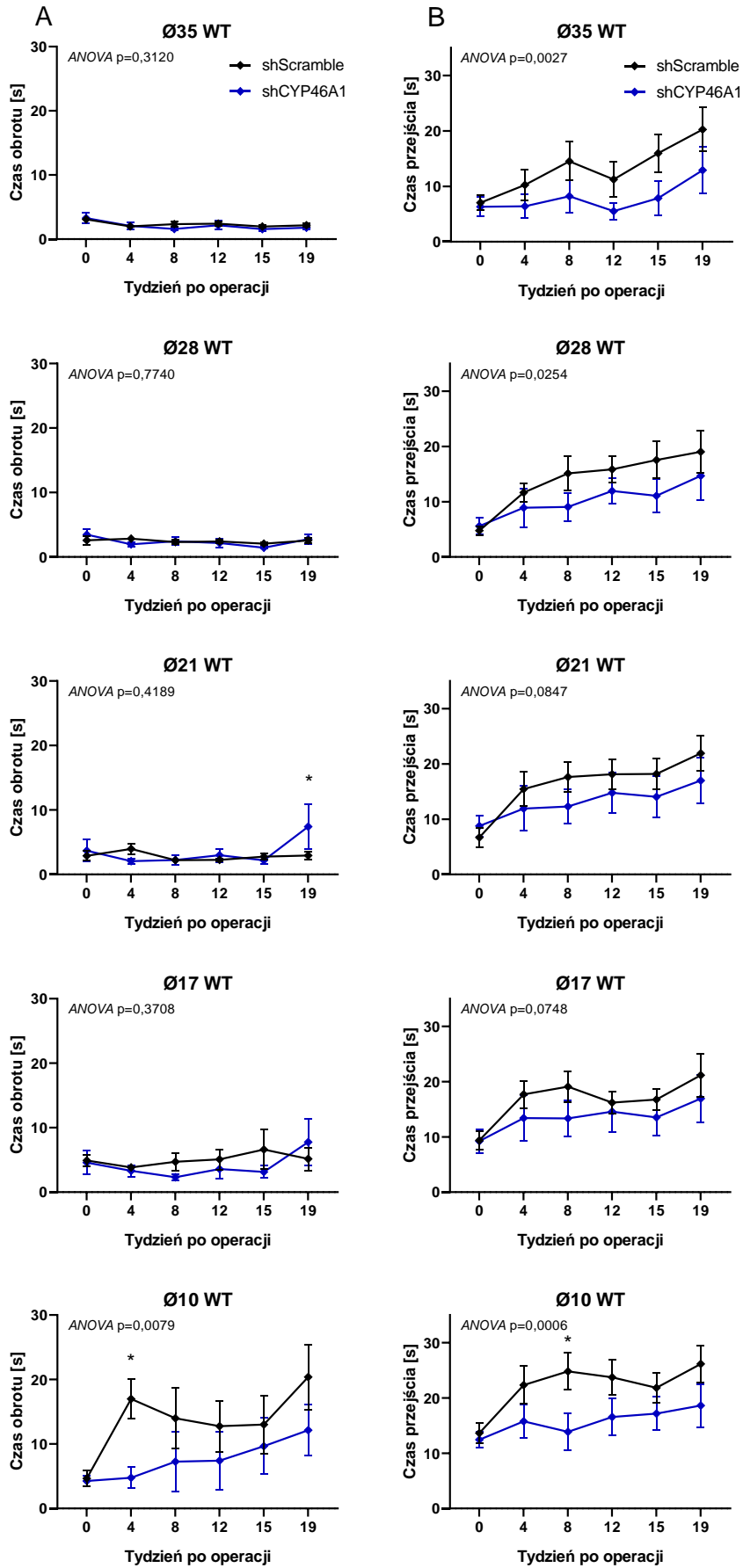
6.6.1. Ocena zmian behawioralnych po iniekcjach do DCN wektorem AAV-PHP.eB

Do bezpośrednich iniekcji mysich modeli wybrano wektor wirusowy AAV o serotypie PHP.eB. Zoptymalizowano region bezpośrednich iniekcji oraz opracowano metodę selektywnej i wydajnej transdukcji komórek mózgu z zastosowaniem wektora wirusowego AAV-PHP.eB (Rys. 4). Dawka reagentów terapii genowej dobierana była na podstawie danych literaturowych, po których następowały krótkie eksperymenty pilotażowe na małych grupach myszy. Wytypowana literaturowo dawka 4×10^{10} vg/mysz powodowała niepożądane efekty uboczne. W pojedynczych przypadkach zastosowana dawka okazała się letalna dla zwierząt. Testy behawioralne grup myszy musiały zostać przerwane, a zwierzęta poświęcono w punkcie czasowym 2 tygodnie po operacjach stereotaktycznych. Zdecydowano o 10- i 20-krotnym obniżeniu dawki AAV, odpowiednio 4×10^9 vg oraz 2×10^9 vg/mysz. Potwierdzono brak obecności efektów ubocznych łącznie ze sprawdzeniem efektywności transdukcji komórek Purkiniego. Do głównego eksperymentu wytypowano najniższą badaną dawkę konstruktów w formie AAV-PHP.eB.

6.6.2. Mysi model typu dzikiego WT

Do testów behawioralnych wybrano zwierzęta modelu WT, jednej płci w wieku 9 tygodni życia, traktowanych cząsteczką wyciszającą AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP oraz cząsteczką kontrolną AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP (n=5 dla shScramble, n=5 dla shCYP46A1). Test prętów statycznych, któremu poddano myszy, jest szczególnie dobrym testem do oceny zmian behawioralnych i motorycznych w chorobach neurodegeneracyjnych. Zwierzęta modelu WT w punkcie czasowym 0 tygodni (przed

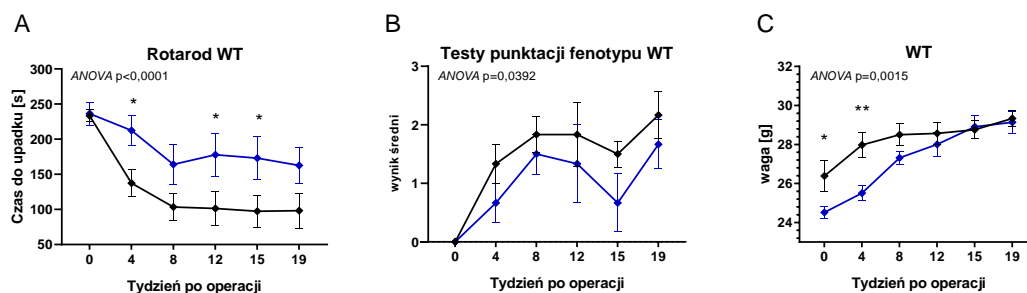
operacją) osiągały krótki czas w teście prętów statycznych (czas obrotu i czas przejścia po prętach), sugeruje to łatwość wykonywania zadanych czynności oraz brak objawów fenotypowych u tych myszy. Przez okres 19 tygodni testów czas obrotu na pręcie myszy traktowanych cząsteczką wyciszającą nie różnił się od tego uzyskanego przez myszy z cząsteczką kontrolną i utrzymywał się w podobnym zakresie wartości w każdej grupie i we wszystkich badanych punktach czasowych (Rys. 20A). Różnice w parametrze czasu obrotu w grupie traktowanej cząsteczką wyciszającą gen *CYP46A1* w stosunku do grupy myszy kontrolnych, ujawniły się jedynie na prętach o średnicy 21 i 10 mm, odpowiednio w 19 i 4 tygodniu po operacjach (test lsd Fishera $p < 0,05$). Natomiast parametr czasu przejścia po prętach o zmniejszającej się średnicy (Rys 20B) wskazuje na silną różnicę w grupie myszy z cząsteczką shRNA wyciszającą *CYP46A1* w porównaniu do myszy z cząsteczką kontrolną. Analizując fenotyp behawioralny, szybciej po prętach przechodzą myszy traktowane shCYP46A1. W czasie przejścia po prętach istotność statystyczną uzyskano na prętach o średnicy 35 mm (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,0027$), 28 mm (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,0254$), oraz 10 mm (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,0006$, test LSD Fishera, $p < 0,05$ w 10 tygodniu po operacji).



Rysunek 20. Testy prętów statycznych myszy WT wykonane w przedziale czasowym 0 – 19 tygodni po operacjach wstrzyknięcia wektorów AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP oraz AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP do DCN mózdzku. 9-tygodniowe myszy modelu WT poddano iniekcjom stereotaktycznym. Ocena zmian behawioralnych na podstawie oznaczenia parametru czasu obrotu (A), oraz czasu przejścia po pręcie (B) o średnicy 35, 28, 21, 17, 10 mm. Zwierząt jednej płci (n=5 dla shScramble, n=5 dla shCYP46A1). Myszy poświęcono w 30 tygodniu życia. Zmiany w sprawności ruchowej myszy wskazują na poprawę wyników w grupie traktowanej shCYP46A1 w porównaniu do myszy kontrolnych. Dwuczynnikowa ANOVA, $p < 0,05$; post-hoc test LSD Fishera, $p < 0,05$.

W tych samych punktach czasowych wykonano test rotarod. Analizowano czas utrzymania się zwierząt na obracającym się pręcie przez parametr czasu do upadku. Początkowo myszy obu grup uzyskiwały wysokie wartości czasu do upadku, które malały przy kolejnych dwóch punktach czasowych, po czym utrzymywały się na stałym poziomie do końca obserwacji. Moment pogorszenia następował przez pierwsze 8 tygodni po operacji i związany był z czasem rekonwalescencji zwierząt. Różnice w czasie do upadku myszy WT po iniekcjach cząsteczką shCYP46A1 były istotnie wyższe (dwuczynnikowa ANOVA, $p < 0,0001$; test LSD Fishera, $p < 0,05$ w 4, 12, 16 tygodniu po iniekcji), niż w przypadku iniekcji cząsteczką kontrolną (Rys. 21A). Na testy punktacji fenotypu składają się 4 parametry brane pod uwagę przy ocenie fenotypowej myszy. Im mniejszą sumaryczną wartość zyskuje zwierzę w testach, tym jest bardziej sprawne motorycznie. Wykres testów punktacji fenotypu przedstawia istotne statystycznie różnice w fenotypie grupy myszy traktowanych shCYP46A1 w porównaniu do grupy traktowanej cząsteczką shScramble (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,0392$; test LSD Fishera, $p > 0,05$). Myszy z cząsteczką shRNA wyciszającą CYP46A1 otrzymując mniejszą sumaryczną liczbę punktów w każdym punkcie czasowym, co sugeruje większą sprawność motoryczną w stosunku do myszy grupy kontrolnej (Rys 21B).

Ważenie myszy modelu WT po operacjach stereotaktycznych wskazuje na prawidłowy przyrost masy dwóch grup zwierząt (Rys. 21C). Pomimo, że istotnie wyższe wagi miały myszy traktowane cząsteczką shScramble w punkcie czasowym 0 i 4 tygodnie po operacji (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,0015$; test LSD Fishera $p < 0,05$ w tygodniu 0 i $p < 0,01$ w 4 tygodniu po iniekcji) to w końcowym punkcie czasowym waga obu analizowanych grup myszy wyrównała się.



Rysunek 21. Test rotarod (A), test punktacji fenotypu (B), oraz waga (C), wykonane w przedziale czasowym 0 – 19 tygodni po operacjach wstrzyknięcia wektorów AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP oraz AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP do DCN myszy WT. Ocena zmian behawioralnych na podstawie: oznaczenia parametru czasu do upadku myszy w teście rotarod, sumarycznego wyniku otrzymanego z oceny punktowej 4 podrzędnych parametrów fenotypowych w teście punktacji fenotypu, oraz oceny wagi zwierząt. Zwierzęta jednej płci (n=5 dla shScramble, n=5 dla shCYP46A1). (dwuczynnikowa ANOVA, p<0,05; post-hoc test LSD Fishera, p<0,05).

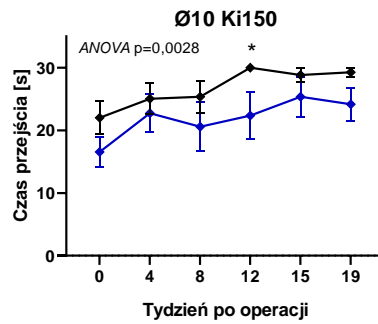
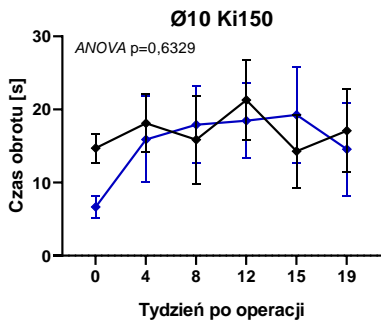
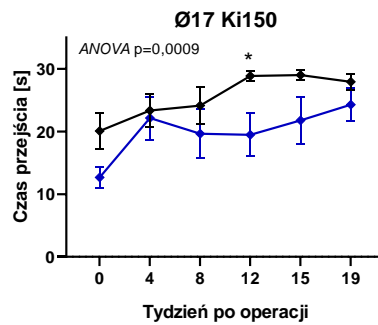
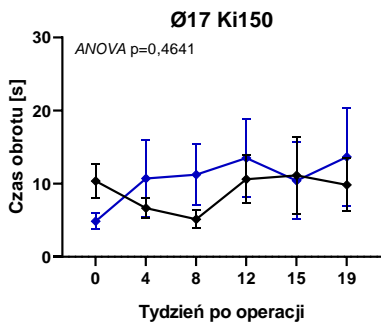
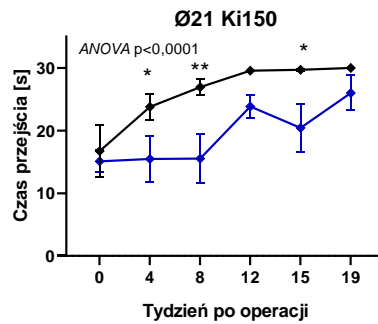
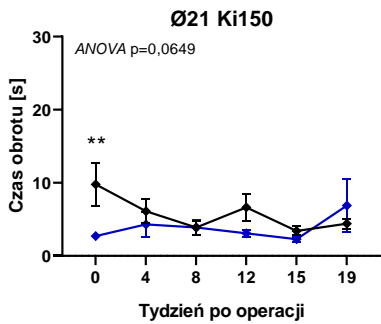
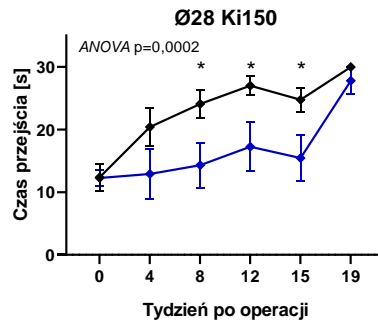
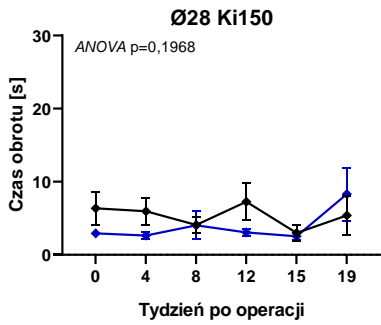
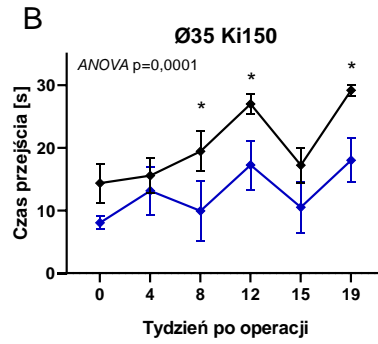
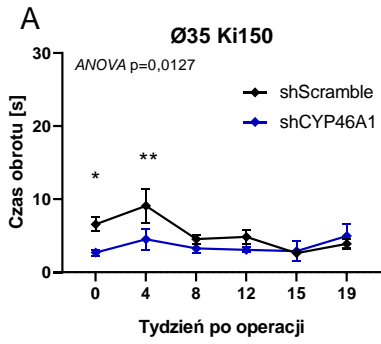
Iniekcje z użyciem AAV-PHP.eB-shCYP46A1_eGFP okazały się mieć korzystny wpływ na motorykę zwierząt w teście prętów statycznych, teście rotarod i testach punktacji fenotypu w porównaniu do grupy myszy kontrolnych. Masa ciała zwierząt z cząsteczką shCYP46A1 pod koniec eksperymentów, w punkcie czasowym 19 tygodni ustanowiła się w przedziale wartości uzyskanych przez myszy kontrolne shScramble.

6.6.3. Mysi model SCA3

Model myszy Ki150 odtwarza wiele cech ludzkiej choroby SCA3, w tym zaburzenia ruchowe pojawiające się u myszy przed ukończeniem 6 miesiąca życia (Wiatr i in. 2019).

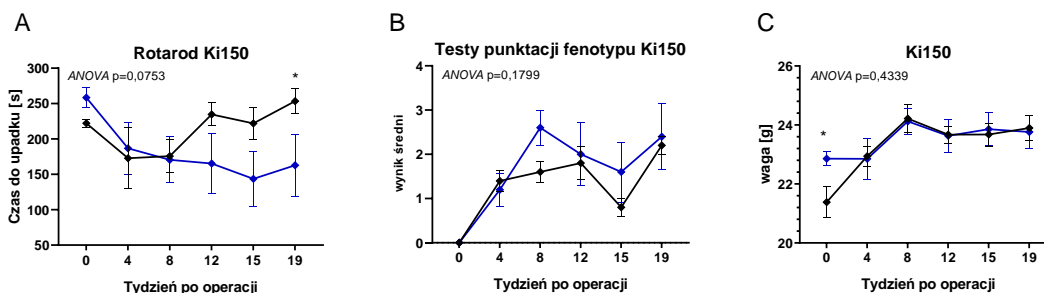
Zwierzęta modelu SCA3 Ki150 otrzymały wektory wirusowe AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP (n=5) oraz AAV-PHP.Eb_shScramble_eGFP (n=5) w postaci obustronnych wstrzyknięć do DCN mózdzku w wieku 9 tygodni. Mysiom zapewniono komfortowe i bezpieczne dla zdrowia warunki rekonwalescencji z opieką pooperacyjną trwającą tydzień. Opieka pooperacyjna polegała na podawaniu środków przeciwzapalnych i gdy było to wymagane, maści antybiotykowej na miejsce zszytej rany. Testy behawioralne rozpoczynały się od punktu 0, tydzień przed wykonaną operacją, w celu scharakteryzowania poziomu koordynacji myszy transgenicznych Ki150

przed przystąpieniem do eksperymentu. W teście prętów statycznych, wartości czasu obrotu na prętach (Rys. 22A) o zmniejszających się średnicach dla myszy traktowanych cząsteczką shCYP46A1, podobnie jak w grupie myszy modelu WT, nie odbiegały od tych reprezentowanych przez grupę myszy kontrolnych. Wyniki istotnie statystyczne czasu obrotu w punktach czasowych 0 i 4 tygodnie pojawiły się między myszami z cząsteczką kontrolną i cząsteczką shCYP46A1 na pręcie o średnicy 35 mm (dwuczynnikowa ANOVA, $p < 0,05$; post-hoc test LSD Fishera, $p < 0,05$ i $p < 0,01$) oraz w punkcie czasowym 0 tygodni na pręcie o średnicy 21 mm (dwuczynnikowa ANOVA, $p > 0,05$; post-hoc test LSD Fishera, $p < 0,01$) wskazujące, że niektóre myszy modelu Ki150 potrzebowały więcej czasu i doświadczenia/treningu przy obrocie na wskazanych prętach. Model Ki150 po analizie czasu przejścia po prętach (Rys. 22B), wskazuje na większe zdolności ruchowe i motoryczne grupy myszy z cząsteczką wyciszającą CYP46A1. Wyniki po raz kolejny odzwierciedlają zachowanie myszy modelu dzikiego WT traktowanych tym samym reagentem, chociaż w przypadku modelu Ki150 obserwowano silniejszą poprawę, a wyniki osiągają istotność statystyczną na większości prętów. Dla wszystkich prętów odnotowano istotność statystyczną różnicę w czasie przejścia po prętach w przynajmniej jednym obserwowanym punkcie czasowym. Statystycznie istotne różnice obserwowane były w trzech punktach czasowych na prętach o średnicy 35, 28 i 21 mm (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,0001$; $p = 0,0002$; $p < 0,0001$). Najsilniejsze zmiany w motoryce obserwowane są na pręcie 21 mm 4, 8 i 15 tygodni po operacjach (odpowiednio test LSD Fishera, $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,05$), myszy z wyciszającą cząsteczką shCYP46A1 wykonują zadanie szybciej. Wyniki wskazują na wyraźną poprawę koordynacji ruchowej u Ki150 po zastosowaniu cząsteczki AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP.



