

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Opracowanie przedklinicznej strategii terapeutycznej choroby
Huntingtona i ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 z wykorzystaniem
wyciszających reagentów RNA celujących w powtórzenia CAG w
transkryptach genów *HTT* i *ATXN3***

Mgr inż. Żaneta Kalinowska-Pośka

Praca wykonana pod opieką promotora
prof. dr hab. Macieja Figła,

oraz promotora pomocniczego
dr inż. Magdaleny Surdyki

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań 2024

Niniejsza rozprawa doktorska powstała w efekcie realizacji projektu badawczego ERA-
NET-E-RARE-3/III/TreatPolyQ/08/2018 finansowanego przez
Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Przeprowadzone badania uzyskały zgodę Lokalnej Komisji Etycznej
w Poznaniu o numerze 64/2018.

Podziękowania kieruję w stronę mojego Pana Promotora, **prof. dr hab. Macieja Figla**, za przekazaną wiedzę, wsparcie i motywację, które były kluczem do realizacji tej pracy.

Dziękuję **dr inż. Magdalenie Surdyce** za nieocenioną motywację, wiedzę i pomoc, bez których niniejsza praca na pewno by nie powstała, nieustanną opiekę, przekazaną wiedzę, a także wsparcie merytoryczne, eksperymentalne i za wszystkie przyjacielskie rady.

Podziękowania kieruję również do całego zespołu z Zakładu Neurobiologii Molekularnej, a szczególnie **dr Ewelinie Jesion** za współtworzenie wspaniałej drużyny i atmosfery, dzięki której wykonanie pracy doktorskiej było pełne przyjemności.

Dziękuję mojemu **Mężowi Aleksandrowi** oraz moim **Rodzicom** za motywację, wsparcie w dążeniu do celu, cierpliwość, oraz za to, że zawsze mogę na Was liczyć.

Spis treści

1. Wykaz publikacji.....	7
2. Streszczenie	8
3. Abstrakt.....	10
4. Wprowadzenie	12
4.1. Choroby poliglutaminowe i ich genetyczna etiologia	12
4.2. Choroba Huntingtona.....	13
4.2.1. Kliniczne objawy HD	14
4.2.2. Genetyka HD	16
4.2.3. Białko huntingtyny	17
4.2.4. Mechanizmy molekularne i komórkowe HD.....	18
4.3. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3.....	20
4.3.1. Kliniczne objawy SCA3	21
4.3.2. Genetyka SCA3	21
4.3.3. Białko ataksyny-3	22
4.3.4. Ogólny mechanizm SCA3	24
4.4. Terapie genowe w chorobach poliglutaminowych.....	25
4.4.1. Terapia genowa oparta na ASO	25
4.4.2. Terapia oparta na RNAi.....	26
4.4.3. Strategia celowania w powtórzenia CAG.....	28
4.4.4. Badania kliniczne w chorobach poliglutaminowych	29
4.5. Modele chorób poliQ.....	30
4.5.1. Zwierzęce bialleliczny model HD Hu ^{128Q/21Q}	30
4.5.2. Zwierzęce bialleliczny model SCA3 Ki ^{150Q/21Q}	32
5. Cel pracy	34
6. Materiały i metody	35
6.1. Materiały.....	35
6.1.1. Konstrukty terapeutyczne	35
6.1.2. Materiał biologiczny	37
6.1.3. Oligonukleotydy	38
6.1.4. Najważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne.....	39
6.1.5. Roztwory i bufony	40
6.1.6. Bufory dostępne komercyjnie.....	42
6.1.7. Zestawy i materiały komercyjne.....	42
6.1.8. Przeciwciała	43
6.1.9. Sprzęt laboratoryjny i materiały trwałe	44
6.1.10. Programy komputerowe i bazy danych	46
6.2. Metody	47
6.2.1. Hodowla.....	47