Rysunek 22. Testy prętów statycznych myszy Ki150 wykonane w przedziale czasowym 0 – 19 tygodni po operacjach wstrzyknięcia wektorów AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP oraz AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP do DCN mózdzku. 9-tygodniowe myszy modelu SCA3 poddano iniekcjom stereotaktycznym. Ocena zmian behawioralnych na podstawie oznaczenia parametru (A) czasu obrotu (A) oraz czasu przejścia po pręcie (B) o średnicy 35, 28, 21, 17, 10mm zwierząt jednej płci (n=5 dla shScramble, n=5 dla shCYP46A1). Myszy poświęcono w 30 tygodniu życia. Obserwowano poprawę motoryki myszy w grupie traktowanej shCYP46A1 w porównaniu do myszy kontrolnych. (dwuczynnikowa ANOVA, $p < 0,05$; post-hoc test LSD Fishera, $p < 0,05$)

Obserwowane zmiany w wynikach osiąganych przez myszy w teście rotarod w przedziale czasowym 0-19 tygodni, nie wykazywały na występowanie istotnych zmian pomiędzy dwoma analizowanymi grupami (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,0753$) (Rys. 23A). Przez okres 8 tygodni od operacji kondycja motoryczna spadała niezależnie od zastosowanej cząsteczki w formacie AAV, co może wskazywać na związek z rekonwalescencją po operacji. pomimo że czasy do upadku myszy ze wstrzykniętą cząsteczką wyciszającą gen CYP46A1, nie były istotnie różne od grupy myszy kontrolnych, to w grupie Ki150 (shCYP46A1) po 8 tygodniu od iniekcji wyniki utrzymywały się na stałym poziomie (wartości rzędu 150s). Różnice w koordynacji myszy Ki150 shCYP46A1 obserwowano jedynie w ostatnim punkcie czasowym 19 tygodni zyskując istotność statystyczną na poziomie $p = 0,0425$; test LSD Fishera. W badanym przedziale czasowym 0 – 19 tygodni od operacji, testy punktacji fenotypu (Rys. 23B) nie ujawniają zmian w zachowaniu zwierząt traktowanych dwoma różnymi reagentami (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,1799$). Zwierzęta dwóch grup zyskiwały sumaryczny wynik zbliżony do wartości ok. 2 (Rys 23B). Waga osobników przyrastała w funkcji czasu do 8 tygodnia, następnie utrzymywała się do zakończenia eksperymentu. Nie obserwowano odchyleń wartości wagi pomiędzy grupą myszy z shCYP46A1 i shScramble po procedurze operacji stereotaktycznych (dwuczynnikowa ANOVA, $p = 0,4339$; test LSD Fishera, $p < 0,05$ dla punktu czasowego 0, przed operacjami stereotaktycznymi) (Rys. 23C).



Rysunek 23. Test rotarod (A), testy punktacji fenotypu (B), oraz waga (C) wykonane w przedziale czasowym 0 – 19 tygodni po operacjach wstrzyknięcia wektorów AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP oraz AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP do DCN myszy Ki150. Ocena zmian behawioralnych na podstawie oznaczenia parametru czasu do upadku myszy w teście rotarod (A), wyniku średniego otrzymanego z zsumowania 4 podrzędnych parametrów w testach punktacji fenotypu (B), oraz wagi (C) zwierząt. Zwierzęta jednej płci (n=5 dla shScramble, n=5 dla shCYP46A1). (dwuczynnikowa ANOVA, $p < 0,05$; post-hoc test LSD Fishera, $p < 0,05$)

Efektom iniekcji stereotaktycznych wektorów wirusowych AAV-PHP.eB_shCYP46A1 modelu SCA3 Ki150 jest poprawa sprawności ruchowej obserwowana głównie w testach prętów statycznych, które stanowią jedną z najczulszych metod oceny zmian fenotypowych w zaburzeniach neurodegeneracyjnych. Obserwacja jest spójna dla dwóch mysich modeli WT oraz Ki150.

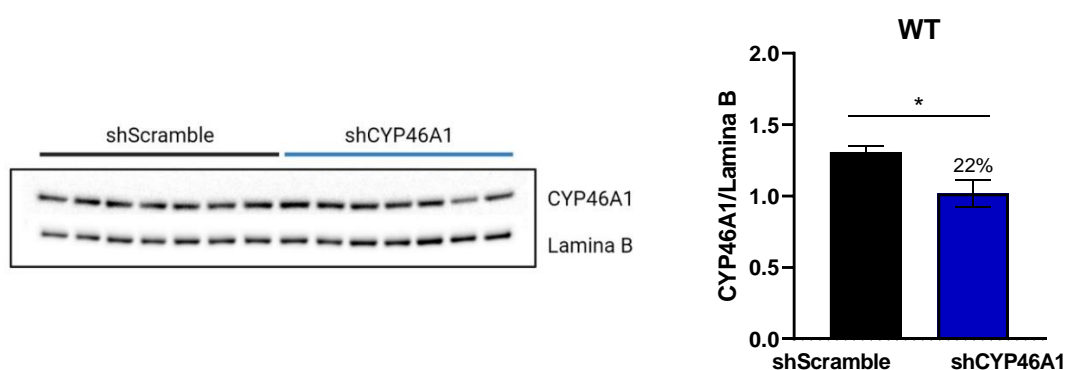
6.6.4. Ocena zmian poziomu białka CYP46A1 metodą Western blot po iniekcjach do DCN wektorem AAV-PHP.eB

Mysi model typu dzikiego WT

Jednym z postulowanych patomechanizmów SCA3 jest występowanie pośredniej ścieżki zaburzonej homeostazy cholesterolu w mózgu spowodowanej obniżonym poziomem białka CYP46A1. Zaburzona funkcja enzymu CYP46A1 wpływa na podwyższenie poziomu cholesterolu w mózgu, przez ograniczenie jego konwersji do pochodnej o właściwości przekraczania przez BBB. Przedstawiony patomechanizm jest wspólny dla wielu chorób neurodegeneracyjnych jak AD, HD oraz PD. Poprzez operacje stereotaktyczne, obustronnej iniekcji do DCN wektorów wirusowych AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP oraz AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP sprawdzono wpływ cząsteczki wyciszającej gen *CYP46A1* na poziom białka w strukturze podlegającej iniekcji. Wyizolowano białko z półkul mózdzku grup myszy WT traktowanych

shCYP46A1 oraz shScramble po 19 tygodniach od operacji wstrzyknięć stereotaktycznych myszy 9-tygodniowych (n=8 dla AAV-PHP.Eb_shCYP46A1_eGFP, oraz n=8 dla AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP). Enzym CYP46A1 zwalidowano o białko referencyjne; Laminę β (Rys. 24).

Analiza Western blot izolatów białkowych pochodzących z myszy WT wskazuje na występowanie znamiennego statystycznie obniżenia poziomu białka CYP46A1 grupy myszy z cząsteczką wyciszającą gen *CYP46A1* na poziomie 22% względem grupy kontrolnej (test Mann-Whitneya, $p=0,0175$).

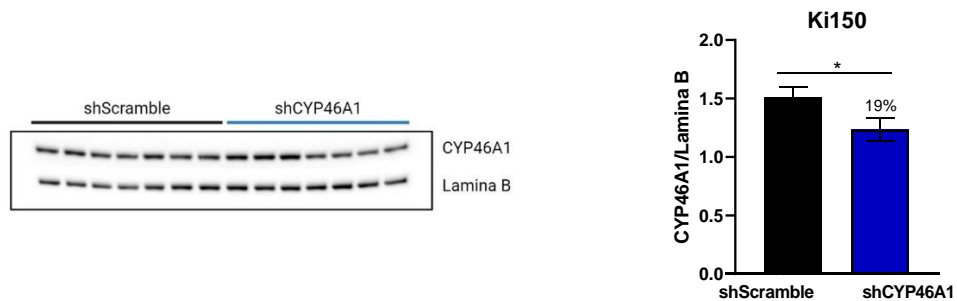


Rysunek 24. Reprezentatywny Western blot enzymu 24-hydroksylazy cholesterolu półkul mózdzku 19 tygodni po wstrzyknięciu wektorów AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP oraz AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP myszy WT. Analiza ilościowa białka CYP46A1 metodą Western blot mózdzku 19 tygodni po wstrzyknięciu wektora AAV do DCN wskazuje na spadek jego poziomu w grupie z shCYP46A1, (n=7 dla shScramble, n = 7 dla shCYP46A1). Test Mann-Whitneya, $p<0,05$. Białko CYP46A1 znormalizowano o białko referencyjne Laminę β .

Mysi model SCA3

Zbadano wpływ wektorów wirusowych transportujących cząsteczkę wyciszającą ekspresję genu *CYP46A1* na poziom białka CYP46A1 w tkankach, w których doszło do bezpośredniej iniekcji. Analizie poddano izolaty półkul mózdzku pochodzące od mysiego modelu SCA3 po iniekcji cząsteczką kontrolną shScramble, oraz cząsteczką wyciszającą shCYP46A1. Na podstawie analizy Western blot, otrzymano wyniki istotnego statystycznie obniżenia poziomu białka CYP46A1 w grupie myszy po iniekcjach wektorem zawierającym cząsteczkę shRNA wyciszającą ekspresję genu *CYP46A1* na poziomie 19% (test Mann-Whitneya, $p<0,05$) (Rys. 25). Na podstawie wykonanych badań behawioralnych oraz analiz molekularnych potwierdzono poprawę koordynacji

ruchowej na skutek obniżenia poziomu białka CYP46A1 (grupy myszy z wstrzykniętym shCYP46A1) jednocześnie w dwóch mysich modelach WT oraz Ki150.



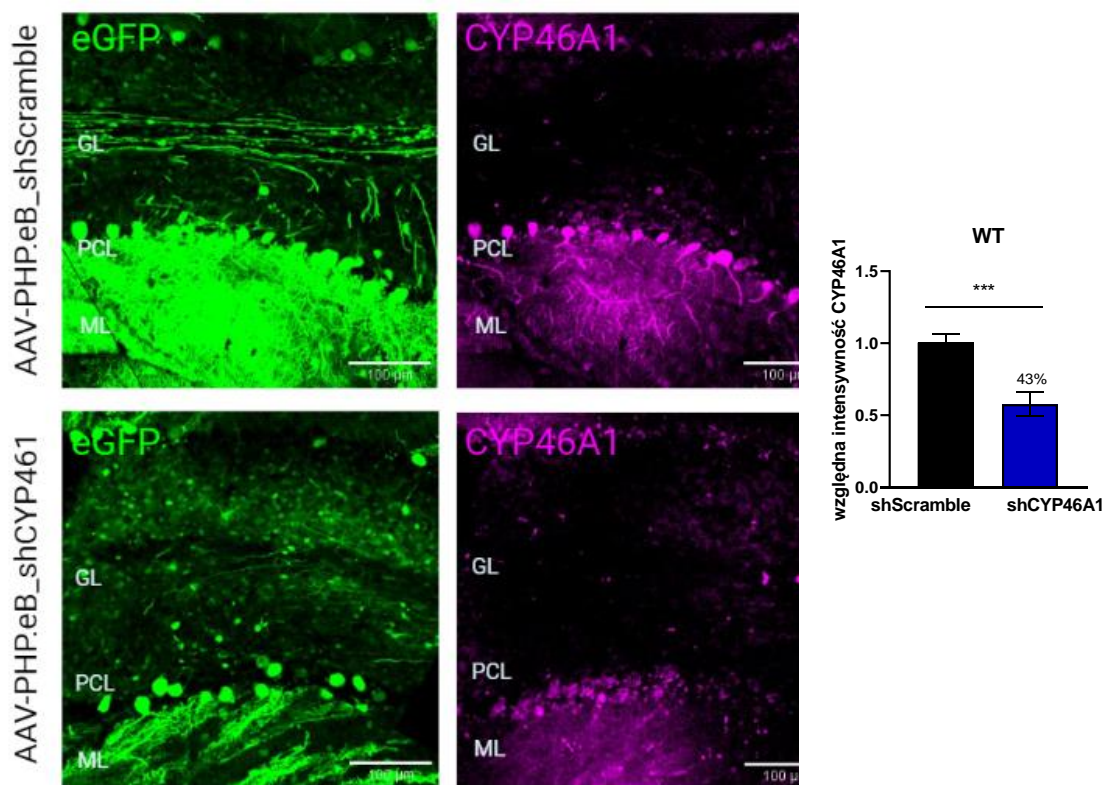
Rysunek 25. Reprezentatywny Western blot enzymu 24-hydroksylazy cholesterolu półkul mózdzku 19 tygodni po wstrzyknięciu wektorów AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP oraz AAV-PHP.Eb_shCYP46A1_eGFP myszy Ki150. Analiza ilościowa białka CYP46A1 metodą Western blot mózdzku 19 tygodni po wstrzyknięciu wektora AAV do DCN (n=7 dla shScramble, n=7 dla shCYP46A1). Test Mann-Whitneya, $p < 0,05$. CYP46A1 znormalizowano o białko referencyjne Laminę β .

6.6.5. Ocena zmian poziomu białka CYP46A1 metodą immunofluorescencyjną po iniekcjach do DCN wektorem AAV-PHP.eB

Mysi model typu dzikiego WT oraz SCA3 Ki150

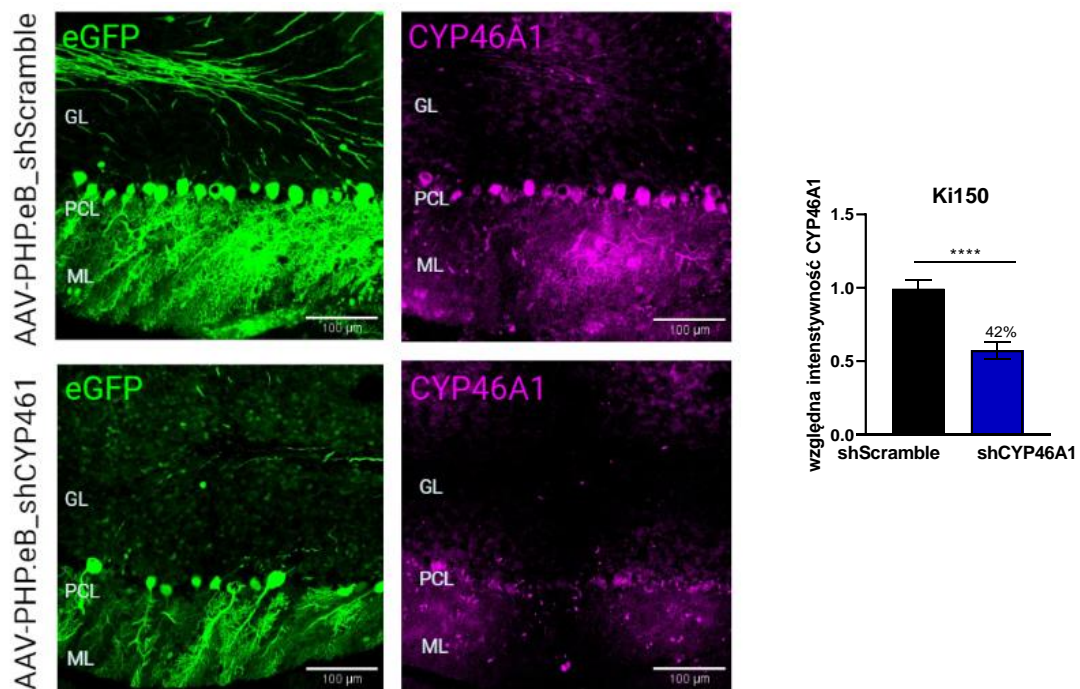
W celu potwierdzenia występowania efektu inhibicji ekspresji genu *CYP46A1* w tkance neurologicznej myszy, postanowiono zbadać zmiany poziomu białka CYP46A1 metodą immunofluorescencyjną. Odkąd wektory wirusowe zostały zaprojektowane tak, że w ich konstrukcjach poza sekwencją wyciszającą ekspresję genu *CYP46A1*, znajduje się sekwencja eGFP do produkcji białka, udaje się je łatwo wysledzić techniką mikroskopii fluorescencyjnej poprzez wzbudzenie laserem o odpowiedniej długości fali. Wykonano barwienie immunofluorescencyjne sagitalnych skrawków mózgu myszy WT i Ki150 traktowanych dwiema cząsteczkami shRNA z użyciem przeciwciała anti-CYP46A1. Jądra komórek zabarwiono 4',6-diamidino-2-fenyloindolem (DAPI). Przedstawione obrazy stanowią zdjęcia szkiełek ze skrawkami sagitalnymi grubości 20 μm , pochodzących z systemu wielopłaszczyznowego obrazowania fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego Opera Phenix™ (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Zdjęcia wykonano pod obiektywem 40 \times z immersją wodną, wartość

z-stack dla wybranego obiektywu to 0,5, zbierano obraz całej powierzchni mózdku o przekroju $z=20\mu\text{m}$. Względna intensywność świecenia CYP46A1 zbierano jedynie z powierzchni ciał komórek Purkinjego, u których występowała kolokalizacja z pozytywnym sygnałem eGFP. Przeprowadzone analizy immunofluorescencyjne względnej intensywności świecenia pokazały silny spadek poziomu CYP46A1 skrawków myszy WT traktowanych cząsteczką wyciszającą gen *CYP46A1*, aż o 43% w stosunku do względnej intensywności CYP46A1 myszy z cząsteczką kontrolną (test Mann-Whitneya, $p=0,0002$ (Rys. 26).



Rysunek 26. Reprezentatywne obrazy barwienia immunofluorescencyjnego enzymu 24-hydroksylazy cholesterolu skrawków mózdku, biodystrybucja eGFP, 19 tygodni po wstrzyknięciu wektorów AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP oraz AAV-PHP.Eb_shCYP46A1_eGFP myszy modelu WT. Wielopłaszczyznowe obrazowanie fluorescencyjne mikroskopu konfokalnego Opera Phenix skrawków sagitalnych mózdku myszy WT ujawniło biodystrybucję eGFP w mózdku, w warstwie PCL, ML po wstrzyknięciach wektorów wirusowych AAV-PHP.eB do DCN. Barwienie immunofluorescencyjne z przeciwciałem anti-CYP46A1 ujawniło zmniejszony poziom CYP46A1 u myszy z AAV-PHP.eB_shCYP46A1 w stosunku do myszy z AAV-PHP.eB_shScramble (obliczenia intensywności świecenia ciał komórek Purkinjego, $n=8$, Test Mann-Whitneya, $p=0,0002$. Skala: $100\mu\text{m}$. GL-warstwa granularna, PCL-warstwa komórek Purkinjego, ML-warstwa molekularna.

Analiza względnej intensywności sygnału CYP46A1 w grupie Ki150 pokazała bardzo silny, statystycznie istotny spadek tego białka o 42% u myszy z AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP, w porównaniu do myszy kontrolnych (test Mann-Whitneya, $p < 0,0001$) (Rys. 27). Barwienie immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciała anti-CYP46A1, jednocześnie wykorzystanego do analiz Western blot, stanowi drugą metodę molekularną, która potwierdza wpływ cząsteczki wyciszającej gen *CYP46A1*, na znamienny spadek poziomu tego białka w strukturze ulegającej bezpośredniej iniekcji wektorami AAV w modelach mysich.



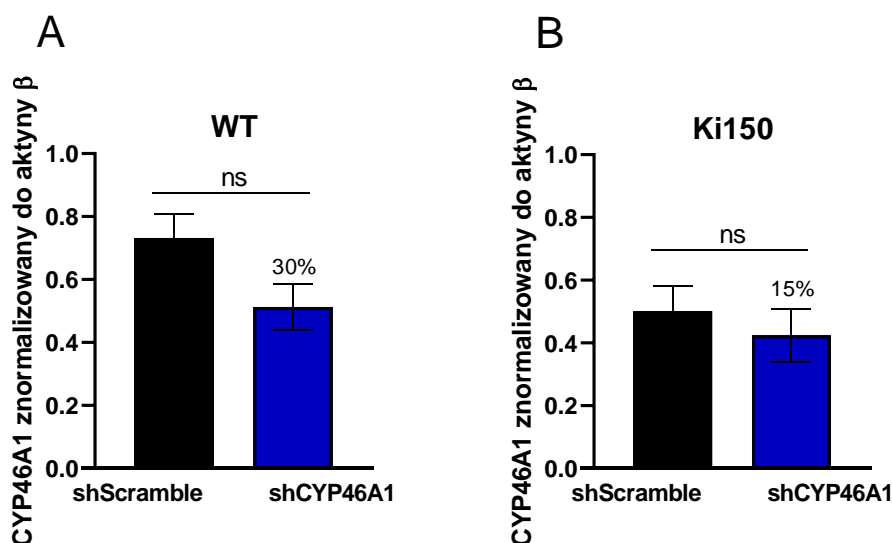
Rysunek 27. Reprezentatywne obrazy barwienia immunofluorescencyjnego enzymu 24-hydroksylazy cholesterolu skrawków mózdzku, biodystrybucję eGFP, 19 tygodni po wstrzyknięciu wektorów AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP oraz AAV-PHP.Eb_shCYP46A1_eGFP myszy modelu Ki150. Wielopłaszczyznowe obrazowanie fluorescencyjne mikroskopu konfokalnego Opera Phenix skrawków sagitalnych mózdzku myszy Ki150 ujawniło biodystrybucję eGFP w mózdzku, w warstwie PCL, ML po wstrzyknięciach wektorów wirusowych AAV-PHP.eB do DCN. Barwienie immunofluorescencyjne z przeciwciałem anti-CYP46A1 wykazało obniżenie CYP46A1 u myszy z AAV-PHP.eB_shCYP46A1 w porównaniu do myszy z AAV-PHP.eB_shScramble (obliczenia względnej intensywności CYP46A1 ciał komórek Purkiniego z pozytywnym eGFP, $n=8$. Test Manm-Whitneya, $p < 0,0001$. Jądra były barwione za pomocą 4',6-diamidino-2-fenyloindolem (DAPI). Skala: 100 μm . GL-warstwa granularna, PCL-warstwa komórek Purkiniego, ML-warstwa molekularna.

6.6.6. Ocena wyciszenia genu *CYP46A1* metodą qPCR po iniekcjach do DCN wektorem AAV-PHP.eB

Mysi model WT oraz SCA3 Ki150

W związku z wprowadzeniem do ustroju zwierząt modeli WT i Ki150 wektorów wirusowych AAV-PHP.eB_sh*CYP46A1* i AAV-PHP.eB_shScramble w dawce 2×10^9 vg/mysz do DCN, możliwe było zanalizowanie wpływu cząsteczki shRNA na wyciszenie ekspresji genu *CYP46A1* w mózdku.

RNA wyizolowano z półkul mózdku myszy dwóch modeli traktowanych sh*CYP46A1* oraz shScramble po 19 tygodniach od operacji wstrzyknięć stereotaktycznych. Wyniki dla genu *CYP46A1* znormalizowano względem genu referencyjnego β -aktyny. Analiza qPCR wskazuje na statystycznie istotne obniżenie ekspresji genu *CYP46A1* grupy myszy z cząsteczką sh*CYP46A1* na poziomie 30% w grupie myszy WT (test Mann-Whitneya, $p = 0,0667$) (Rys. 28A) oraz 15% w grupie myszy modelu Ki150 (test Mann-Whitneya, $p = 0,8857$) (Rys. 28B).



Rysunek 28. Wpływ iniekcji wektorów AAV-PHP.eB_sh*CYP46A1* i AAV-PHP.eB_shScramble do jąder głębokich mózdku mysich modeli typu dzikiego (A) i SCA3 (B) na poziom ekspresji genu *CYP46A1* znormalizowanego względem β -aktyny. Potraktowanie myszy cząsteczką sh*CYP46A1* spowodowało 15% obniżenie ekspresji genu *CYP46A1* w grupie myszy Ki150 i 30% w grupie myszy WT (\pm SEM). Porównania dokonano względem grup nastrzykniętych cząsteczką kontrolną shScramble. Test Mann-Whitneya, $p > 0,05$.

7. Dyskusja i perspektywy

Wektory wirusowe AAV są coraz bardziej powszechnym i skutecznym narzędziem służącym do dostarczania terapeutyków do układu nerwowego, zarówno ośrodkowego jak i obwodowego (Connor i in. 2016; Tervo i in. 2016). Przyszłe metody terapeutyczne opierające się na AAV będą wymagały większej selektywności dla wybranych populacji komórek, w celu zminimalizowania potencjalnych efektów ubocznych terapii. Obecnie tropizm AAV do komórek mózgu jest w dużej mierze zależny od zastosowania dedykowanych promotorów neuronalnych lub glejowych (Griffin i in. 2019; Hoshino i in. 2021). Jednak mimo zastosowania takich promotorów dochodzi do niekontrolowanej transdukcji innych komórek za pomocą AAV (bez wywołania ekspresji transgenu), co może powodować odpowiedź zapalną, integrację do genomu lub inne efekty zależne od metody dostarczania (Timmers i in. 2020). Problemy wynikające z tropizmu niektórych AAV do szerokiej puli komórek, obejmują niepożądany transport wektorów do tkanek obwodowych, takich jak wątroba i krew (Albright i in. 2018; Sherafat, b.d.; D. Liu i in. 2021). Dlatego też bardzo ważną częścią przyszłej terapii genowej jest precyzyjne zbadanie właściwości serotypów AAV w kontekście ukierunkowanego dostarczania terapii genowej do populacji komórek zaangażowanych w procesy patogenne. Serotyp AAVrh10 oraz nowy AAV-PHP.eB są bardzo obiecujące ze względu na transport retrogradowy oraz biodystrybucję w różnych typach komórek, w tym glejowych i neuronów (Petrosyan i in. 2014; Tanguy i in. 2015). Dodatkowo serotypy AAV-PHP.eB oraz AAVrh10, posiadają bardzo atrakcyjną właściwość, którą jest transport przez BBB (H. Zhang i in. 2011; Mathiesen i in. 2020).

W wielu chorobach neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Huntingtona, a szczególnie w ataksjach rdzeniowo-mózdkowych, takich jak SCA3 (Wiatr i in. 2019; Tereshchenko i in. 2020; Cook, Fields, i Watt 2021; Niewiadomska-Cimicka i in. 2021) jednym z głównych regionów degeneracji jest mózdzek. Struktura skomplikowanej sieci połączeń neuronów w mózdzku jest na tyle dobrze opisana (De Zeeuw, Lisberger, i Raymond 2021), że prawie wszystkie typy komórek nerwowych w nim występując, mogą być stosunkowo precyzyjnie zidentyfikowane na podstawie ich morfologii i lokalizacji. Mózdzek zawiera pobudzające (glutamatergiczne) i hamujące (GABAergiczne) typy neuronów tworzące sieci neuronalne, które są dobrze zbadane (Gilkes, Bloom, i Heldermon 2016; Tervo i in. 2016). Komórki Purkinjego w tej sieci, są prawdopodobnie najbardziej dotknięte w chorobach neurodegeneracyjnych. Dlatego dzięki poznanej

strukturze i funkcjom, mózdzek może stanowić ważny cel do dostarczania terapii genowych przez wektory AAV, a ograniczenie terapii do jednego typu komórek, może ograniczyć występowanie efektów niepożądanych z nią związanych.

Aby poznać patomechanizm SCA3, związany z nieprawidłową przemianą cholesterolu w mózgu, wybranym regionem w modelu WT i Ki150 do dostarczania wektorów AAV był mózdzek. Do tego zadania wymagana była metoda skutecznej i efektywnej transdukcji komórek Purkiniego, poprzez iniekcje stereotaktyczne mózdzku myszy, którą wraz z zespołem opracowaliśmy używając dwóch serotypów AAVrh10 oraz AAV-PHP.eB. Wstrzyknięcia miały na celu wyciszenie ekspresji genu kodującego białko CYP46A1 w komórkach Purkiniego mózdzku, głównego enzymu przemiany mózgowego cholesterolu. Następnie zbadano molekularne, komórkowe i fenotypowe konsekwencje takiego wyciszenia w modelu SCA3 Ki150.

W moich badaniach zdecydowałam się zastosować wymienione wektory w dwóch różnych miejscach iniekcji w mózdzku. Wstrzyknięcie do lobul mózdzku lokowało AAV w pobliżu aksonów komórek koszykowych i interneuronów oraz dendrytów komórek Purkiniego. Natomiast podanie do jąder głębokich mózdzku lokowało AAV w pobliżu aksonów komórek Purkiniego. Podczas wstrzyknięcia, umiejscowienie AAV w obrębie aksonów neuronów mózdzku wykorzystuje zdolności retrogradowe AAV i stanowi obiecujące narzędzie terapii genowej (Bravo-Hernandez i in. 2020; J. Wang i Zhang 2021).

W przypadku dostarczania AAVrh10 do lobul mózdzku uzyskano silną transdukcją komórek gwiaździstych i koszykowych (Rys. 5). Obie populacje komórek łatwo można odróżnić w obrazie mikroskopowym, dzięki charakterystycznej budowie morfologicznej. Komórki koszykowe swoimi neurytami oplatają ciała neuronów Purkiniego, i tworzą specyficzne struktury, zwane „pinceau” (J. Zhou i in. 2020). Po okresie 7-10 tygodni od wprowadzenia wektorów, sygnał translokował z komórek warstwy molekularnej do warstwy granularnej (Rys. 6). Od 10 do 20 tygodnia po iniekcji, komórkami wykazującymi pozytywną biodystrybucję były komórki granularne wraz z aksonami (Rys. 7). We wszystkich analizowanych punktach czasowych komórki Purkiniego pozostawały jednak w większości bez sygnału eGFP (Rys. 6 i 7). Prawdopodobnym wyjaśnieniem opisanego mechanizmu jest aspekt retrogradowego transportu wektorów wirusowych AAVrh10 i związany z nim międzykomórkowy transport kapsydów, który już podnoszono w literaturze (J. Wang i Zhang 2021). Ponadto lokalizacja aksonów komórek gwiaździstych i koszykowych w ML, sprzyja dostępności

wektorów wirusowych AAVrh10 w metodzie iniekcji lobularnych. Z metodologicznego punktu widzenia, aksony komórek Purkiniego nie były dostępne dla lobularnych iniekcji AAVrh10, ze względu na ich lokalizację w DCN. Nasze rezultaty wskazują, także na nieskuteczną transdukcję ciał i dendrytów komórek Purkiniego przez AAVrh10. W związku z nieskutecznym efektem transdukcji PC po lobularnych iniekcjach AAVrh10, postanowiono zmienić miejsce podania AAV na DCN (Rys. 8). W rezultacie modyfikacji metody uzyskano biodystrybucję AAVrh10 w niewielkiej liczbie komórek Purkiniego.

Taka transdukcja PC za pośrednictwem iniekcji AAVrh10 do DCN pokazuje również, że promotor PGK kierujący eGFP, jest aktywny w PC. Dlatego też brak transdukcji PC po iniekcjach lobularnych, nie jest spowodowany brakiem aktywności tego promotora. Co więcej, PGK jest bardzo skutecznym promotorem eGFP dla PC za pośrednictwem kasety lentiwirusowej (Bosch, Nerbonne, i Ornitz 2014). Przedstawiliśmy, że promotory PGK i CMV obecne w konstrukcjach AAV zarówno indukują intensywną i porównywalną ekspresję eGFP w neuronach Purkiniego, jak i neuronach granularnych.

Pomimo, że efekt transdukcji w PC wywołanej AAVrh10 był ograniczony, postanowiono sprawdzić możliwe zmiany behawioralne oraz białkowe u zwierząt WT traktowanych AAVrh10_shCYP46A1_eGFP oraz AAVrh10_shScramble_eGFP. Tak jak się spodziewaliśmy niewielka transdukcja oraz idący za tym brak wyciszenia genu *CYP46A1* w PC, przyczyniły się do obserwowanego braku różnic motorycznych względem grupy kontrolnej, wśród myszy WT (Rys. 16, 17) w badanym przedziale czasowym. Rezultaty wskazują na to, że cząsteczka shRNA mogła działać na zmianę ekspresji omawianego białka w PC, jednak mała liczba transdukowanych komórek nie pozwoliła na osiągnięcie poziomu istotnego statystycznie w eksperymentach (Rys. 18). Wyciszenie genu *CYP46A1* powinno być realizowane w neuronach, wykazujących silną ekspresję tego genu (Ramirez, Andersson, i Russell 2008).

W celu podwyższenia efektywności transdukcji PC, zdecydowano o zastosowaniu serotypu AAV-PHP.eB. Serotyp AAV-PHP.eB powstał jako pochodna wektora AAV9. Wektor AAV9 był używany w badaniach terapii stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) w związku ze zdolnością transdukcji motoneuronów o bardzo długich aksonach oraz przechodzeniu przez barierę krew-mózg (Bravo-Hernandez i in. 2020). AAV-PHP.eB jest również zdolny do przekraczania BBB i transdukcji PC po iniekcjach systemowych do splotu naczyniowego zatoki oka. Po przeprowadzeniu iniekcji retro-orbitalnej (do zatoki oka myszy), dostrzegliśmy silną transdukcję

większości komórek PC w mózdzku myszy (Rys. 10), jak również licznych komórek w pozostałych regionach mózgu (Rys. 9). Dlatego, rozważono możliwość równie efektywnej i selektywnej transdukcji, ograniczonej tylko do komórek PC wektorem AAV-PHP.eB, ale używając lokalnych iniekcji do lobul lub do DCN mózdzku. Iniekcji do lobul spowodowały niespójny wzór transdukcji szerokiej populacji komórek w okolicy miejsca iniekcji (Rys. 11). Natomiast w efekcie umieszczenia AAV w DCN, uzyskano obraz bardzo selektywnej i jednolitej transdukcji komórek PC już po 4 tygodniach od iniekcji (Rys. 13). Uzyskanie tak efektywnej transdukcji pozwoliło przejść do dalszego etapu pracy, jaką było badanie znaczenia wyciszenia *CYP46A1* specyficznym w komórkach Purkiniego, które są zaangażowane w patogenezę SCA3.

Komórki PC w mózdzku stanowią najbogatsze źródło *CYP46A1* (Ramirez, Andersson, i Russell 2008), który jest kluczowym enzymem przemian cholesterolu w mózgu. Pomimo, że czynnik etiologiczny w SCA3 jest bardzo dobrze udokumentowany, nie wiadomo czy podobnie jak w innych chorobach neurodegeneracyjnych zaburzenia gospodarki cholesterolu w mózgu mogą być składową patogenezą SCA3. Wykazano, że poziom *CYP46A1* jest obniżony w dotkniętych chorobą regionach mózgu u pacjentów i mysich modeli HD, AD i SCA3 (Hudry i in. 2010; Boussicault i in. 2016; Toonen i in. 2018; Kacher i in. 2019; Nóbrega i in. 2019; Burlot i in. 2015). W mysim modelu SCA3 Ki150, wygenerowanym w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, potwierdziliśmy występowanie obniżonego poziomu *CYP46A1* w mózdzku (Rys. 14). Dowiedliśmy, że występuje obniżony poziom białka *CYP46A1* na podstawie badań metodą immunofluorescencyjną w PC, oraz że istnieje tendencja spadkowa poziomu tego białka w mózdzku.

Założeniem naszych eksperymentów była indukcja fenotypu u zwierząt WT, który odzwierciedlałby fenotyp choroby SCA3, a w przypadku zwierząt transgenicznych SCA3 Ki150 założeniem było dalsze obniżenie *CYP46A1* skutkujące nasileniem fenotypu SCA3. Przewidywaliśmy, że obniżenie ekspresji *CYP46A1* doprowadzi do uszkodzenia neuronów mózdzku. Dojdzie do odkładania nadmiaru cholesterolu w mózgu i obniżonego poziomu 24-OHC, jak i innych produktów rozpadu cholesterolu, w związku z jego ograniczoną konwersją (Dai i in. 2021). *CYP46A1* nie tylko produkuje 24-OHC, ale także aktywuje cały szlak mewalonianowy syntezy cholesterolu. Związki pośrednie syntezy cholesterolu są ważnymi czynnikami wielu kluczowych ścieżek komórkowych, w szczególności endocytozy, autofagii i transmisji synaptycznej (Moutinho, Nunes, i Rodrigues 2016).

Wykazano, że wiele metabolitów cholesterolu, w tym oksysteroli, pełni role sygnalizacyjne w OUN (Collingridge i in. 2013; Paul i in. 2013; Sun i in. 2016). 24-OHC stanowi ważny produkt rozpadu cholesterolu, ponieważ moduluje funkcję kanałów jonowych, takich jak receptory N-metylo-D-asparaginianowe (NMDAR) (Paul i in. 2013), które pośredniczą w neurotransmisji pobudzającej w całym ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Aktywacja wymienionych receptorów związana jest z prawidłowym funkcjonowaniem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP, ang. long-term potentiation), ważnym dla plastyczności synaptycznej i uczenia się (Paul i in. 2013; Emmett i in. 2015; Sun i in. 2016; Wei i in. 2019). Donoszono również, że 24-OHC może wpływać na układ renina-angiotensyna (RAS; ang. renin-angiotensin system) w mózgu. Oprócz kluczowych funkcji systemowych RAS, takich jak regulacja ciśnienia krwi i gospodarki elektrolitowej, sugeruje się, że układ ten również reguluje funkcje plastyczność neuronów, uczenie się i pamięć w mózgu (Wright i Harding 2013).

Natomiast zmiany 24-OHC w AD w mózgu prawdopodobnie odzwierciedlają dysfunkcję neuronów podczas rozwoju AD. Poziom 24-OHC był zmniejszony w obszarach mózgu o najsilniejszej degeneracji *post mortem* u pacjentów AD, i u starzejących się myszy AD (APP751) (Heverin i in. 2004). Obniżenie poziomu 24-OHC w modelach AD i obserwowano w razem z zaburzeniami w LTP (Balschun and Rowan, 2018). Natomiast przywrócenie prawidłowej gospodarki cholesterolu w modelu mysim AD, przez podwyższenie poziomu CYP46A1 wpływało na poprawę pamięci i zmniejszenie zaburzeń synaptycznych (Burlot i in. 2015). Niska aktywność CYP46A1 i związany z nim wysoki poziom 24-OHC powiązany z niekorzystnym promowaniem procesu neurozapalnego, produkcją A β peptydów, inicjacją stresu oksydacyjnego i śmiercią komórek neuronalnych w liniach komórkowych (Gamba i in. 2011; 2014; Yamanaka i in. 2011).

Obniżony poziom 24-OHC, może skutkować podwyższeniem poziomu 27-OHC w mózgu. Hydroksylaza 27-cholesterolu jest produkowana powszechnie w organizmie, natomiast 27-OHC jest głównym metabolitem cholesterolu w krążeniu ogólnym (Marwarha i Ghribi 2015), ma on zdolność do przenikania przez BBB. Podwyższony poziom 27-OHC w mózgu prowadzi do nasilenia LTP w hipokampie modelu transgenicznym myszy Cyp27Tg. Założono, że wysoki poziom 27-OHC zaburza przewodzenie synaptyczne (ang. synaptic potentiation) i precyzyjne przetwarzanie informacji w hipokampie, co skutkuje upośledzeniem funkcji poznawczych (Loera-

Valencia i in. 2021). Jednocześnie stanowi to dowód na to, że zwiększenie aktywności LTP, również może nieść negatywne reperkusje.

Istnieją również przesłanki o funkcji oksysterolu 27-OHC w zmniejszaniu wychwytu glukozy w mózgu. Co przekłada się na zaburzenia pamięci przestrzennej *in vivo*, poprzez wpływ na układ renina-angiotensyna w mózgu (Ismail i in. 2017).

Dzięki opracowaniu metody efektywnych iniekcji stereotaktycznych do mózdzku i poznania właściwości wektorów wirusowych osiągnęliśmy pierwszy szczegółowy cel pracy. Uzyskano specyficzną i efektywną transdukcję wybranych komórek mózdzku z zastosowaniem bezpośrednich iniekcji z AAVrh10 oraz AAV-PHP.eB przy ograniczeniu stosowanej dawki podawanego reagenta. Możliwe było prowadzenie dalszych eksperymentów do osiągnięcia kolejnych celów szczegółowych.

Na podstawie iniekcji stereotaktycznych osiągnięto istotne statystycznie obniżenie białka CYP46A1 w PC w mózdzku z zastosowaniem AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP w porównaniu do AAV-PHP.eB_shScramble_eGFP oraz równie silny sygnał eGFP w PC dla obu wektorów w modelach WT i Ki150. Widoczna różnica w poziomie obniżenia białka między dwiema metodami (Western blot, barwienie immunofluorescencyjne) może wynikać z odmiennej charakterystyki dwóch metod. W przypadku Western blot do analizy wzięto białko całkowite, które zawiera bardzo niski procent CYP46A1 ze względu na ilość PC w mózdzku w porównaniu do innych komórek. Natomiast, metoda immunofluorescencyjna jest bardziej selektywna i umożliwia przeanalizowanie intensywność sygnału CYP46A1 w transdukowanych PC (wybarwionych GFP). Bardzo podobna tendencja spadku ekspresji CYP46A1 pojawia się w analizie ilościowej qPCR która nie osiąga jednak wartości istotnej statystycznie. Podobnie jak w analizie Western blot może to być spowodowane użyciem materiału wyizolowanego z całej półkuli mózdzku do qPCR z wieloma populacjami komórek.

Uzyskane wyniki analizy poziomu białka i mRNA CYP46A1 wskazują, że mogło dojść do kompensacji CYP46A1 w mózdzku ze strony innych populacji komórek, które mogą zainicjować produkcję tego białka w przypadku braku ekspresji w PC. Kompensacja ekspresji CYP46A1 przez astrocyty w chorobach neurodegeneracyjnych była już podnoszona w danych literaturowych (Bogdanovic i in. 2001; Brown i in. 2004). Ponieważ AD prowadzi do zaburzeń synaptycznych, a następnie utraty neuronów i ekspresji CYP46A1, dlatego ekspresja CYP46A1 w astrocytach została zasugerowana jako zrównoważenie spadku CYP46A1 w wyniku neurodegeneracji (Bogdanovic i in. 2001).

Niespodziewanym odkryciem w modelach WT i Ki150 po operacjach z użyciem AAV-PHP.eB_shCYP46A1_eGFP, była obserwowana poprawa sprawności ruchowej zwierząt w testach behawioralnych w porównaniu do grup myszy kontrolnych w badanym przedziale czasowym 0-19 tygodni po operacjach. Szczególnie jest to obserwowane w testach prętów statycznych. Testy prętów statycznych są bardzo czułą metodą analizy behawioru motorycznego mysich modeli chorób neurodegeneracyjnych. Test ten obejmuje etap obrotu zwierzęcia, oraz etap przejścia dla każdego z 5 prętów o malejącej średnicy (Deacon 2013). U myszy WT z cząsteczką shCYP46A1 obserwowano pewną poprawę sprawności ruchowej kiedy porównano zwierzęta WT względem Ki150. Natomiast zwierzęta Ki150 traktowane shCYP46A1 wykazały polepszenie fenotypu motorycznego, w porównaniu do Ki150 traktowanych niewyciszającym shScramble. Analizy kontrolne fenotypów popierają uzyskane wyniki. W przypadku porównania myszy kontrolnych Ki150 nietraktowanych i traktowanych shScramble nie zaobserwowano większych różnic w fenotypie. Zaobserwowano fenotyp motoryczny (od 20 tygodnia życia) nietraktowanych Ki150 w porównaniu do nietraktowanych WT. W końcowym etapie eksperymentów masa ciała zwierząt dwóch modeli z cząsteczką shCYP46A1 mieściła się w przedziale wartości uzyskanych przez myszy kontrolne shScramble.

Związkiem pomiędzy indukowanym obniżeniem ekspresji genu CYP46A1 w mózdzku, a korzystną zmianą motoryczną u myszy traktowanych modelu WT i Ki150 może być częściowo i lokalnie podwyższona ekspresja CYP46A1 (Sodero i in. 2011). Podczas procesu zapalnego aktywację gleju jednocześnie połączono z aktywnym oczyszczaniem tkanki z nieprawidłowo złożonych białek. Wnioski oparto na obserwacjach mechanizmów w chorobie neurodegeneracyjnej AD (Burlot i in. 2015).

Polepszenie w testach behawioralnych wraz z obniżeniem poziomu CYP46A1 w modelu Ki150 może być efektem wzmożonego agregowania zmutowanego białka, ATXN3. Rozważano już funkcję neuroprotekcijną tego procesu, i wynikające z niego obniżenie aktywności patologicznego białka w procesie sekwestracji (Invernizzi i in. 2012; Todd i in. 2013; Vinatier i in. 2015). Możliwe, że agregowanie zmutowanej ATXN3 spełnia rolę protekcijną, jedynie we wczesnym stadium choroby, kiedy jeszcze inne funkcjonalne białka nie ulegają procesowi sekwestracji razem z nią (Sánchez, Mahlke, i Yuan 2003). W związku z moimi badaniami potrzebnych jest więcej eksperymentów w celu potwierdzenia wysuniętej hipotezy.

Dotychczas eksperymenty badawcze związane z obniżeniem ekspresji CYP46A1 wykorzystywały tę samą sekwencję niesioną w wektorach wirusowych AAV, którą zawdzięcza się Djelti (2015) (Djelti i in. 2015; Boussicault i in. 2016; Aycirieux i in. 2017; Nóbrega i in. 2019; Burlot i in. 2015). W wyżej wymienionych pracach iniekcja w region hipokampu myszy WT spowodowała symptomy zbliżone do tych w chorobie AD, między innymi zaburzeń poznawczych, atrofii struktury nastrzykiwanej, zwiększoną produkcję amyloidu β , upośledzoną fosforylację tau oraz stres siateczki śródplazmatycznej (Djelti i in. 2015). W transgenicznym mysim modelu APP23 fenotyp chorobowy został jeszcze bardziej zaostrowany poprzez utratę neuronów prowadzącą do napadów padaczkowych (Chali i in. 2015; Djelti i in. 2015). Natomiast iniekcje w region prążkowie myszy WT generowały fenotyp charakterystyczny dla HD ze spontaniczną degeneracją neuronów prążkowie (Boussicault i in. 2016), wraz z odkładaniem się endosomów i lizosomów (Nóbrega i in. 2019).

Przytoczone rezultaty wcześniejszych prac które demonstrują niekorzystny wpływ obniżenia CYP46A1 wykazują znaczne różnice w przeprowadzeniu eksperymentów i modelach badawczych. Jedną z różnic jest region mózgu podania shCYP46A1, którym przeważnie było prążkowie i hipokamp, mające bardzo szczególne znaczenie dla LTP (ang. long-term potentiation). Prawdopodobnie zaburzenia przemian cholesterolu w neuronach tych dwóch struktur mogą przyczyniać się do zmian plastyczności synaptycznej i wpływać na proces uczenia się i zapamiętywania. Podkreślić jednak należy, że istnieje bardzo ograniczona ilość badań odzwierciedlająca te, które przedstawiam w swojej pracy doktorskiej. Mowa tu o badaniach wyciszenia CYP46A1 w mózdzku, w modelu choroby SCA3. Natomiast te, które zostały opublikowane, skupiają się na podwyższeniu ekspresji CYP46A1 w mózdzku modelu transgenicznego myszy SCA3 69Q, oraz w prążkowie lentiwirusowego modelu myszy SCA3, na podstawie operacji stereotaktycznych z zastosowaniem AAVrh10 (Nóbrega i in. 2019). Jednak względem doświadczeń uzyskanych z przeprowadzonych operacji z użyciem AAVrh10, oraz poznaniu właściwości tego wektora wirusowego dowiedliśmy, że iniekcje do mózdzku powodowały bardzo ubogą transdukcję komórek PC mózdzku, najbardziej dotkniętych przez SCA3, a jednocześnie najsilniej ekspresyjających CYP46A1.

W związku z tą wiedzą, można przypuszczać, że rezultaty uzyskane przez Nóbrega i wsp. są skutkiem innego mechanizmu, związanego z podniesieniem ekspresji CYP46A1 ale nie w komórkach PC, aktywowanego na skutek wprowadzenia cząsteczki

AAVrh10_CYP46A1 do mózdku. Terapia w przytoczonych eksperymentach obejmowała myszy transgeniczne, które już zdążyły nabyć objawy fenotypowe SCA3, co stanowi kolejną różnicę względem naszych badań. Natomiast wcześniejsze badania indukujące nadekspresję CYP46A1 z pomocą AAVrh10 połączone z indukowaniem SCA3 w strukturze prądkowia przez wprowadzenie zmutowanej ATXN3 w lentiwirusie, bardzo trudno porównać z eksperymentami na mysim humanizowanym modelu SCA3 Ki150. Myszy transgeniczne Ki150 są modelem bardzo ściśle odzwierciedlającym SCA3 z fenotypowego i molekularnego punktu widzenia. Jest to model humanizowany, uznany jako jeden z dokładniejszych, w którym neurodegeneracji ulega więcej niż jedna struktura mózgu (Switonski i in. 2015).

Co więcej, badania nad transgenicznym mysim modelem typu knock-out bez ekspresji CYP46A1 -/- (ang. knock-out; KO), sugerują, że pozbawienie genu nie jest letalne dla zwierząt (Lund i in. 2003; Meljon, Wang, i Griffiths 2014), prawdopodobnie dzięki mechanizmom kompensacyjnym aktywowanym we wczesnym rozwoju. Model został stworzony w 2003r. i charakteryzuje go silna korelacja między eliminacją cholesterolu, a jego produkcją w mózgu. Poziom cholesterolu w mózgu u tych zwierząt był niezmienny i odzwierciedlał ten u myszy WT. Natomiast wykazano 40% spadek syntezy cholesterolu *de novo* w mózgu i odpowiadający mu 40% spadek eliminacji cholesterolu z mózgu do krążenia ogólnego (Lund i in. 2003; Meljon, Wang, i Griffiths 2014). Charakterystyka myszy KO w porównaniu do myszy WT, ujawniła poważne zaburzenia poznawcze, które razem z funkcją CYP46A1 oraz metabolizmem cholesterolu połączono z funkcjami wyższego rzędu w mózgu (T. J. Kotti i in. 2006). Myszy KO wykazujące brak 24-hydroksylazy cholesterolu, wykazują zmniejszone tempo syntezy cholesterolu i innych izoprenoidów niesterolowych, które powstają na drodze szlaku mewalonianowego. Co z kolei przyczynia się do pojawienia się zmian kognitywnych poprzez upośledzenie LTP w hipokampie (T. Kotti i in. 2008). Jednak nie dopatrzone się zmian behawioralnych w testach otwartego pola oraz rotarod. Nie wykazano również zmian motorycznych nawet u 2 letnich myszy KO (Lund i in. 2003).

Badania modulacji syntezy cholesterolu w chorobach neurodegeneracyjnych sugerują, że neurony ulegają uszkodzeniu w związku z obniżonym poziomem cholesterolu i zaburzonym procesem jego biosyntezy w HD (Valenza i in. 2015; Shankaran i in. 2017). Jednak leki hamujące syntezę cholesterolu, statyny, są proponowane jako terapia neuroprotektoryjna, w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych, w tym, PD i AD (Saeedi Saravi i in. 2017). Inhibicja syntezy

cholesterolu przez satyny jest realizowana poprzez inhibicję szlaku mewalonianowego (Nassief i Marsh 2008; van der Most i in. 2009; Barone, Di Domenico, i Butterfield 2014).

Neuropatologia w SCA3 nie ogranicza się jedynie do zaburzeń w obrębie struktury mózdzku, ale także występuje w obrębie prążkowiec, istoty czarnej, czy niektórych jądrach ruchowych nerwów czaszkowych (Dürr i in. 1996; T. Klockgether i in. 1998; Alves i in. 2008; Udo Rüb, Brunt, i Deller 2008). Do tej pory jednak zbiór badań w obrębie mózdzku w chorobach neurodegeneracyjnych, a w szczególności SCA3 jest bardzo ograniczony.

Na podstawie eksperymentów w pracy doktorskiej wnioskujemy, że oba serotypy AAVrh10 oraz AAV-PHP.eB, oraz kierowana przez nie dystrybucja retrogradowa, mogą być stosowane do selektywnej transdukcji głównych rodzajów neuronów w mózdzku w celu efektywnego dostarczania terapii genowej. Oba wektory mogą być stosowane w parze jako wzajemne kontrole efektu terapeutycznego i efektów ubocznych w terapii genowej w mózdzku. Nasze strategie *in vivo* są dostosowane do dalszego rozwoju przedklinicznych i klinicznych badań dostarczania genów do komórek granularnych przez AAVrh10 i komórek Purkiniego przez AAV-PHP.eB. Nasze badania, są prawdopodobnie pierwszymi, w których poza specyficzną i efektywną transdukcją neuronów PC, uzyskano korzystny efekt behawioralny na skutek redukcji CYP46A1, po bezpośrednich iniekcjach do mózdzku dwóch traktowanych mysich modeli.

Dowody, że CYP46A1 jest obniżony nie tylko u pacjentów i w mysich modelach AD (Burlot i in. 2015) i HD (Boussicault i in. 2016), ale także w SCA3, wraz z wykryciem upośledzonej syntezy cholesterolu w mózdzku Ki150, silnie wskazuje na związek CYP46A1 i przemian cholesterolu w patofizjologii tych chorób. Wyniki jednakże sugerują, że redukcja CYP46A1 ograniczona do struktury mózdzku, może stanowić bezpośredni element neuroprotekcji w procesie neurodegeneracyjnym. Na podstawie uzyskanych wyników, możemy postawić hipotezę, że obniżenie metabolizmu cholesterolu, wpływające pośrednio na obniżenie jego syntezy w szlaku mewalonianowym, może być ścieżką neuroprotekcją, gdy terapeutyk zostanie wprowadzony do neuronów mózdzku w fazie presymptomatycznej modelu SCA3 Ki150 oraz WT.

8. Wnioski

Wpływ syntezy i przemian cholesterolu w chorobach mózgu nie został jeszcze dokładnie poznany. Nie zdefiniowano roli poziomu *CYP46A1* w mózdku oraz w mysich modelach ataksji rdzeniowo mózdkowych. Nasze badania pokazały:

- [1] Ustalono wydajności i rodzaju populacji komórek mózdku transdukowanych przez serotypy AAV na podstawie szerokiego zastosowania wektorów wirusowych AAVrh10 oraz AAV-PHP.eB.
- [2] Po bezpośrednich iniekcjach do mózdku ustalono bardzo efektywny i selektywny sposób transdukcji komórek Purkiniego poprzez użycie: AAV.PHP.eB, iniekcje do DCN i efektywnego stężenia wektora.
- [3] Obniżenie poziomu *CYP46A1* w mózdku w komórkach Purkiniego u myszy typu dzikiego (C57BL) nie doprowadza do wywołania fenotypu SCA3. Takie wyciszenie umiarkowanie poprawia motorykę myszy C57BL.
- [4] Obniżenie poziomu *CYP46A1* w mózdku w komórkach Purkiniego w mysim modelu choroby neurodegeneracyjnej SCA3 Ki150 nie doprowadza do zaostrzenia fenotypu SCA3, jednocześnie działając przeciwnie i poprawia zaburzoną sprawność motoryczną w tym modelu.
- [5] Selektywne obniżenie *CYP46A1* w komórkach Purkiniego może być celem terapeutycznym w SCA3 i w innych chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniem przemian cholesterolu w mózdku w PC.

Moje przyszłe badania nad rolą *CYP46A1* w SCA3 skupią się na zbadaniu zmiany poziomu prekursorów, oraz produktów rozpadu cholesterolu w badaniach lipidomicznych tkanki mózgowej, płynu mózgowo-rdzeniowego (CSF) oraz osocza krwi. Jednocześnie postaram się skorelować zmiany poziomu prekursorów i pochodnych cholesterolu, z poziomem zmutowanego białka ataksyny-3 w mysim modelu Ki150. Po wykonaniu szczegółowego profilowania lipidomicznego w materiale pobranym z traktowanych grup myszy, ciekawym eksperymentem byłoby zanalizowanie zmian w procesach, na które mają wpływ związki szlaku mewalonianowego, to jest endocytozy, autofagii czy transmisji synaptycznej, jak i bezpośrednia analiza poziomu związków biorących udział w syntezie cholesterolu. W celu lepszego poznania efektu redukcji *CYP46A1* w mózdku, warto byłoby ocenić poziom białek charakterystycznych dla RAS i szlaku glutaminianowego.

9. Bibliografia

- Albright, Blake H., Claire M. Storey, Giridhar Murlidharan, Ruth M. Castellanos Rivera, Garrett E. Berry, Victoria J. Madigan, i Aravind Asokan. 2018. „Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier”. *Molecular Therapy* 26 (2): 510–23. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.10.017>.
- Alfen, N. van, R. J. Sinke, M. J. Zwarts, A. Gabreëls-Festen, P. Praamstra, B. P. Kremer, i M. W. Horstink. 2001. „Intermediate CAG Repeat Lengths (53,54) for MJD/SCA3 Are Associated with an Abnormal Phenotype”. *Annals of Neurology* 49 (6): 805–7. <https://doi.org/10.1002/ana.1089>.
- Alves, Sandro, Isabel Nascimento-Ferreira, Gwennaëlle Auregan, Raymonde Hassig, Noëlle Dufour, Emmanuel Brouillet, Maria C. Pedroso de Lima, Philippe Hantraye, Luís Pereira de Almeida, i Nicole Déglon. 2008. „Allele-Specific RNA Silencing of Mutant Ataxin-3 Mediates Neuroprotection in a Rat Model of Machado-Joseph Disease”. *PloS One* 3 (10): e3341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003341>.
- Alves, Sandro, Isabel Nascimento-Ferreira, Noëlle Dufour, Raymonde Hassig, Gwennaëlle Auregan, Clévio Nóbrega, Emmanuel Brouillet, i in. 2010. „Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado–Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3?” *Human Molecular Genetics* 19 (12): 2380–94. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq111>.
- Antony, Paul Michel Aloyse, Simone Mäntele, Phillip Mollenkopf, Jana Boy, Ralph H. Kehlenbach, Olaf Riess, i Thorsten Schmidt. 2009. „Identification and Functional Dissection of Localization Signals within Ataxin-3”. *Neurobiology of Disease* 36 (2): 280–92. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.020>.
- Aschauer, Dominik F., Sebastian Kreuz, i Simon Rumpel. 2013. „Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain”. *PLoS ONE* 8 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076310>.
- Ashizawa, Tetsuo, Gülin Öz, i Henry L. Paulson. 2018. „Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development”. *Nature reviews. Neurology* 14 (10): 590–605. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0051-6>.
- Ashkenazi, Avraham, Carla F. Bento, Thomas Ricketts, Mariella Vicinanza, Farah Siddiqi, Mariana Pavel, Ferdinando Squitieri, i in. 2017. „Polyglutamine Tracts Regulate Beclin 1-Dependent Autophagy”. *Nature* 545 (7652): 108–11. <https://doi.org/10.1038/nature22078>.
- Ayciriex, Sophie, Fathia Djelti, Sandro Alves, Anne Regazzetti, Mathieu Gaudin, Jennifer Varin, Dominique Langui, i in. 2017. „Neuronal Cholesterol Accumulation Induced by Cyp46a1 Down-Regulation in Mouse Hippocampus Disrupts Brain Lipid Homeostasis”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (lipiec): 211. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00211>.
- Balschun, Detlef, i Michael J. Rowan. 2018. „Hippocampal Synaptic Plasticity in Neurodegenerative Diseases: A β , Tau and Beyond”. *Neuroforum* 24 (3): A133–41. <https://doi.org/10.1515/nf-2017-A063>.
- Barone, Eugenio, Fabio Di Domenico, i D. Allan Butterfield. 2014. „Statins More than Cholesterol Lowering Agents in Alzheimer Disease: Their Pleiotropic Functions as Potential Therapeutic Targets”. *Biochemical Pharmacology, Alzheimer’s Disease – Amyloid, Tau and Beyond*, 88 (4): 605–16. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.030>.

- Bartel, David P. 2004. „MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function”. *Cell* 116 (2): 281–97. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).
- Bell, Christie L., Luk H. Vandenberghe, Peter Bell, Maria P. Limberis, Guang-Ping Gao, Kim Van Vliet, Mavis Agbandje-McKenna, i James M. Wilson. 2011. „The AAV9 Receptor and Its Modification to Improve in Vivo Lung Gene Transfer in Mice”. *The Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2427–35. <https://doi.org/10.1172/JCI57367>.
- Bergink, Steven, Florian A. Salomons, Deborah Hoogstraten, Tom A.M. Groothuis, Harm de Waard, Junxin Wu, Li Yuan, i in. 2006. „DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A”. *Genes & Development* 20 (10): 1343–52. <https://doi.org/10.1101/gad.373706>.
- Berns, K. I., i C. Giraud. 1996. „Biology of Adeno-Associated Virus”. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 218: 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-642-80207-2_1.
- Bettencourt, Conceição, i Manuela Lima. 2011. „Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives”. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6 (1): 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-35>.
- Bettencourt, Conceição, Cristina Santos, Teresa Kay, João Vasconcelos, i Manuela Lima. 2008. „Analysis of Segregation Patterns in Machado–Joseph Disease Pedigrees”. *Journal of Human Genetics* 53 (10): 920–23. <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0330-y>.
- Bialer, Meir, Svein I. Johannessen, Matthias J. Koepp, René H. Levy, Emilio Perucca, Torbjörn Tomson, i H. Steve White. 2018. „Progress Report on New Antiepileptic Drugs: A Summary of the Fourteenth Eilat Conference on New Antiepileptic Drugs and Devices (EILAT XIV). I. Drugs in Preclinical and Early Clinical Development”. *Epilepsia* 59 (10): 1811–41. <https://doi.org/10.1111/epi.14557>.
- Bichelmeier, Ulrike, Thorsten Schmidt, Jeannette Hübener, Jana Boy, Lukas Rüttiger, Karina Häbig, Sven Poths, i in. 2007. „Nuclear Localization of Ataxin-3 Is Required for the Manifestation of Symptoms in SCA3: In Vivo Evidence”. *Journal of Neuroscience* 27 (28): 7418–28. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4540-06.2007>.
- Bilen, Julide, i Nancy M. Bonini. 2007. „Genome-Wide Screen for Modifiers of Ataxin-3 Neurodegeneration in *Drosophila*”. *PLOS Genetics* 3 (10): e177. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030177>.
- Björkhem, I. 2006. „Crossing the Barrier: Oxysterols as Cholesterol Transporters and Metabolic Modulators in the Brain”. *Journal of Internal Medicine* 260 (6): 493–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01725.x>.
- Björkhem, I., E. Lund, i M. Rudling. 1997. „Coordinate Regulation of Cholesterol 7 Alpha-Hydroxylase and HMG-CoA Reductase in the Liver”. *Sub-Cellular Biochemistry* 28: 23–55. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5901-6_2.
- Björkhem, Ingemar, Dieter Lütjohann, Ulf Diczfalusy, Lars Ståhle, Gunvor Ahlborg, i John Wahren. 1998. „Cholesterol Homeostasis in Human Brain: Turnover of 24S-Hydroxycholesterol and Evidence for a Cerebral Origin of Most of This Oxysterol in the Circulation”. *Journal of Lipid Research* 39 (8): 1594–1600. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32188-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32188-X).
- Bloch, K. 1965. „The Biological Synthesis of Cholesterol”. *Science (New York, N.Y.)* 150 (3692): 19–28. <https://doi.org/10.1126/science.150.3692.19>.
- Bogdanovic, N., L. Bretillon, E. G. Lund, U. Diczfalusy, L. Lannfelt, B. Winblad, D. W. Russell, i I. Björkhem. 2001. „On the Turnover of Brain Cholesterol in Patients with Alzheimer’s Disease. Abnormal Induction of the Cholesterol-Catabolic

- Enzyme CYP46 in Glial Cells". *Neuroscience Letters* 314 (1–2): 45–48. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)02277-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)02277-7).
- Bosch, Marie K., Jeanne M. Nerbonne, i David M. Ornitz. 2014. „Dual Transgene Expression in Murine Cerebellar Purkinje Neurons by Viral Transduction in Vivo". *PloS One* 9 (8): e104062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104062>.
- Bouard, D, N Alazard-Dany, i F-L Cosset. 2009. „Viral Vectors: From Virology to Transgene Expression". *British Journal of Pharmacology* 157 (2): 153–65. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.349>.
- Boussicault, Lydie, Sandro Alves, Antonin Lamazière, Anabelle Planques, Nicolas Heck, Lara Mounné, Gaëtan Despres, i in. 2016. „CYP46A1, the Rate-Limiting Enzyme for Cholesterol Degradation, Is Neuroprotective in Huntington's Disease". *Brain* 139 (3): 953–70. <https://doi.org/10.1093/brain/awv384>.
- Boy, Jana, Thorsten Schmidt, Ulrike Schumann, Ute Grasshoff, Samy Unser, Carsten Holzmann, Ina Schmitt, i in. 2010. „A Transgenic Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 3 Resembling Late Disease Onset and Gender-Specific Instability of CAG Repeats". *Neurobiology of Disease*, *Frontiers in Brain Repair*, 37 (2): 284–93. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.08.002>.
- Boy, Jana, Thorsten Schmidt, Hartwig Wolburg, Andreas Mack, Silke Nuber, Martin Böttcher, Ina Schmitt, i in. 2009. „Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3". *Human Molecular Genetics* 18 (22): 4282–95. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp381>.
- Bravo-Hernandez, Mariana, Takahiro Tadokoro, Michael R. Navarro, Oleksandr Platoshyn, Yoshiomi Kobayashi, Silvia Marsala, Atsushi Miyanohara, i in. 2020. „Spinal Subpial Delivery of AAV9 Enables Widespread Gene Silencing and Blocks Motoneuron Degeneration in ALS". *Nature Medicine* 26 (1): 118–30. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0674-1>.
- Bretillon, L., D. Lütjohann, L. Stähle, T. Widhe, L. Bindl, G. Eggertsen, U. Diczfalusy, i I. Björkhem. 2000. „Plasma Levels of 24S-Hydroxycholesterol Reflect the Balance between Cerebral Production and Hepatic Metabolism and Are Inversely Related to Body Surface". *Journal of Lipid Research* 41 (5): 840–45.
- Brown, James, Catherine Theisler, Simone Silberman, Debra Magnuson, Numa Gottardi-Littell, John M. Lee, Debra Yager, i in. 2004. „Differential Expression of Cholesterol Hydroxylases in Alzheimer's Disease". *The Journal of Biological Chemistry* 279 (33): 34674–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402324200>.
- Bu, Guojun. 2009. „Apolipoprotein E and Its Receptors in Alzheimer's Disease: Pathways, Pathogenesis and Therapy". *Nature Reviews. Neuroscience* 10 (5): 333–44. <https://doi.org/10.1038/nrn2620>.
- Buijsen, Ronald A. M., Lodewijk J. A. Toonen, Sarah L. Gardiner, i Willeke M. C. van Roon-Mom. 2019. „Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias". *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 16 (2): 263–86. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00696-y>.
- Burger, Corinna, Oleg S. Gorbatyuk, Margaret J. Velardo, Carmen S. Peden, Philip Williams, Sergei Zolotukhin, Paul J. Reier, Ronald J. Mandel, i Nicholas Muzyczka. 2004. „Recombinant AAV Viral Vectors Pseudotyped with Viral Capsids from Serotypes 1, 2, and 5 Display Differential Efficiency and Cell Tropism after Delivery to Different Regions of the Central Nervous System". *Molecular Therapy* 10 (2): 302–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.05.024>.
- Bürk, K., M. Abele, M. Fetter, J. Dichgans, M. Skalej, F. Laccone, O. Didierjean, A. Brice, i T. Klockgether. 1996. „Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia Type I

- Clinical Features and MRI in Families with SCA1, SCA2 and SCA3". *Brain: A Journal of Neurology* 119 (Pt 5) (październik): 1497–1505. <https://doi.org/10.1093/brain/119.5.1497>.
- Burlot, Marie-Anne, Jérôme Braudeau, Kristin Michaelsen-Preusse, Brigitte Potier, Sophie Aycirix, Jennifer Varin, Benoit Gautier, i in. 2015. „Cholesterol 24-Hydroxylase Defect Is Implicated in Memory Impairments Associated with Alzheimer-like Tau Pathology". *Human Molecular Genetics* 24 (21): 5965–76. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv268>.
- Burnett, Barrington, Fusheng Li, i Randall N. Pittman. 2003. „The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity". *Human Molecular Genetics* 12 (23): 3195–3205. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg344>.
- Camargo, Nutabi, August B. Smit, i Mark H. G. Verheijen. 2009. „SREBPs: SREBP Function in Glia–Neuron Interactions". *The FEBS Journal* 276 (3): 628–36. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06808.x>.
- Carmona, Vitor, Janete Cunha-Santos, Isabel Onofre, Ana Teresa Simões, Udaya Vijayakumar, Beverly L. Davidson, i Luís Pereira de Almeida. 2017. „Unravelling Endogenous MicroRNA System Dysfunction as a New Pathophysiological Mechanism in Machado-Joseph Disease". *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (4): 1038–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.021>.
- Carvalho, Ana Luisa, Alexandra Silva, i Sandra Macedo-Ribeiro. 2018. „Polyglutamine-Independent Features in Ataxin-3 Aggregation and Pathogenesis of Machado-Joseph Disease". *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1049: 275–88. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_14.
- Carvalho, Daniel R., Alessandra La Rocque-Ferreira, Isabela M. Rizzo, Erica U. Imamura, i Carlos E. Speck-Martins. 2008. „Homozygosity Enhances Severity in Spinocerebellar Ataxia Type 3". *Pediatric Neurology* 38 (4): 296–99. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.006>.
- Castilhos, Raphael Machado de, Gabriel Vasata Furtado, Tailise Conte Gheno, Paola Schaeffer, Aline Russo, Orlando Barsottini, José Luiz Pedroso, i in. 2014. „Spinocerebellar Ataxias in Brazil—Frequencies and Modulating Effects of Related Genes". *The Cerebellum* 13 (1): 17–28. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0510-y>.
- Cearley, Cassia N., i John H. Wolfe. 2006. „Transduction Characteristics of Adeno-Associated Virus Vectors Expressing Cap Serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the Mouse Brain". *Molecular Therapy* 13 (3): 528–37. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.11.015>.
- Cemal, Cemal K., Christopher J. Carroll, Lorraine Lawrence, Margaret B. Lowrie, Piers Ruddle, Sahar Al-Mahdawi, Rosalind H. M. King, Mark A. Pook, Clare Huxley, i Susan Chamberlain. 2002. „YAC Transgenic Mice Carrying Pathological Alleles of the MJD1 Locus Exhibit a Mild and Slowly Progressive Cerebellar Deficit". *Human Molecular Genetics* 11 (9): 1075–94. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1075>.
- Chai, Yaohui, Sarah Shoemsmith Berke, Robert E. Cohen, i Henry L. Paulson. 2004. „Poly-Ubiquitin Binding by the Polyglutamine Disease Protein Ataxin-3 Links Its Normal Function to Protein Surveillance Pathways *". *Journal of Biological Chemistry* 279 (5): 3605–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310939200>.
- Chai, Yaohui, Stacia L. Koppenhafer, Nancy M. Bonini, i Henry L. Paulson. 1999. „Analysis of the Role of Heat Shock Protein (Hsp) Molecular Chaperones in

- Polyglutamine Disease". *The Journal of Neuroscience* 19 (23): 10338–47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10338.1999>.
- Chai, Yaohui, Stacia L. Koppenhafer, Sarah J. Shoemith, Matthew K. Perez, i Henry L. Paulson. 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): 673–82. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.4.673>.
- Chai, Yaohui, Lizi Wu, James D. Griffin, i Henry L. Paulson. 2001. „The Role of Protein Composition in Specifying Nuclear Inclusion Formation in Polyglutamine Disease *". *Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 44889–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106575200>.
- Chakraborty, Anirban, Nisha Tapryal, Tatiana Venkova, Joy Mitra, Velmarini Vasquez, Altaf H. Sarker, Sara Duarte-Silva, i in. 2020. „Deficiency in classical nonhomologous end-joining–mediated repair of transcribed genes is linked to SCA3 pathogenesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (14): 8154–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917280117>.
- Chali, Farah, Fathia Djelti, Emmanuel Eugene, Mario Valderrama, Catherine Marquer, Patrick Aubourg, Charles Duykaerts, Richard Miles, Nathalie Cartier, i Vincent Navarro. 2015. „Inhibiting Cholesterol Degradation Induces Neuronal Sclerosis and Epileptic Activity in Mouse Hippocampus". *The European Journal of Neuroscience* 41 (10): 1345–55. <https://doi.org/10.1111/ejn.12911>.
- Chan, Ken Y., Min J. Jang, Bryan B. Yoo, Alon Greenbaum, Namita Ravi, Wei-Li Wu, Luis Sánchez-Guardado, i in. 2017. „Engineered AAVs for Efficient Noninvasive Gene Delivery to the Central and Peripheral Nervous Systems". *Nature Neuroscience* 20 (8): 1172–79. <https://doi.org/10.1038/nn.4593>.
- Chatterjee, Arpita, Saikat Saha, Anirban Chakraborty, Anabela Silva-Fernandes, Santi M. Mandal, Andreia Neves-Carvalho, Yongping Liu, i in. 2015. „The Role of the Mammalian DNA End-Processing Enzyme Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Pathogenesis". *PLOS Genetics* 11 (1): e1004749. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004749>.
- Chaves, Elena Posse de, i Vasanthi Narayanaswami. 2008. „Apolipoprotein E and Cholesterol in Aging and Disease in the Brain". *Future Lipidology* 3 (5): 505–30. <https://doi.org/10.2217/17460875.3.5.505>.
- Chen, Zhao, Puzhi Wang, Chunrong Wang, Yun Peng, Xiaocan Hou, Xin Zhou, Tianjiao Li, i in. 2018. „Updated frequency analysis of spinocerebellar ataxia in China". *Brain* 141 (4): e22. <https://doi.org/10.1093/brain/awy016>.
- Chen, Zhijian J., i Lijun J. Sun. 2009. „Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling". *Molecular Cell* 33 (3): 275–86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.014>.
- Chou, An-Hsun, Tu-Hsueh Yeh, Pin Ouyang, Ying-Ling Chen, Si-Ying Chen, i Hung-Li Wang. 2008. „Polyglutamine-Expanded Ataxin-3 Causes Cerebellar Dysfunction of SCA3 Transgenic Mice by Inducing Transcriptional Dysregulation". *Neurobiology of Disease* 31 (1): 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.011>.
- Christine, C W., P A. Starr, P S. Larson, J L. Eberling, W J. Jagust, R A. Hawkins, H F. VanBrocklin, J F. Wright, K S. Bankiewicz, i M J. Aminoff. 2009. „Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease". *Neurology* 73 (20): 1662–69. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181c29356>.

- Collingridge, Graham L., Arturas Volianskis, Neil Bannister, Grace France, Lydia Hanna, Marion Mercier, Patrick Tidball, i in. 2013. „The NMDA Receptor as a Target for Cognitive Enhancement”. *Neuropharmacology* 64 (styczeń): 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.051>.
- Colomer Gould, Veronica F., Daniel Goti, Donna Pearce, Guillermo A. Gonzalez, Hong Gao, Mario Bermudez de Leon, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland, Christopher A. Ross, i Dale R. Brown. 2007. „A Mutant Ataxin-3 Fragment Results From Processing at a Site N-terminal to Amino Acid 190 in Brain of Machado-Joseph Disease-Like Transgenic Mice”. *Neurobiology of disease* 27 (3): 362–69. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.06.005>.
- Conceição, Mariana, Liliana Mendonça, Clévio Nóbrega, Célia Gomes, Pedro Costa, Hirokazu Hirai, João Nuno Moreira, Maria C. Lima, N. Manjunath, i Luís Pereira de Almeida. 2016. „Intravenous Administration of Brain-Targeted Stable Nucleic Acid Lipid Particles Alleviates Machado-Joseph Disease Neurological Phenotype”. *Biomaterials* 82 (marzec): 124–37. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.021>.
- Connor, B., Y. Sun, D. von Hieber, S. K. Tang, K. S. Jones, i C. Maucksch. 2016. „AAV 1/2 -Mediated BDNF Gene Therapy in a Transgenic Rat Model of Huntington’s Disease”. *Gene Therapy* 23 (3): 283–95. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.113>.
- Cook, Anna A., Eviatar Fields, i Alanna J. Watt. 2021. „Losing the Beat: Contribution of Purkinje Cell Firing Dysfunction to Disease, and Its Reversal”. *Neuroscience*, In Memoriam: Masao Ito—A Visionary Neuroscientist with a Passion for the Cerebellum, 462 (maj): 247–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.008>.
- Costa, Maria do Carmo, i Henry L. Paulson. 2012. „Toward Understanding Machado–Joseph Disease”. *Progress in Neurobiology*, The Neurotoxicity of Mutant Proteins, 97 (2): 239–57. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.006>.
- D’Abreu, Anelyssa, Marcondes França Jr, Simone Appenzeller, Iscia Lopes-Cendes, i Fernando Cendes. 2009. „Axonal Dysfunction in the Deep White Matter in Machado-Joseph Disease”. *Journal of Neuroimaging* 19 (1): 9–12. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6569.2008.00260.x>.
- D’Abreu, Anelyssa, Marcondes C França, Henry L Paulson, i Iscia Lopes-Cendes. 2010. „Caring for Machado-Joseph Disease: current understanding and how to help patients”. *Parkinsonism & related disorders* 16 (1): 2. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.08.012>.
- Dachet, Fabien, James B. Brown, Tibor Valyi-Nagy, Kunwar D. Narayan, Anna Serafini, Nathan Boley, Thomas R. Gingeras, Susan E. Celniker, Gayatri Mohapatra, i Jeffrey A. Loeb. 2021. „Selective Time-Dependent Changes in Activity and Cell-Specific Gene Expression in Human Postmortem Brain”. *Scientific Reports* 11 (1): 6078. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85801-6>.
- Dai, Lijun, Li Zou, Lanxia Meng, Guifen Qiang, Mingmin Yan, i Zhentao Zhang. 2021. „Cholesterol Metabolism in Neurodegenerative Diseases: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets”. *Molecular Neurobiology* 58 (5): 2183–2201. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02232-6>.
- Dangouloff, Tamara, i Laurent Servais. 2019. „Clinical Evidence Supporting Early Treatment Of Patients With Spinal Muscular Atrophy: Current Perspectives”. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 15 (październik): 1153–61. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S172291>.
- Davidson, Beverly L., Colleen S. Stein, Jason A. Heth, Inês Martins, Robert M. Kotin, Todd A. Derksen, Joseph Zabner, Abdi Ghodsi, i John A. Chiorini. 2000.

- „Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (7): 3428–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3428>.
- De Zeeuw, Chris I., Stephen G. Lisberger, i Jennifer L. Raymond. 2021. „Diversity and Dynamism in the Cerebellum”. *Nature Neuroscience* 24 (2): 160–67. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00754-9>.
- Deacon, Robert M. J. 2013. „Measuring Motor Coordination in Mice”. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, nr 75 (maj): e2609. <https://doi.org/10.3791/2609>.
- Diallo, Alhassane, Heike Jacobi, Arron Cook, Robyn Labrum, Alexandra Durr, Alexis Brice, Perrine Charles, i in. 2018. „Survival in Patients with Spinocerebellar Ataxia Types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): A Longitudinal Cohort Study”. *The Lancet Neurology* 17 (4): 327–34. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30042-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30042-5).
- Dietschy, J. M., i S. D. Turley. 2001. „Cholesterol Metabolism in the Brain”. *Current Opinion in Lipidology* 12 (2): 105–12. <https://doi.org/10.1097/00041433-200104000-00003>.
- Dietschy, John M. 2009. „Central Nervous System: Cholesterol Turnover, Brain Development and Neurodegeneration”. *Biological Chemistry* 390 (4): 287–93. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.035>.
- Dietschy, John M., i Stephen D. Turley. 2004. „Thematic Review Series: Brain Lipids. Cholesterol Metabolism in the Central Nervous System during Early Development and in the Mature Animal”. *Journal of Lipid Research* 45 (8): 1375–97. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200>.
- Ding, Dongxue, Chunrong Wang, Zhao Chen, Kun Xia, Beisha Tang, Rong Qiu, i Hong Jiang. 2020. „Polyglutamine-expanded ataxin3 alter specific gene expressions through changing DNA methylation status in SCA3/MJD”. *Aging (Albany NY)* 13 (3): 3680–98. <https://doi.org/10.18632/aging.202331>.
- Djelti, Fathia, Jerome Braudeau, Eloise Hudry, Marc Dhenain, Jennifer Varin, Ivan Bièche, Catherine Marquer, i in. 2015. „CYP46A1 Inhibition, Brain Cholesterol Accumulation and Neurodegeneration Pave the Way for Alzheimer’s Disease”. *Brain: A Journal of Neurology* 138 (Pt 8): 2383–98. <https://doi.org/10.1093/brain/awv166>.
- Doss-Pepe, Ellen W., Edward S. Stenroos, William G. Johnson, i Kiran Madura. 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* 23 (18): 6469–83. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6469-6483.2003>.
- Duan, Dongsheng. 2016. „Systemic Delivery of Adeno-Associated Viral Vectors”. *Current Opinion in Virology* 21 (grudzień): 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.07.006>.
- Duarte-Silva, Sara, i Patrícia Maciel. 2018. „Pharmacological Therapies for Machado-Joseph Disease”. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1049: 369–94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_19.
- Dürr, A., G. Stevanin, G. Cancel, C. Duyckaerts, N. Abbas, O. Didierjean, H. Chneiweiss, i in. 1996. „Spinocerebellar Ataxia 3 and Machado-Joseph Disease: Clinical, Molecular, and Neuropathological Features”. *Annals of Neurology* 39 (4): 490–99. <https://doi.org/10.1002/ana.410390411>.

- Durr, Alexandra. 2010. „Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias: Polyglutamine Expansions and Beyond”. *The Lancet Neurology* 9 (9): 885–94. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70183-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70183-6).
- Eberling, J. L., W. J. Jagust, C. W. Christine, P. Starr, P. Larson, K. S. Bankiewicz, i M. J. Aminoff. 2008. „Results from a Phase I Safety Trial of HAADC Gene Therapy for Parkinson Disease”. *Neurology* 70 (21): 1980–83. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000312381.29287.ff>.
- Emnett, Christine M., Lawrence N. Eisenman, Jayaram Mohan, Amanda A. Taylor, James J. Doherty, Steven M. Paul, Charles F. Zorumski, i Steven Mennerick. 2015. „Interaction between Positive Allosteric Modulators and Trapping Blockers of the NMDA Receptor Channel”. *British Journal of Pharmacology* 172 (5): 1333–47. <https://doi.org/10.1111/bph.13007>.
- Evers, Melvin M., Hoang-Dai Tran, Ioannis Zalachoras, Barry A. Peppers, Onno C. Meijer, Johan T. den Dunnen, Gert-Jan B. van Ommen, Annemieke Aartsma-Rus, i Willeke M. C. van Roon-Mom. 2013. „Ataxin-3 Protein Modification as a Treatment Strategy for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Removal of the CAG Containing Exon”. *Neurobiology of Disease* 58 (październik): 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.04.019>.
- Evert, Bernd O., Julieta Araujo, Ana M. Vieira-Saecker, Rob A. I. de Vos, Sigrid Harendza, Thomas Klockgether, i Ullrich Wüllner. 2006. „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* 26 (44): 11474–86. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2053-06.2006>.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, i C. C. Mello. 1998. „Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*”. *Nature* 391 (6669): 806–11. <https://doi.org/10.1038/35888>.
- Fünfschilling, Ursula, Gesine Saher, Le Xiao, Wiebke Möbius, i Klaus-Armin Nave. 2007. „Survival of Adult Neurons Lacking Cholesterol Synthesis in Vivo”. *BMC Neuroscience* 8 (styczeń): 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-1>.
- Gamba, Paola, Serena Giannelli, Erica Staurengi, Gabriella Testa, Barbara Sottero, Fiorella Biasi, Giuseppe Poli, i Gabriella Leonarduzzi. 2021. „The Controversial Role of 24-S-Hydroxycholesterol in Alzheimer’s Disease”. *Antioxidants* 10 (5): 740. <https://doi.org/10.3390/antiox10050740>.
- Gamba, Paola, Michela Guglielmotto, Gabriella Testa, Debora Monteleone, Chiara Zerbinati, Simona Gargiulo, Fiorella Biasi, i in. 2014. „Up-Regulation of β -Amyloidogenesis in Neuron-like Human Cells by Both 24- and 27-Hydroxycholesterol: Protective Effect of N-Acetyl-Cysteine”. *Aging Cell* 13 (3): 561–72. <https://doi.org/10.1111/accel.12206>.
- Gamba, Paola, Gabriella Leonarduzzi, Elena Tamagno, Michela Guglielmotto, Gabriella Testa, Barbara Sottero, Simona Gargiulo, i in. 2011. „Interaction between 24-Hydroxycholesterol, Oxidative Stress, and Amyloid- β in Amplifying Neuronal Damage in Alzheimer’s Disease: Three Partners in Crime”. *Aging Cell* 10 (3): 403–17. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00681.x>.
- Gamba, Paola, Erica Staurengi, Gabriella Testa, Serena Giannelli, Barbara Sottero, i Gabriella Leonarduzzi. 2019. „A Crosstalk Between Brain Cholesterol Oxidation and Glucose Metabolism in Alzheimer’s Disease”. *Frontiers in Neuroscience* 13: 556. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00556>.

- Gamba, Paola, Gabriella Testa, Simona Gargiulo, Erica Staurengi, Giuseppe Poli, i Gabriella Leonarduzzi. 2015. „Oxidized Cholesterol as the Driving Force behind the Development of Alzheimer’s Disease”. *Frontiers in Aging Neuroscience* 7: 119. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00119>.
- Gao, Rui, Yongping Liu, Anabela Silva-Fernandes, Xiang Fang, Adriana Paulucci-Holthauzen, Arpita Chatterjee, Hang L. Zhang, i in. 2015. „Inactivation of PNKP by Mutant ATXN3 Triggers Apoptosis by Activating the DNA Damage-Response Pathway in SCA3”. *PLOS Genetics* 11 (1): e1004834. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004834>.
- Gardiner, Sarah L., Merel W. Boogaard, Stella Trompet, Renée de Mutsert, Frits R. Rosendaal, Jacobijn Gussekloo, J. Wouter Jukema, Raymund A. C. Roos, i N. Ahmad Aziz. 2019. „Prevalence of Carriers of Intermediate and Pathological Polyglutamine Disease–Associated Alleles Among Large Population-Based Cohorts”. *JAMA Neurology* 76 (6). <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.0423>.
- Genaro-Mattos, Thiago C., Allison Anderson, Luke B. Allen, Zeljka Korade, i Károly Mirnics. 2019. „Cholesterol Biosynthesis and Uptake in Developing Neurons”. *ACS chemical neuroscience* 10 (8): 3671–81. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00248>.
- Gilkes, J. A., M. D. Bloom, i C. D. Heldermon. 2016. „Preferred Transduction with AAV8 and AAV9 via Thalamic Administration in the MPS IIIB Model: A Comparison of Four RAAV Serotypes”. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 6 (marzec): 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.11.006>.
- Goti, Daniel, Scott M. Katzen, Jesse Mez, Noam Kurtis, Jennifer Kiluk, Lea Ben-Haïem, Nancy A. Jenkins, i in. 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* 24 (45): 10266–79. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2734-04.2004>.
- Grasty, Kimberly C., Stephen D. Weeks, i Patrick J. Loll. 2019. „Structural Insights into the Activity and Regulation of Human Josephin-2”. *Journal of Structural Biology: X* 3 (lipiec): 100011. <https://doi.org/10.1016/j.yjsbx.2019.100011>.
- Griffin, Jarred M., Barbara Fackelmeier, Dahna M. Fong, Alexander Mouravlev, Deborah Young, i Simon J. O’Carroll. 2019. „Astrocyte-Selective AAV Gene Therapy through the Endogenous GFAP Promoter Results in Robust Transduction in the Rat Spinal Cord Following Injury”. *Gene Therapy* 26 (5): 198–210. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0075-6>.
- Guyenet, Stephan J., Stephanie A. Furrer, Vincent M. Damian, Travis D. Baughan, Albert R. La Spada, i Gwenn A. Garden. 2010. „A Simple Composite Phenotype Scoring System for Evaluating Mouse Models of Cerebellar Ataxia”. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, nr 39 (maj): 1787. <https://doi.org/10.3791/1787>.
- Haas, Eva, Rana D. Incebacak, Thomas Hentrich, Chrisovalantou Huridou, Thorsten Schmidt, Nicolas Casadei, Yacine Maringer, i in. 2022. „A Novel SCA3 Knock-in Mouse Model Mimics the Human SCA3 Disease Phenotype Including Neuropathological, Behavioral, and Transcriptional Abnormalities Especially in Oligodendrocytes”. *Molecular Neurobiology* 59 (1): 495–522. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02610-8>.
- Han, Haiyong. 2018. „RNA Interference to Knock Down Gene Expression”. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1706: 293–302. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16.

- Hayashi, Masahiro, Katsuji Kobayashi, i Hisakazu Furuta. 2003. „Immunohistochemical Study of Neuronal Intranuclear and Cytoplasmic Inclusions in Machado–Joseph Disease”. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 57 (2): 205–13. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1819.2003.01102.x>.
- Herzog, Laura K., Éva Kevei, Ricardo Marchante, Claudia Böttcher, Christian Bindesbøll, Alf Håkon Lystad, Annika Pfeiffer, i in. 2020. „The Machado-Joseph Disease Deubiquitylase Ataxin-3 Interacts with LC3C/GABARAP and Promotes Autophagy”. *Aging Cell* 19 (1): e13051. <https://doi.org/10.1111/accel.13051>.
- Heverin, Maura, Nenad Bogdanovic, Dieter Lütjohann, Thomas Bayer, Irina Pikuleva, Lionel Bretilon, Ulf Diczfalussy, Bengt Winblad, i Ingemar Björkhem. 2004. „Changes in the Levels of Cerebral and Extracerebral Sterols in the Brain of Patients with Alzheimer’s Disease”. *Journal of Lipid Research* 45 (1): 186–93. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300320-JLR200>.
- Hickman, D.L., J. Johnson, T.H. Vemulapalli, J.R. Crisler, i R. Shepherd. 2017. „Commonly Used Animal Models”. *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students*, 117–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4>.
- Hill, Sandra M., Lidia Wrobel, Avraham Ashkenazi, Marian Fernandez-Estevéz, Keith Tan, Roland W. Bürli, i David C. Rubinsztein. 2021. „VCP/P97 Regulates Beclin-1-Dependent Autophagy Initiation”. *Nature Chemical Biology* 17 (4): 448–55. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00726-x>.
- Hoshino, Chiaki, Ayumu Konno, Nobutake Hosoi, Ryosuke Kaneko, Ryo Mukai, Junichi Nakai, i Hirokazu Hirai. 2021. „GABAergic Neuron-Specific Whole-Brain Transduction by AAV-PHP.B Incorporated with a New GAD65 Promoter”. *Molecular Brain* 14 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00746-1>.
- Huang, Fengzhen, Li Zhang, Zhe Long, Zhao Chen, Xuan Hou, Chunrong Wang, Huirong Peng, i in. 2014. „miR-25 alleviates polyQ-mediated cytotoxicity by silencing ATXN3”. *FEBS letters* 588 (24): 4791–98. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.013>.
- Huang, Xuemei, Nicholas W. Sterling, Guangwei Du, Dongxiao Sun, Christina Stetter, Lan Kong, Yusheng Zhu, i in. 2019. „Brain Cholesterol Metabolism and Parkinson’s Disease”. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 34 (3): 386–95. <https://doi.org/10.1002/mds.27609>.
- Hübener, Jeannette, Franz Vauti, Claudia Funke, Hartwig Wolburg, Yihong Ye, Thorsten Schmidt, Karen Wolburg-Buchholz, i in. 2011. „N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation”. *Brain* 134 (7): 1925–42. <https://doi.org/10.1093/brain/awr118>.
- Hudry, Eloise, Debby Van Dam, Wim Kulik, Peter P. De Deyn, Femke S. Stet, Ornella Ahouansou, Abdellatif Benraiss, i in. 2010. „Adeno-Associated Virus Gene Therapy with Cholesterol 24-Hydroxylase Reduces the Amyloid Pathology before or after the Onset of Amyloid Plaques in Mouse Models of Alzheimer’s Disease”. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (1): 44–53. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.175>.
- Hudry, Eloise, i Luk H. Vandenberghe. 2019. „Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality”. *Neuron* 101 (5): 839–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.017>.
- Hughes, Timothy M., Lewis H. Kuller, Oscar L. Lopez, James T. Becker, Rhobert W. Evans, Kim Sutton-Tyrrell, i Caterina Rosano. 2012. „Markers of Cholesterol Metabolism in the Brain Show Stronger Associations with Cerebrovascular

- Disease than Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 30 (1): 53–61. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111460>.
- Hussain, Ghulam, Jing Wang, Azhar Rasul, Haseeb Anwar, Ali Imran, Muhammad Qasim, Shamaila Zafar, i in. 2019. „Role of Cholesterol and Sphingolipids in Brain Development and Neurological Diseases". *Lipids in Health and Disease* 18 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0965-z>.
- Ichikawa, Y., J. Goto, M. Hattori, A. Toyoda, K. Ishii, S.-Y. Jeong, H. Hashida, i in. 2001. „The Genomic Structure and Expression of MJD, the Machado-Joseph Disease Gene". *Journal of Human Genetics* 46 (7): 413–22. <https://doi.org/10.1007/s100380170060>.
- Invernizzi, Gaetano, Francesco A. Aprile, Antonino Natalello, Andrea Ghisleni, Amanda Penco, Annalisa Relini, Silvia M. Doglia, Paolo Tortora, i Maria E. Regonesi. 2012. „The Relationship between Aggregation and Toxicity of Polyglutamine-Containing Ataxin-3 in the Intracellular Environment of Escherichia Coli". *PLoS One* 7 (12): e51890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051890>.
- Ismail, Muhammad-Al-Mustafa, Laura Mateos, Silvia Maioli, Paula Merino-Serrais, Zeina Ali, Maria Lodeiro, Eric Westman, i in. 2017. „27-Hydroxycholesterol impairs neuronal glucose uptake through an IRAP/GLUT4 system dysregulation". *Journal of Experimental Medicine* 214 (3): 699–717. <https://doi.org/10.1084/jem.20160534>.
- Iyama, Teruaki, i David M. Wilson. 2013. „DNA Repair Mechanisms in Dividing and Non-Dividing Cells". *DNA Repair, Genome maintenance in the Nervous system*, 12 (8): 620–36. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>.
- Jackson, Stephen P., i Jiri Bartek. 2009. „The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease". *Nature* 461 (7267): 1071–78. <https://doi.org/10.1038/nature08467>.
- Joers, James M., Dinesh K. Deelchand, Tianmeng Lyu, Uzay E. Emir, Diane Hutter, Christopher M. Gomez, Khalaf O. Bushara, Lynn E. Eberly, i Gülin Öz. 2018. „Neurochemical Abnormalities in Premanifest and Early Spinocerebellar Ataxias". *Annals of Neurology* 83 (4): 816–29. <https://doi.org/10.1002/ana.25212>.
- Kacher, Radhia, Antonin Lamazière, Nicolas Heck, Vincent Kappes, Coline Mounier, Gaëtan Despres, Yulia Dembitskaya, i in. 2019. „CYP46A1 Gene Therapy Deciphers the Role of Brain Cholesterol Metabolism in Huntington's Disease". *Brain: A Journal of Neurology* 142 (8): 2432–50. <https://doi.org/10.1093/brain/awz174>.
- Kaludov, Nikola, Kevin E. Brown, Robert W. Walters, Joseph Zabner, i John A. Chiorini. 2001. „Adeno-Associated Virus Serotype 4 (AAV4) and AAV5 Both Require Sialic Acid Binding for Hemagglutination and Efficient Transduction but Differ in Sialic Acid Linkage Specificity". *Journal of Virology* 75 (15): 6884–93. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6884-6893.2001>.
- Kandutsch, A. A., i A. E. Russell. 1960. „Preputial Gland Tumor Sterols. 3. A Metabolic Pathway from Lanosterol to Cholesterol". *The Journal of Biological Chemistry* 235 (sierpień): 2256–61.
- Kaplitt, Michael G, Andrew Feigin, Chengke Tang, Helen L Fitzsimons, Paul Mattis, Patricia A Lawlor, Ross J Bland, i in. 2007. „Safety and Tolerability of Gene Therapy with an Adeno-Associated Virus (AAV) Borne GAD Gene for Parkinson's Disease: An Open Label, Phase I Trial". *The Lancet* 369 (9579): 2097–2105. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60982-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60982-9).
- Katsuno, Masahisa, Hirohisa Watanabe, Masahiko Yamamoto, i Gen Sobue. 2014. „Potential Therapeutic Targets in Polyglutamine-Mediated Diseases". *Expert*

- Kazachkova, Nadiya, Mafalda Raposo, Rafael Montiel, Teresa Cymbron, Conceição Bettencourt, Anabela Silva-Fernandes, Sara Silva, Patrícia Maciel, i Manuela Lima. 2013. „Patterns of Mitochondrial DNA Damage in Blood and Brain Tissues of a Transgenic Mouse Model of Machado-Joseph Disease”. *Neurodegenerative Diseases* 11 (4): 206–14. <https://doi.org/10.1159/000339207>.
- Kim, Ji Sun, i Jin Whan Cho. 2015. „Hereditary Cerebellar Ataxias: A Korean Perspective”. *Journal of Movement Disorders* 8 (2): 67–75. <https://doi.org/10.14802/jmd.15006>.
- Klein, Ronald L, Robert D Dayton, Jason B Tatom, Karen M Henderson, i Phillip P Henning. 2008. „AAV8, 9, Rh10, Rh43 Vector Gene Transfer in the Rat Brain: Effects of Serotype, Promoter and Purification Method”. *Molecular Therapy* 16 (1): 89–96. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300331>.
- Klockgether, T., L. Schöls, M. Abele, K. Bürk, H. Topka, F. Andres, G. Amoiridis, i in. 1999. „Age Related Axonal Neuropathy in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease (SCA3/MJD)”. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 66 (2): 222–24. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.222>.
- Klockgether, T., M. Skalej, D. Wedekind, A. R. Luft, D. Welte, J. B. Schulz, M. Abele, i in. 1998. „Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia Type I. MRI-Based Volumetry of Posterior Fossa Structures and Basal Ganglia in Spinocerebellar Ataxia Types 1, 2 and 3”. *Brain: A Journal of Neurology* 121 (Pt 9) (wrzesień): 1687–93. <https://doi.org/10.1093/brain/121.9.1687>.
- Klockgether, Thomas, Caterina Mariotti, i Henry L. Paulson. 2019. „Spinocerebellar Ataxia”. *Nature Reviews Disease Primers* 5 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0074-3>.
- Koeppen, Arnulf H. 2018. „The Neuropathology of Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease”. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1049: 233–41. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_11.
- Korade, Zeljka, i Anne K. Kenworthy. 2008. „Lipid Rafts, Cholesterol, and the Brain”. *Neuropharmacology* 55 (8): 1265–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.019>.
- Kotowska-Zimmer, Anna, Yuliya Ostrovska, i Marta Olejniczak. 2020. „Universal RNAi Triggers for the Specific Inhibition of Mutant Huntingtin, Atrophin-1, Ataxin-3, and Ataxin-7 Expression”. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 19 (marzec): 562–71. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.012>.
- Kotti, Tiina, Daphne D. Head, Charles E. McKenna, i David W. Russell. 2008. „Biphasic Requirement for Geranylgeraniol in Hippocampal Long-Term Potentiation”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (32): 11394–99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805556105>.
- Kotti, Tiina J., Denise M. O. Ramirez, Brad E. Pfeiffer, Kimberly M. Huber, i David W. Russell. 2006. „Brain Cholesterol Turnover Required for Geranylgeraniol Production and Learning in Mice”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (10): 3869–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600316103>.
- Kourkouta, Eleni, Rudie Weij, Anchel González-Barriga, Melissa Mulder, Ruurd Verheul, Sieto Bosgra, Bas Groenendaal, i in. 2019. „Suppression of Mutant Protein Expression in SCA3 and SCA1 Mice Using a CAG Repeat-Targeting Antisense Oligonucleotide”. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 17 (wrzesień): 601–14. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.004>.

- Leoni, V., C. Mariotti, L. Nanetti, E. Salvatore, F. Squitieri, A. R. Bentivoglio, M. Bandettini di Poggio, i in. 2011. „Whole Body Cholesterol Metabolism Is Impaired in Huntington’s Disease”. *Neuroscience Letters* 494 (3): 245–49. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.03.025>.
- Leoni, Valerio. 2009. „Oxysterols as Markers of Neurological Disease--a Review”. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 69 (1): 22–25. <https://doi.org/10.1080/00365510802651858>.
- Leoni, Valerio, Jeffrey D. Long, James A. Mills, Stefano Di Donato, Jane S. Paulsen, i PREDICT-HD study group. 2013. „Plasma 24S-Hydroxycholesterol Correlation with Markers of Huntington Disease Progression”. *Neurobiology of Disease* 55 (lipiec): 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.03.013>.
- Leoni, Valerio, Caterina Mariotti, Sarah J. Tabrizi, Marta Valenza, Edward J. Wild, Susie M. D. Henley, Nicola Z. Hobbs, i in. 2008. „Plasma 24S-Hydroxycholesterol and Caudate MRI in Pre-Manifest and Early Huntington’s Disease”. *Brain: A Journal of Neurology* 131 (Pt 11): 2851–59. <https://doi.org/10.1093/brain/awn212>.
- Leotti, Vanessa B., Jeroen J. de Vries, Camila M. Oliveira, Eduardo P. de Mattos, Gerard J. Te Meerman, Ewout R. Brunt, Harm H. Kampinga, Laura B. Jardim, i Dineke S. Verbeek. 2021. „CAG Repeat Size Influences the Progression Rate of Spinocerebellar Ataxia Type 3”. *Annals of Neurology* 89 (1): 66–73. <https://doi.org/10.1002/ana.25919>.
- Lerer, I., D. Merims, D. Abeliovich, J. Zlotogora, i N. Gadoth. 1996. „Machado-Joseph Disease: Correlation between the Clinical Features, the CAG Repeat Length and Homozygosity for the Mutation”. *European Journal of Human Genetics: EJHG* 4 (1): 3–7. <https://doi.org/10.1159/000472162>.
- Li, Tianjiao, Sandra Martins, Yun Peng, Puzhi Wang, Xiaocan Hou, Zhao Chen, Chunrong Wang, i in. 2018. „Is the High Frequency of Machado-Joseph Disease in China Due to New Mutational Origins?” *Frontiers in Genetics* 9: 740. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00740>.
- Li, Yi, Takanori Yokota, Ryusuke Matsumura, Kazunari Taira, i Hidehiro Mizusawa. 2004. „Sequence-Dependent and Independent Inhibition Specific for Mutant Ataxin-3 by Small Interfering RNA”. *Annals of Neurology* 56 (1): 124–29. <https://doi.org/10.1002/ana.20141>.
- Lieberman, Andrew P., Vikram G. Shakkottai, i Roger L. Albin. 2019. „Polyglutamine Repeats in Neurodegenerative Diseases”. *Annual review of pathology* 14 (styczeń): 1–27. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012857>.
- Lima, Manuela, i Mafalda Raposo. 2018. „Towards the Identification of Molecular Biomarkers of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)/Machado-Joseph Disease (MJD)”. W *Polyglutamine Disorders*, zredagowane przez Clévio Nóbrega i Luís Pereira de Almeida, 309–19. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_16.
- Linnemann, Christoph, Sophie Tezenas du Montcel, Maryla Rakowicz, Tanja Schmitz-Hübsch, Sandra Szymanski, Jose Berciano, Bart P. van de Warrenburg, i in. 2016. „Peripheral Neuropathy in Spinocerebellar Ataxia Type 1, 2, 3, and 6”. *Cerebellum (London, England)* 15 (2): 165–73. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0684-6>.
- Liu, Dan, Mingyang Zhu, Yuqian Zhang, i Yong Diao. 2021. „Crossing the Blood-Brain Barrier with AAV Vectors”. *Metabolic Brain Disease* 36 (1): 45–52. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00630-2>.

- Liu, Hongmei, Xiaoling Li, Guozhu Ning, Shu Zhu, Xiaolu Ma, Xiuli Liu, Chunying Liu, i in. 2016. „The Machado–Joseph Disease Deubiquitinase Ataxin-3 Regulates the Stability and Apoptotic Function of P53”. *PLOS Biology* 14 (11): e2000733. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000733>.
- Loera-Valencia, Raul, Erika Vazquez-Juarez, Alberto Muñoz, Gorka Gerenu, Marta Gómez-Galán, Maria Lindskog, Javier DeFelipe, Angel Cedazo-Minguez, i Paula Merino-Serrais. 2021. „High Levels of 27-Hydroxycholesterol Results in Synaptic Plasticity Alterations in the Hippocampus”. *Scientific Reports* 11 (1): 3736. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83008-3>.
- Loftus, S. K., J. A. Morris, E. D. Carstea, J. Z. Gu, C. Cummings, A. Brown, J. Ellison, i in. 1997. „Murine Model of Niemann-Pick C Disease: Mutation in a Cholesterol Homeostasis Gene”. *Science (New York, N.Y.)* 277 (5323): 232–35. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.232>.
- Lund, Erik G., Chonglun Xie, Tiina Kotti, Stephen D. Turley, John M. Dietschy, i David W. Russell. 2003. „Knockout of the Cholesterol 24-Hydroxylase Gene in Mice Reveals a Brain-Specific Mechanism of Cholesterol Turnover”. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 22980–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303415200>.
- Lütjohann, D., O. Breuer, G. Ahlborg, I. Nennesmo, A. Sidén, U. Diczfalusy, i I. Björkhem. 1996. „Cholesterol Homeostasis in Human Brain: Evidence for an Age-Dependent Flux of 24S-Hydroxycholesterol from the Brain into the Circulation”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18): 9799–9804. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9799>.
- Lütjohann, D., A. Papassotiropoulos, I. Björkhem, S. Locatelli, M. Bagli, R. D. Oehring, U. Schlegel, i in. 2000. „Plasma 24S-Hydroxycholesterol (Cerebrosterol) Is Increased in Alzheimer and Vascular Demented Patients”. *Journal of Lipid Research* 41 (2): 195–98.
- Macedo-Ribeiro, Sandra, Luísa Cortes, Patrícia Maciel, i Ana Luísa Carvalho. 2009. „Nucleocytoplasmic Shuttling Activity of Ataxin-3”. *PLOS ONE* 4 (6): e5834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005834>.
- Maciel, P., C. Gaspar, A. L. DeStefano, I. Silveira, P. Coutinho, J. Radvany, D. M. Dawson, L. Sudarsky, J. Guimarães, i J. E. Loureiro. 1995. „Correlation between CAG Repeat Length and Clinical Features in Machado-Joseph Disease”. *American Journal of Human Genetics* 57 (1): 54–61.
- Madabhushi, Ram, Ling Pan, i Li-Huei Tsai. 2014. „DNA Damage and Its Links to Neurodegeneration”. *Neuron* 83 (2): 266–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.034>.
- Mandel, Ronald J., Fredric P. Manfredsson, Kevin D. Foust, Aaron Rising, Sharon Reimsnider, Kevin Nash, i Corinna Burger. 2006. „Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors as Therapeutic Agents to Treat Neurological Disorders”. *Molecular Therapy* 13 (3): 463–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.11.009>.
- Martier, Raygene, Marina Sogorb-Gonzalez, Janice Stricker-Shaver, Jeannette Hübener-Schmid, Sonay Keskin, Jiri Klima, Lodewijk J. Toonen, i in. 2019. „Development of an AAV-Based MicroRNA Gene Therapy to Treat Machado-Joseph Disease”. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 15 (grudzień): 343–58. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.10.008>.
- Martín, Mauricio G., Frank Pfrieger, i Carlos G. Dotti. 2014. „Cholesterol in Brain Disease: Sometimes Determinant and Frequently Implicated”. *EMBO Reports* 15 (10): 1036–52. <https://doi.org/10.15252/embr.201439225>.

- Marwarha, Gurdeep, i Othman Ghribi. 2015. „Does the Oxysterol 27-Hydroxycholesterol Underlie Alzheimer’s Disease-Parkinson’s Disease Overlap?” *Experimental Gerontology* 68 (sierpień): 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.09.013>.
- Mathiesen, Sophie N., Jasmine L. Lock, Lucia Schoderboeck, Wickliffe C. Abraham, i Stephanie M. Hughes. 2020. „CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.EB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain”. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 19 (grudzień): 447–58. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.10.011>.
- Matos, Carlos A., Luís Pereira de Almeida, i Clévio Nóbrega. 2019. „Machado-Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia Type 3: Lessons from Disease Pathogenesis and Clues into Therapy”. *Journal of Neurochemistry* 148 (1): 8–28. <https://doi.org/10.1111/jnc.14541>.
- Matos, Carlos A., Vítor Carmona, Udaya-Geetha Vijayakumar, Sara Lopes, Patrícia Albuquerque, Mariana Conceição, Rui Jorge Nobre, Clévio Nóbrega, i Luís Pereira de Almeida. 2018. „Gene Therapies for Polyglutamine Diseases”. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1049: 395–438. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_20.
- Mauch, D. H., K. Nägler, S. Schumacher, C. Göritz, E. C. Müller, A. Otto, i F. W. Pfrieger. 2001. „CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol”. *Science (New York, N.Y.)* 294 (5545): 1354–57. <https://doi.org/10.1126/science.294.5545.1354>.
- McLoughlin, Hayley S., Lauren R. Moore, Ravi Chopra, Robert Komlo, Megan McKenzie, Kate G. Blumenstein, Hien Zhao, Holly B. Kordasiewicz, Vikram G. Shakkottai, i Henry L. Paulson. 2018. „Oligonucleotide Therapy Mitigates Disease in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice”. *Annals of Neurology* 84 (1): 64–77. <https://doi.org/10.1002/ana.25264>.
- McMurray, Cynthia T. 2010. „Mechanisms of Trinucleotide Repeat Instability during Human Development”. *Nature Reviews Genetics* 11 (11): 786–99. <https://doi.org/10.1038/nrg2828>.
- Meaney, Steve, Karl Bodin, Ulf Diczfalusy, i Ingemar Björkhem. 2002. „On the Rate of Translocation in Vitro and Kinetics in Vivo of the Major Oxysterols in Human Circulation: Critical Importance of the Position of the Oxygen Function”. *Journal of Lipid Research* 43 (12): 2130–35. <https://doi.org/10.1194/jlr.m200293-jlr200>.
- Meaney, Steve, Moustapha Hassan, Augustinas Sakinis, Dieter Lütjohann, Klaus von Bergmann, Åke Wennmalm, Ulf Diczfalusy, i Ingemar Björkhem. 2001. „Evidence That the Major Oxysterols in Human Circulation Originate from Distinct Pools of Cholesterol: A Stable Isotope Study”. *Journal of Lipid Research* 42 (1): 70–78. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32337-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32337-3).
- Meljon, Anna, Yuqin Wang, i William J. Griffiths. 2014. „Oxysterols in the Brain of the Cholesterol 24-Hydroxylase Knockout Mouse”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (3): 768–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.153>.
- Mendell, Jerry R., Samiah Al-Zaidy, Richard Shell, W. Dave Arnold, Louise R. Rodino-Klapac, Thomas W. Prior, Linda Lowes, i in. 2017. „Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy”. *New England Journal of Medicine* 377 (18): 1713–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>.
- Mittermeyer, Gabriele, Chadwick W. Christine, Kathryn H. Rosenbluth, Suzanne L. Baker, Philip Starr, Paul Larson, Paul L. Kaplan, John Forsayeth, Michael J. Aminoff, i Krystof S. Bankiewicz. 2012. „Long-Term Evaluation of a Phase 1

- Study of AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease". *Human Gene Therapy* 23 (4): 377–81. <https://doi.org/10.1089/hum.2011.220>.
- Mohamed, Amany, Kevan Smith, Elena Posse de Chaves, Amany Mohamed, Kevan Smith, i Elena Posse de Chaves. 2015. *The Mevalonate Pathway in Alzheimer's Disease — Cholesterol and Non-Sterol Isoprenoids. Alzheimer's Disease - Challenges for the Future*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/59904>.
- Moore, Lauren R., Gautam Rajpal, Ian T. Dillingham, Maya Qutob, Kate G. Blumenstein, Danielle Gattis, Gene Hung, Holly B. Kordasiewicz, Henry L. Paulson, i Hayley S. McLoughlin. 2017. „Evaluation of Antisense Oligonucleotides Targeting ATXN3 in SCA3 Mouse Models". *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 7 (czerwiec): 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.005>.
- Morfini, Gerardo, Gustavo Pigino, i Scott T. Brady. 2005. „Polyglutamine Expansion Diseases: Failing to Deliver". *Trends in Molecular Medicine* 11 (2): 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.12.002>.
- Mori, Fumiaki, Kunikazu Tanji, Saori Odagiri, Yasuko Toyoshima, Mari Yoshida, Akiyoshi Kakita, Hitoshi Takahashi, i Koichi Wakabayashi. 2012. „Autophagy-Related Proteins (P62, NBR1 and LC3) in Intranuclear Inclusions in Neurodegenerative Diseases". *Neuroscience Letters* 522 (2): 134–38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.06.026>.
- Most, Peter J. van der, Amalia M. Dolga, Ingrid M. Nijholt, Paul G. M. Luiten, i Ulrich L. M. Eisel. 2009. „Statins: Mechanisms of Neuroprotection". *Progress in Neurobiology* 88 (1): 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.02.002>.
- Moutinho, Miguel, Maria João Nunes, i Elsa Rodrigues. 2016. „Cholesterol 24-Hydroxylase: Brain Cholesterol Metabolism and Beyond". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1861 (12 Pt A): 1911–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.09.011>.
- Mueller, Thorsten, Peter Breuer, Ina Schmitt, Jochen Walter, Bernd O. Evert, i Ullrich Wüllner. 2009. „CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3". *Human Molecular Genetics* 18 (17): 3334–43. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp274>.
- Musatov, Sergei, Jill Roberts, Donald Pfaff, i Michael Kaplitt. 2002. „A cis-Acting Element That Directs Circular Adeno-Associated Virus Replication and Packaging". *Journal of Virology* 76 (24): 12792–802. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12792-12802.2002>.
- Nakai, H., Y. Iwaki, M. A. Kay, i L. B. Couto. 1999. „Isolation of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector-Cellular DNA Junctions from Mouse Liver". *Journal of Virology* 73 (7): 5438–47. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.7.5438-5447.1999>.
- Nakai, Hiroyuki, Sally Fuess, Theresa A. Storm, Shin-ichi Muramatsu, Yuko Nara, i Mark A. Kay. 2005. „Unrestricted Hepatocyte Transduction with Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vectors in Mice". *Journal of Virology* 79 (1): 214–24. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.214-224.2005>.
- Nakano, K. K., D. M. Dawson, i A. Spence. 1972. „Machado Disease. A Hereditary Ataxia in Portuguese Emigrants to Massachusetts". *Neurology* 22 (1): 49–55. <https://doi.org/10.1212/wnl.22.1.49>.
- Nascimento-Ferreira, Isabel, Tiago Santos-Ferreira, Lígia Sousa-Ferreira, Gwennaëlle Auregan, Isabel Onofre, Sandro Alves, Noëlle Dufour, i in. 2011. „Overexpression of the Autophagic Beclin-1 Protein Clears Mutant Ataxin-3 and Alleviates Machado-Joseph Disease". *Brain: A Journal of Neurology* 134 (Pt 5): 1400–1415. <https://doi.org/10.1093/brain/awr047>.

- Naso, Michael F., Brian Tomkowicz, William L. Perry, i William R. Strohl. 2017. „Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy”. *BioDrugs* 31 (4): 317–34. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>.
- Nassief, Abdullah, i James D. Marsh. 2008. „Statin Therapy for Stroke Prevention”. *Stroke* 39 (3): 1042–48. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.501361>.
- Nieweg, Katja, Hubert Schaller, i Frank W. Pfrieger. 2009. „Marked Differences in Cholesterol Synthesis between Neurons and Glial Cells from Postnatal Rats”. *Journal of Neurochemistry* 109 (1): 125–34. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x>.
- Niewiadomska-Cimicka, Anna, Frédéric Doussau, Jean-Baptiste Perot, Michel J. Roux, Celine Keime, Antoine Hache, Françoise Piguët, i in. 2021. „SCA7 Mouse Cerebellar Pathology Reveals Preferential Downregulation of Key Purkinje Cell-Identity Genes and Shared Disease Signature with SCA1 and SCA2”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 41 (22): 4910–36. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1882-20.2021>.
- Nóbrega, Clévio, Liliana Mendonça, Adriana Marcelo, Antonin Lamazière, Sandra Tomé, Gaetan Despres, Carlos A. Matos, i in. 2019. „Restoring Brain Cholesterol Turnover Improves Autophagy and Has Therapeutic Potential in Mouse Models of Spinocerebellar Ataxia”. *Acta Neuropathologica* 138 (5): 837–58. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02019-7>.
- Onodera, O., J. Idezuka, S. Igarashi, Y. Takiyama, K. Endo, H. Takano, M. Oyake, i in. 1998. „Progressive Atrophy of Cerebellum and Brainstem as a Function of Age and the Size of the Expanded CAG Repeats in the MJD1 Gene in Machado-Joseph Disease”. *Annals of Neurology* 43 (3): 288–96. <https://doi.org/10.1002/ana.410430305>.
- Orr, Harry T. 2012. „Cell biology of spinocerebellar ataxia”. *Journal of Cell Biology* 197 (2): 167–77. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105092>.
- Panda, T., Tanmay Basak, i T. Panda. 2011. „Kinetic Mechanisms of Cholesterol Synthesis: A Review”. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 50 (23): 12847–64. <https://doi.org/10.1021/ie200073a>.
- Papassotiropoulos, A., D. Lütjohann, M. Bagli, S. Locatelli, F. Jessen, M. L. Rao, W. Maier, I. Björkhem, K. von Bergmann, i R. Heun. 2000. „Plasma 24S-Hydroxycholesterol: A Peripheral Indicator of Neuronal Degeneration and Potential State Marker for Alzheimer’s Disease”. *Neuroreport* 11 (9): 1959–62. <https://doi.org/10.1097/00001756-200006260-00030>.
- Paul, Steven M., James J. Doherty, Albert J. Robichaud, Gabriel M. Belfort, Brian Y. Chow, Rebecca S. Hammond, Devon C. Crawford, i in. 2013. „The Major Brain Cholesterol Metabolite 24(S)-Hydroxycholesterol Is a Potent Allosteric Modulator of N-Methyl-D-Aspartate Receptors”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (44): 17290–300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2619-13.2013>.
- Paulson, H. L., S. S. Das, P. B. Crino, M. K. Perez, S. C. Patel, D. Gotsdiner, K. H. Fischbeck, i R. N. Pittman. 1997. „Machado-Joseph Disease Gene Product Is a Cytoplasmic Protein Widely Expressed in Brain”. *Annals of Neurology* 41 (4): 453–62. <https://doi.org/10.1002/ana.410410408>.
- Paulson, H. L., M. K. Perez, Y. Trottier, J. Q. Trojanowski, S. H. Subramony, S. S. Das, P. Vig, J. -L. Mandel, K. H. Fischbeck, i R. N. Pittman. 1997. „Intranuclear Inclusions of Expanded Polyglutamine Protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3”. *Neuron* 19 (2): 333–44. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80943-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80943-5).

- Paulson, Henry L., Vikram G. Shakkottai, H. Brent Clark, i Harry T. Orr. 2017. „Polyglutamine spinocerebellar ataxias — from genes to potential treatments”. *Nature reviews. Neuroscience* 18 (10): 613–26. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.92>.
- Penaud-Budloo, Magalie, Achille François, Nathalie Clément, i Eduard Ayuso. 2018. „Pharmacology of Recombinant Adeno-Associated Virus Production”. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 8 (marzec): 166–80. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.01.002>.
- Perez, Matthew K., Henry L. Paulson, Sagun J. Pendse, Sarah J. Saionz, Nancy M. Bonini, i Randall N. Pittman. 1998. „Recruitment and the Role of Nuclear Localization in Polyglutamine-mediated Aggregation”. *Journal of Cell Biology* 143 (6): 1457–70. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.6.1457>.
- Petrosyan, H. A., V. Alessi, V. Singh, A. S. Hunanyan, J. M. Levine, i V. L. Arvanian. 2014. „Transduction Efficiency of Neurons and Glial Cells by AAV-1, -5, -9, -Rh10 and -Hu11 Serotypes in Rat Spinal Cord Following Contusion Injury”. *Gene Therapy* 21 (12): 991–1000. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.74>.
- Petrov, A. M., M. R. Kasimov, i A. L. Zefirov. 2017. „Cholesterol in the Pathogenesis of Alzheimer’s, Parkinson’s Diseases and Autism: Link to Synaptic Dysfunction”. *Acta Naturae* 9 (1): 26–37.
- Pfeiffer, Annika, Martijn S Luijsterburg, Klara Acs, Wouter W Wiegant, Angela Helfricht, Laura K Herzog, Melania Minoia, i in. 2017. „Ataxin-3 consolidates the MDC1-dependent DNA double-strand break response by counteracting the SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4”. *The EMBO Journal* 36 (8): 1066–83. <https://doi.org/10.15252/embj.201695151>.
- Pfriege, Frank W., i Nicole Ungerer. 2011. „Cholesterol Metabolism in Neurons and Astrocytes”. *Progress in Lipid Research* 50 (4): 357–71. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.06.002>.
- Pozzi, Chiara, Marco Valtorta, Gabriella Tedeschi, Elena Galbusera, Valentina Pastori, Alessandra Bigi, Simona Nonnis, Eleonora Grassi, i Paola Fusi. 2008. „Study of Subcellular Localization and Proteolysis of Ataxin-3”. *Neurobiology of Disease* 30 (2): 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.01.011>.
- Pril, Remko de, David F. Fischer, Marion L.C. Maat-Schieman, Barbara Hobo, Rob A.I. de Vos, Ewout R. Brunt, Elly M. Hol, Raymund A.C. Roos, i Fred W. van Leeuwen. 2004. „Accumulation of aberrant ubiquitin induces aggregate formation and cell death in polyglutamine diseases”. *Human Molecular Genetics* 13 (16): 1803–13. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh188>.
- Rafii, Michael S., Tiffany L. Baumann, Roy A. E. Bakay, Jeffrey M. Ostrove, Joao Siffert, Adam S. Fleisher, Christopher D. Herzog, i in. 2014. „A Phase I Study of Stereotactic Gene Delivery of AAV2-NGF for Alzheimer’s Disease”. *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association* 10 (5): 571–81. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.09.004>.
- Ramani, Biswarathan, Ginny M. Harris, Rogerio Huang, Takahiro Seki, Geoffrey G. Murphy, Maria do Carmo Costa, Svetlana Fischer, i in. 2017. „A Knockin Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 3 Exhibits Prominent Aggregate Pathology and Aberrant Splicing of the Disease Gene Transcript”. *Human Molecular Genetics* 26 (16): 3232–33. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx176>.
- Ramani, Biswarathan, Ginny M. Harris, Rogerio Huang, Takahiro Seki, Geoffrey G. Murphy, Maria do Carmo Costa, Svetlana Fischer, i in. 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* 24 (5): 1211–24. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu532>.
- Ramirez, Denise M. O., Stefan Andersson, i David W. Russell. 2008. „Neuronal Expression and Subcellular Localization of Cholesterol 24-Hydroxylase in the Mouse Brain". *The Journal of Comparative Neurology* 507 (5): 1676–93. <https://doi.org/10.1002/cne.21605>.
- Ravikumar, Brinda, Rainer Duden, i David C. Rubinsztein. 2002. „Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy". *Human Molecular Genetics* 11 (9): 1107–17. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1107>.
- Rebeck, G. W., J. S. Reiter, D. K. Strickland, i B. T. Hyman. 1993. „Apolipoprotein E in Sporadic Alzheimer's Disease: Allelic Variation and Receptor Interactions". *Neuron* 11 (4): 575–80. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90070-8).
- Reina, Christopher P., Xiaoyan Zhong, i Randall N. Pittman. 2010. „Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3". *Human Molecular Genetics* 19 (2): 235–49. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp482>.
- Riess, Olaf, Udo Rüb, Annalisa Pastore, Peter Bauer, i Ludger Schöls. 2008. „SCA3: Neurological Features, Pathogenesis and Animal Models". *Cerebellum (London, England)* 7 (2): 125–37. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0013-4>.
- Rinaldi, Carlo, i Matthew J. A. Wood. 2018. „Antisense Oligonucleotides: The next Frontier for Treatment of Neurological Disorders". *Nature Reviews Neurology* 14 (1): 9–21. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148>.
- Rodrigues, Filipe B., i Edward J. Wild. 2020. „Huntington's Disease Clinical Trials Corner: April 2020". *Journal of Huntington's Disease* 9 (2): 185–97. <https://doi.org/10.3233/JHD-200002>.
- Rüb, U., E. R. Brunt, E. Petrasch-Parwez, L. Schöls, D. Theegarten, G. Auburger, K. Seidel, i in. 2006. „Degeneration of Ingestion-Related Brainstem Nuclei in Spinocerebellar Ataxia Type 2, 3, 6 and 7". *Neuropathology and Applied Neurobiology* 32 (6): 635–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00772.x>.
- Rüb, Udo, Ewout R. Brunt, i Thomas Deller. 2008. „New Insights into the Pathoanatomy of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (Machado-Joseph Disease)". *Current Opinion in Neurology* 21 (2): 111–16. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3282f7673d>.
- Rüb, Udo, Ludger Schöls, Henry Paulson, Georg Auburger, Pawel Kermer, Joanna C. Jen, Kay Seidel, Horst-Werner Korf, i Thomas Deller. 2013. „Clinical Features, Neurogenetics and Neuropathology of the Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias Type 1, 2, 3, 6 and 7". *Progress in Neurobiology* 104 (maj): 38–66. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.01.001>.
- Saeedi Saravi, Seyed Soheil, Seyed Sobhan Saeedi Saravi, Alireza Arefidoust, i Ahmad Reza Dehpour. 2017. „The Beneficial Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors in the Processes of Neurodegeneration". *Metabolic Brain Disease* 32 (4): 949–65. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0021-5>.
- Sánchez, Ivelisse, Christian Mahlke, i Junying Yuan. 2003. „Pivotal Role of Oligomerization in Expanded Polyglutamine Neurodegenerative Disorders". *Nature* 421 (6921): 373–79. <https://doi.org/10.1038/nature01301>.
- Sazani, Peter, i Ryszard Kole. 2003. „Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing". *Journal of Clinical Investigation* 112 (4): 481–86. <https://doi.org/10.1172/JCI200319547>.
- Schmidt, T., G. B. Landwehrmeyer, I. Schmitt, Y. Trottier, G. Auburger, F. Laccone, T. Klockgether, i in. 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): 669–79. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x>.
- Schmidt, Thorsten, Katrin S. Lindenberg, Antje Krebs, Ludger Schöls, Franco Laccone, Jochen Herms, Martin Rechsteiner, Olaf Riess, i G. Bernhard Landwehrmeyer. 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): 302–10. <https://doi.org/10.1002/ana.10101>.
- Schmitt, Ina, Marion Linden, Hassan Khazneh, Bernd O. Evert, Peter Breuer, Thomas Klockgether, i Ullrich Wuellner. 2007. „Inactivation of the Mouse Atxn3 (Ataxin-3) Gene Increases Protein Ubiquitination”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (3): 734–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.062>.
- Schöls, L., G. Amoiridis, T. Büttner, H. Przuntek, J. T. Epplen, i O. Riess. 1997. „Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia: Phenotypic Differences in Genetically Defined Subtypes?” *Annals of Neurology* 42 (6): 924–32. <https://doi.org/10.1002/ana.410420615>.
- Schöls, Ludger, Peter Bauer, Thorsten Schmidt, Thorsten Schulte, i Olaf Riess. 2004. „Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias: Clinical Features, Genetics, and Pathogenesis”. *The Lancet Neurology* 3 (5): 291–304. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00737-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00737-9).
- Seidel, K., M. Meister, G. J. Dugbartey, M. P. Zijlstra, J. Vinet, E. R. P. Brunt, F. W. van Leeuwen, U. Rüb, H. H. Kampinga, i W. F. A. den Dunnen. 2012. „Cellular Protein Quality Control and the Evolution of Aggregates in Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)”. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38 (6): 548–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01220.x>.
- Seidel, K., S. Siswanto, M. Fredrich, M. Bouzrou, E. R. Brunt, F. W. van Leeuwen, H. H. Kampinga, H. -W. Korf, U. Rüb, i W. F. A. den Dunnen. 2016. „Polyglutamine Aggregation in Huntington’s Disease and Spinocerebellar Ataxia Type 3: Similar Mechanisms in Aggregate Formation”. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 42 (2): 153–66. <https://doi.org/10.1111/nan.12253>.
- Seidel, Kay, Wilfred F. A. den Dunnen, Christian Schultz, Henry Paulson, Stefanie Frank, Rob A. de Vos, Ewout R. Brunt, Thomas Deller, Harm H. Kampinga, i Udo Rüb. 2010. „Axonal Inclusions in Spinocerebellar Ataxia Type 3”. *Acta Neuropathologica* 120 (4): 449–60. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0717-7>.
- Sequeiros, J., i P. Coutinho. 1993. „Epidemiology and Clinical Aspects of Machado-Joseph Disease”. *Advances in Neurology* 61: 139–53.
- Shankaran, Mahalakshmi, Eleonora Di Paolo, Valerio Leoni, Claudio Caccia, Costanza Ferrari Bardile, Hussein Mohammed, Stefano Di Donato, i in. 2017. „Early and Brain Region-Specific Decrease of de Novo Cholesterol Biosynthesis in Huntington’s Disease: A Cross-Validation Study in Q175 Knock-in Mice”. *Neurobiology of Disease* 98 (luty): 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.11.013>.
- Shen, Fanxia, Espen J Walker, Lidan Jiang, Vincent Degos, Jianping Li, Baoliang Sun, Fransisca Heriyanto, William L Young, i Hua Su. 2011. „Coexpression of Angiopoietin-1 with VEGF Increases the Structural Integrity of the Blood–Brain Barrier and Reduces Atrophy Volume”. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31 (12): 2343–51. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.97>.
- Sherafat, Rosa. b.d. „Toxicity Risks of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors for Gene Therapy (GT)”, 47.

- Silva-Fernandes, Anabela, Maria do Carmo Costa, Sara Duarte-Silva, Pedro Oliveira, Claudia M. Botelho, Luís Martins, José António Mariz, i in. 2010. „Motor Uncoordination and Neuropathology in a Transgenic Mouse Model of Machado–Joseph Disease Lacking Intranuclear Inclusions and Ataxin-3 Cleavage Products”. *Neurobiology of Disease*, Special issue: Non-mammalian models of neuropsychiatric disease, 40 (1): 163–76. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.021>.
- Singh, Abhay Narayan, Judith Oehler, Ignacio Torrecilla, Susan Kilgas, Shudong Li, Bruno Vaz, Claire Guérillon, i in. 2019. „The p97–Ataxin 3 complex regulates homeostasis of the DNA damage response E3 ubiquitin ligase RNF8”. *The EMBO Journal* 38 (21): e102361. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102361>.
- Sobue, G., M. Doyu, N. Nakao, N. Shimada, T. Mitsuma, H. Maruyama, S. Kawakami, i S. Nakamura. 1996. „Homozygosity for Machado-Joseph Disease Gene Enhances Phenotypic Severity”. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 60 (3): 354–56. <https://doi.org/10.1136/jnnp.60.3.354-a>.
- Sodero, Alejandro O. 2021. „24S-Hydroxycholesterol: Cellular Effects and Variations in Brain Diseases”. *Journal of Neurochemistry* 157 (4): 899–918. <https://doi.org/10.1111/jnc.15228>.
- Sodero, Alejandro O., Laura Trovò, Francesca Iannilli, Paul Van Veldhoven, Carlos G. Dotti, i Mauricio G. Martin. 2011. „Regulation of Tyrosine Kinase B Activity by the Cyp46/Cholesterol Loss Pathway in Mature Hippocampal Neurons: Relevance for Neuronal Survival under Stress and in Aging”. *Journal of Neurochemistry* 116 (5): 747–55. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07079.x>.
- Sodero, Alejandro O., Joris Vriens, Debapriya Ghosh, David Stegner, Anna Brachet, Marta Pallotto, Marco Sassoè-Pognetto, i in. 2012. „Cholesterol Loss during Glutamate-Mediated Excitotoxicity”. *The EMBO Journal* 31 (7): 1764–73. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.31>.
- Solomon, Alina, Valerio Leoni, Miia Kivipelto, Ariadna Besga, Anne Rita Oksengård, Per Julin, Leif Svensson, i in. 2009. „Plasma Levels of 24S-Hydroxycholesterol Reflect Brain Volumes in Patients without Objective Cognitive Impairment but Not in Those with Alzheimer’s Disease”. *Neuroscience Letters* 462 (1): 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.073>.
- Souza, G. N., N. Kersting, A. C. Krum-Santos, A. S. P. Santos, G. V. Furtado, D. Pacheco, T. A. Gonçalves, i in. 2016. „Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease: Segregation Patterns and Factors Influencing Instability of Expanded CAG Transmissions”. *Clinical Genetics* 90 (2): 134–40. <https://doi.org/10.1111/cge.12719>.
- Sowa, Anna Sergeevna, Elodie Martin, Inês Morgado Martins, Jana Schmidt, Reinhard Depping, Jonasz Jeremiasz Weber, Franziska Rother, i in. 2018. „Karyopherin α -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* 115 (11): E2624–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716071115>.
- Stoyas, Colleen A., i Albert R. La Spada. 2018. „Chapter 11 - The CAG–Polyglutamine Repeat Diseases: A Clinical, Molecular, Genetic, and Pathophysiologic Nosology”. W *Handbook of Clinical Neurology*, zredagowane przez Daniel H. Geschwind, Henry L. Paulson, i Christine Klein, 147:143–70. Neurogenetics, Part I. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00011-7>.

- Suga, Noriaki, Masahisa Katsuno, Haruki Koike, Haruhiko Banno, Keisuke Suzuki, Atsushi Hashizume, Tomoo Mano, i in. 2014. „Schwann Cell Involvement in the Peripheral Neuropathy of Spinocerebellar Ataxia Type 3”. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40 (5): 628–39. <https://doi.org/10.1111/nan.12055>.
- Sun, Min-Yu, Andrew J. Linsenhardt, Christine M. Emmett, Lawrence N. Eisenman, Yukitoshi Izumi, Charles F. Zorumski, i Steve Mennerick. 2016. „24(S)-Hydroxycholesterol as a Modulator of Neuronal Signaling and Survival”. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 22 (2): 132–44. <https://doi.org/10.1177/1073858414568122>.
- Switonski, Pawel M., Wojciech J. Szlachcic, Włodzimierz J. Krzyzosiak, i Maciej Figiel. 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* 73 (styczeń): 174–88. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.020>.
- Takahashi, Junko, Junichi Tanaka, Kimihito Arai, Nobuaki Funata, Takamichi Hattori, Takahiro Fukuda, Hiroto Fujigasaki, i Toshiki Uchihara. 2001. „Recruitment of Nonexpanded Polyglutamine Proteins to Intranuclear Aggregates in Neuronal Intranuclear Hyaline Inclusion Disease”. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 60 (4): 369–76. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.4.369>.
- Takahashi, Kazutoshi, i Shinya Yamanaka. 2006. „Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors”. *Cell* 126 (4): 663–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Takahashi, Toshiaki, Shinichi Katada, i Osamu Onodera. 2010. „Polyglutamine Diseases: Where does Toxicity Come from? What is Toxicity? Where are We Going?”. *Journal of Molecular Cell Biology* 2 (4): 180–91. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq005>.
- Takano, H., G. Cancel, T. Ikeuchi, D. Lorenzetti, R. Mawad, G. Stevanin, O. Didierjean, i in. 1998. „Close Associations between Prevalences of Dominantly Inherited Spinocerebellar Ataxias with CAG-Repeat Expansions and Frequencies of Large Normal CAG Alleles in Japanese and Caucasian Populations”. *The American Journal of Human Genetics* 63 (4): 1060–66. <https://doi.org/10.1086/302067>.
- Tanguy, Yannick, Maria Grazia Biferi, Aurore Besse, Stéphanie Astord, Mathilde Cohen-Tannoudji, Thibaut Marais, i Martine Barkats. 2015. „Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8: 36. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00036>.
- Tardieu, Marc, Michel Zérah, Béatrice Husson, Stéphanie de Bournonville, Kumaran Deiva, Catherine Adamsbaum, Fanny Vincent, i in. 2014. „Intracerebral Administration of Adeno-Associated Viral Vector Serotype Rh.10 Carrying Human SGSH and SUMF1 cDNAs in Children with Mucopolysaccharidosis Type IIIA Disease: Results of a Phase I/II Trial”. *Human Gene Therapy* 25 (6): 506–16. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.238>.
- Tereshchenko, Alexander V., Jordan L. Schultz, Joel E. Bruss, Vincent A. Magnotta, Eric A. Epping, i Peg C. Nopoulos. 2020. „Abnormal Development of Cerebellar-Striatal Circuitry in Huntington Disease”. *Neurology* 94 (18): e1908–15. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009364>.
- Tervo, D. Gowanlock R., Bum-Yeol Hwang, Sarada Viswanathan, Thomas Gaj, Maria Lavzin, Kimberly D. Ritola, Sarah Lindo, i in. 2016. „A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons”. *Neuron* 92 (2): 372–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.021>.

- Timmers, Adrian M., Judith A. Newmark, Heikki T. Turunen, Tanaz Farivar, Jilin Liu, Chunjuan Song, Guo-jie Ye, i in. 2020. „Ocular Inflammatory Response to Intravitreal Injection of Adeno-Associated Virus Vector: Relative Contribution of Genome and Capsid”. *Human Gene Therapy* 31 (1–2): 80–89. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.144>.
- Todd, Peter K., Seok Yoon Oh, Amy Krans, Fang He, Chantal Sellier, Michelle Frazer, Abigail J. Renoux, i in. 2013. „CGG Repeat-Associated Translation Mediates Neurodegeneration in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome”. *Neuron* 78 (3): 440–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.026>.
- Toonen, Lodewijk J. A., Maurice Overzier, Melvin M. Evers, Leticia G. Leon, Sander A. J. van der Zeeuw, Hailiang Mei, Szymon M. Kielbasa, i in. 2018. „Transcriptional Profiling and Biomarker Identification Reveal Tissue Specific Effects of Expanded Ataxin-3 in a Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mouse Model”. *Molecular Neurodegeneration* 13 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0261-9>.
- Toonen, Lodewijk J. A., Frank Rigo, Haico van Attikum, i Willeke M. C. van Roon-Mom. 2017. „Antisense Oligonucleotide-Mediated Removal of the Polyglutamine Repeat in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice”. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 8 (wrzesień): 232–42. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.019>.
- Toonen, Lodewijk J. A., Iris Schmidt, Martijn S. Luijsterburg, Haico van Attikum, i Willeke M. C. van Roon-Mom. 2016. „Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon Skipping as a Strategy to Reduce Proteolytic Cleavage of Ataxin-3”. *Scientific Reports* 6 (1): 35200. <https://doi.org/10.1038/srep35200>.
- Trottier, Y., G. Cancel, I. An-Gourfinkel, Y. Lutz, C. Weber, A. Brice, E. Hirsch, i J. L. Mandel. 1998. „Heterogeneous Intracellular Localization and Expression of Ataxin-3”. *Neurobiology of Disease* 5 (5): 335–47. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0208>.
- Tu, Yingfeng, Xiaoling Li, Xuefei Zhu, Xiaokang Liu, Caixia Guo, Da Jia, i Tie-Shan Tang. 2020. „Determining the Fate of Neurons in SCA3: ATX3, a Rising Decision Maker in Response to DNA Stresses and Beyond”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.619911>.
- Tu, Yingfeng, Hongmei Liu, Xuefei Zhu, Hongyan Shen, Xiaolu Ma, Fengli Wang, Min Huang, i in. 2017. „Ataxin-3 promotes genome integrity by stabilizing Chk1”. *Nucleic Acids Research* 45 (8): 4532–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx095>.
- Uchihara, Toshiki, Hiroto Fujigasaki, Shigeru Koyano, Ayako Nakamura, Saburo Yagishita, i Kiyoshi Iwabuchi. 2001. „Non-Expanded Polyglutamine Proteins in Intranuclear Inclusions of Hereditary Ataxias – Triple-Labeling Immunofluorescence Study”. *Acta Neuropathologica* 102 (2): 149–52. <https://doi.org/10.1007/s004010100364>.
- Ullian, Erik M., Karen S. Christopherson, i Ben A. Barres. 2004. „Role for Glia in Synaptogenesis”. *Glia* 47 (3): 209–16. <https://doi.org/10.1002/glia.20082>.
- Valadez-Barba, Valeria, A. Cota-Coronado, O. R. Hernández-Pérez, Pavel H. Lugo-Fabres, Eduardo Padilla-Camberos, Néstor Fabián Díaz, i N. Emmanuel Díaz-Martínez. 2020. „IPSC for Modeling Neurodegenerative Disorders”. *Regenerative Therapy* 15: 332–39. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.11.006>.
- Vale, J., P. Bugalho, I. Silveira, J. Sequeiros, J. Guimarães, i P. Coutinho. 2010. „Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia: Frequency Analysis and Clinical Characterization of 45 Families from Portugal”. *European Journal of Neurology* 17 (1): 124–28. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02757.x>.

- Valenza, M., M. Marullo, E. Di Paolo, E. Cesana, C. Zuccato, G. Biella, i E. Cattaneo. 2015. „Disruption of Astrocyte-Neuron Cholesterol Cross Talk Affects Neuronal Function in Huntington’s Disease”. *Cell Death and Differentiation* 22 (4): 690–702. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.162>.
- Vance, Jean E. 2012. „Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases”. *Disease Models & Mechanisms* 5 (6): 746–55. <https://doi.org/10.1242/dmm.010124>.
- Vejux, Anne, Amira Namsi, Thomas Nury, Thibault Moreau, i Gérard Lizard. 2018. „Biomarkers of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Current Status and Interest of Oxysterols and Phytosterols”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11: 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00012>.
- Vinatier, Gérald, Jean-Marc Corsi, Bernard Mignotte, i Sébastien Gaumer. 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): 1060–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.071>.
- Wang, C., C.-M. Wang, K. R. Clark, i T. J. Sferra. 2003. „Recombinant AAV Serotype 1 Transduction Efficiency and Tropism in the Murine Brain”. *Gene Therapy* 10 (17): 1528–34. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302011>.
- Wang, Dan, i Guangping Gao. 2014. „State-of-the-Art Human Gene Therapy: Part II. Gene Therapy Strategies and Clinical Applications”. *Discovery Medicine* 18 (98): 151–61.
- Wang, Jingjing, i Liqin Zhang. 2021. „Retrograde Axonal Transport Property of Adeno-Associated Virus and Its Possible Application in Future”. *Microbes and Infection* 23 (8): 104829. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104829>.
- Wei, Xiaofei, Toshiya Nishi, Shinichi Kondou, Haruhide Kimura, i Istvan Mody. 2019. „Preferential Enhancement of GluN2B-Containing Native NMDA Receptors by the Endogenous Modulator 24S-Hydroxycholesterol in Hippocampal Neurons”. *Neuropharmacology* 148 (kwiecień): 11. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.028>.
- Wiatr, Kalina, Łukasz Marczak, Jean-Baptiste Perot, Emmanuel Brouillet, Julien Flament, i Maciej Figiel. 2021. „Broad Influence of Mutant Ataxin-3 on the Proteome of the Adult Brain, Young Neurons, and Axons Reveals Central Molecular Processes and Biomarkers in SCA3/MJD Using Knock-in Mouse Model”. <https://doi.org/10.1101/2021.02.23.432266>.
- Wiatr, Kalina, Piotr Piasecki, Łukasz Marczak, Paweł Wojciechowski, Małgorzata Kurkowiak, Rafał Płoski, Małgorzata Rydzanicz, i in. 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* 56 (12): 8168–8202. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01643-4>.
- Winborn, Brett J., Sue M. Travis, Sokol V. Todi, K. Matthew Scaglione, Ping Xu, Aislinn J. Williams, Robert E. Cohen, Junmin Peng, i Henry L. Paulson. 2008. „The Deubiquitinating Enzyme Ataxin-3, a Polyglutamine Disease Protein, Edits Lys63 Linkages in Mixed Linkage Ubiquitin Chains *”. *Journal of Biological Chemistry* 283 (39): 26436–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803692200>.
- Wright, John W., i Joseph W. Harding. 2013. „The Brain Renin-Angiotensin System: A Diversity of Functions and Implications for CNS Diseases”. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 465 (1): 133–51. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1102-2>.

- Wu, Zhijian, Aravind Asokan, i R. Jude Samulski. 2006. „Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy”. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 14 (3): 316–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.009>.
- Xie, Jinglin Lucy, i Daniel F. Jarosz. 2018. „Mutations, Protein Homeostasis, and Epigenetic Control of Genome Integrity”. *DNA Repair, Cutting-edge Perspectives in Genomic Maintenance V*, 71 (listopad): 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.004>.
- Yamada, M., S. Hayashi, S. Tsuji, i H. Takahashi. 2001. „Involvement of the Cerebral Cortex and Autonomic Ganglia in Machado-Joseph Disease”. *Acta Neuropathologica* 101 (2): 140–44. <https://doi.org/10.1007/s004010000277>.
- Yamanaka, Kazunori, Yoshiro Saito, Tohru Yamamori, Yasuomi Urano, i Noriko Noguchi. 2011. „24(S)-Hydroxycholesterol Induces Neuronal Cell Death through Necroptosis, a Form of Programmed Necrosis”. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (28): 24666–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.236273>.
- Yang, Dan, Longchao Liu, Danming Zhu, Hua Peng, Lishan Su, Yang-Xin Fu, i Liguozhang. 2014. „A Mouse Model for HBV Immunotolerance and Immunotherapy”. *Cellular & Molecular Immunology* 11 (1): 71–78. <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.43>.
- Yang, Hui, Jing-Jing Li, Shuai Liu, Jian Zhao, Ya-Jun Jiang, Ai-Xin Song, i Hong-Yu Hu. 2014. „Aggregation of Polyglutamine-Expanded Ataxin-3 Sequesters Its Specific Interacting Partners into Inclusions: Implication in a Loss-of-Function Pathology”. *Scientific Reports* 4 (1): 6410. <https://doi.org/10.1038/srep06410>.
- Zamecnik, P C, i M L Stephenson. 1978. „Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (1): 280–84.
- Zhang, Hongwei, Bin Yang, Xin Mu, Seemin Seher Ahmed, Qin Su, Ran He, Hongyan Wang, i in. 2011. „Several RAAV Vectors Efficiently Cross the Blood-Brain Barrier and Transduce Neurons and Astrocytes in the Neonatal Mouse Central Nervous System”. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (8): 1440–48. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.98>.
- Zhang, Juan, i Qiang Liu. 2015. „Cholesterol Metabolism and Homeostasis in the Brain”. *Protein & Cell* 6 (4): 254–64. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0131-3>.
- Zhong, Xiaoyan, i Randall N. Pittman. 2006. „Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates”. *Human Molecular Genetics* 15 (16): 2409–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl164>.
- Zhou, Joy, Amanda M. Brown, Elizabeth P. Lackey, Marife Arancillo, Tao Lin, i Roy V. Sillitoe. 2020. „Purkinje Cell Neurotransmission Patterns Cerebellar Basket Cells into Zonal Modules Defined by Distinct Pinceau Sizes”. *ELife* 9 (wrzesień): e55569. <https://doi.org/10.7554/eLife.55569>.
- Zhou, Y. X., Y. Takiyama, S. Igarashi, Y. F. Li, B. Y. Zhou, D. C. Gui, K. Endo, i in. 1997. „Machado-Joseph Disease in Four Chinese Pedigrees: Molecular Analysis of 15 Patients Including Two Juvenile Cases and Clinical Correlations”. *Neurology* 48 (2): 482–85. <https://doi.org/10.1212/WNL.48.2.482>.
- Zuliani, Giovanni, Michela Perrone Donnorso, Cristina Bosi, Angelina Passaro, Edoardo Dalla Nora, Amedeo Zurlo, Francesco Bonetti, Alessia F. Mozzi, i Claudio Cortese. 2011. „Plasma 24S-Hydroxycholesterol Levels in Elderly Subjects with Late Onset Alzheimer’s Disease or Vascular Dementia: A Case-Control Study”. *BMC Neurology* 11 (październik): 121. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-11-121>.

10. Spis wybranych skrótów

24-OHC	24S-hydroksycholesterol
AAV	wektory wirusowych związanych z adenowirusami
ABC	transportery ABC
AD	choroba Alzheimerera
ALS	stwardnienie zanikowe boczne
ApoE	apolipoproteina E
ASO	antysensowe oligonukleotydy
Atg16L	białko autofagii
BBB	bariera krew-mózg
CBP	białka związane z CREB
CHK1	kinaza białkowa
CSF	płyn mózgowo-rdzeniowy
CYP46A1	24-hydroksylaza cholesterolu
DCN	jądra głębokie mózdzku
DDR	system odpowiedzi na uszkodzenia DNA
DRPLA	zanik jądra zębatego, czerwienego, gałki bladej i jądra Luysa
FPP	pirofosforan farnezyłu
GABARAP	Białko związane z receptorem kwasu gamma-aminomasłowego
GGPP	pirofosforan geranylogeranyłu
HD	choroba Huntingtona
HDAC3	deacetylaza histonowa
KR	ścieżka Kandutsch-Russella
LC3	białka związane z mikrotubulami
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości
LDLR	receptor LDL
LRP1	receptor LDL związany z białkiem 1
LTP	długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (
miRNA	mikroRNA
MRI	Rezonans magnetyczny mózgu
mRNA	matcowe RNA
MRS	Spektroskopia rezonansu magnetycznego

MS	stwardnienie rozsiane
NES	sygnały transportu z jądra do cytoplazmy
NLS	sygnał transportu do jądra
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
p62	białko autofagii
PD	choroba Parkinsona
polyQ	choroba poliglutaminowa
PQC	szlak kontroli jakości białek
RAS	układ renina-angiotensyna
RNAi	interferencje RNA
RNF8	ligaza ubikwitynowa ()
SBMA	rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni
SCA	ataksje rdzeniowo-mózdkowe
SCA3/MJD	ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3/choroba Machado-Josepha
shRNA	krótkie RNA o strukturze pętli
siRNA	małe interferujące RNA
UIM	motywy oddziałujące z ubikwityną
UPS	system ubikwityna-proteasom