6.2.2.	Genotypowanie myszy.....	48
6.2.3.	Iniekcje retro-orbitalne	52
6.2.4.	Operacje stereotaktyczne	52
6.2.5.	Ocena fenotypu	53
6.2.6.	Monitorowanie masy ciała myszy oraz waga organów	54
6.2.7.	Pobór tkanek	54
6.2.8.	Biochemia z krwi	54
6.2.9.	PCR w czasie rzeczywistym	55
6.2.10.	Western blotting.....	57
6.2.11.	Barwienia immunofluorescencyjne	59
6.2.12.	Statystyka.....	60
7.	Wyniki	61
7.1.	<i>Walidacja efektywności shRNA celujących w ciąg CAG w eksperymencie krótkoterminowym.....</i>	61
7.1.1.	Ocena dystrybucji po wstrzyknięciu AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA.....	61
7.1.2.	Ocena objawów niepożądanych po wstrzyknięciu AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA	63
7.1.3.	Krótkoterminowe badanie potencjału terapeutycznego wszystkich reagentów	64
7.2.	<i>Badanie długoterminowego potencjału terapeutycznego wybranych reagentów AAV-PHP.eB_A4(P10A) oraz AAV-PHP.eB_A4A4(P10,11A) na mysim modelu chorobowym HD i SCA3</i>	65
7.2.1.	Długoterminowa ocena dystrybucji wybranych reagentów AAV-PHP.eB_shRNA w mózgu mysiego modelu choroby HD i SCA3	66
7.2.2.	Analiza zmiany poziomu ekspresji mRNA <i>HTT</i> w wybranych tkankach mózgowych po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A) mysiego modelu choroby HD	68
7.2.3.	Analiza zmiany poziomu białka <i>HTT</i> w wybranych tkankach mózgowych po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A) mysiego modelu choroby HD.....	68
7.2.4.	Wpływ cząsteczek A4(P10A) i A4(P10,11A) na obniżenie poziomu agregatów <i>HTT</i> w wybranych strukturach mózgu mysiego modelu choroby HD..	71
7.2.5.	Zmiany fenotypowe w mysim modelu HD po retro-orbitalnych iniekcjach reagentami A4(P10A) i A4(P10,11A).....	73
7.2.6.	Ocena wpływu iniekcji A4(P10A) i A4(P10,11A) na tkanki obwodowe w mysim modelu HD	75
7.2.7.	Analiza zmiany poziomu ekspresji mRNA <i>ATXN3</i> w wybranych tkankach mózgowych po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A) mysiego modelu choroby SCA3	76
7.2.8.	Analiza zmiany poziomu białka <i>ATXN3</i> w wybranych tkankach mózgowych po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A) mysiego modelu choroby SCA3	77
7.2.9.	Wpływ cząsteczek A4(P10A) na obniżenie poziomu agregatów <i>ATXN3</i> w wybranych strukturach mózgu mysiego modelu choroby SCA3	80
7.2.10.	Zmiany fenotypowe w mysim modelu SCA3 po iniekcji retro-orbitalnej po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A)	80

7.2.11.	Ocena wpływu iniekcji A4(P10A) na tkanki obwodowe w mysim modelu SCA3	83
7.3.	<i>Efektywności siRNA w chemicznym, biwalentnym formacie po iniekcjach domózgowych</i>	84
7.3.1.	Ocena dystrybucji reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A) po iniekcjach domózgowych w prążkowie	85
7.3.2.	Analiza zmiany poziomu białka HTT w prążkowie po iniekcji domózgowej do prążkowie reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A)	86
7.3.3.	Analiza zmiany poziomu białka ATXN3 w prążkowie po iniekcji domózgowej do prążkowie reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A)	87
7.3.4.	Ocena dystrybucji reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A) po iniekcjach do układu komór	88
7.3.5.	Analiza zmiany poziomu białka ATXN3 w wybranych tkankach mózgowych po iniekcji reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A) do układu komorowego mózgu	89
8.	Dyskusja i perspektywy	91
9.	Wnioski	100
10.	Bibliografia	101
11.	Spis skrótów	118
12.	Załączniki	120
13.	Spis tabel i rysunków	125

1. Wykaz publikacji

- Surdyka M., Jesion E., Niewiadomska-Cimicka A., Trottier Y., **Kalinowska-Pońska Ż.**, Figiel M. (2022). Selective transduction of cerebellar Purkinje and granule neurons using delivery of AAV-PHP.eB and AAVrh10 vectors at axonal terminal locations. *Front. Mol. Neurosci.*, 13 September 2022 Sec. Methods and Model Organisms Volume 15 - 2022 | DOI:10.3389/fnmol.2022.947490
- Joachimiak P., Ciesiołka A., Kozłowska E., Świtoński P., Figura G., Ciołak A., Adamek G., Surdyka M., **Kalinowska-Pońska Ż.**, Figiel M., Caron, NS., Hayden MR., Fiszer A. (2023) Allele-specific quantitation of ATXN3 and HTT transcripts in polyQ disease models. *BMC Biology* volume 21, Article number: 17 (2023) | DOI:10.1186/s12915-023-01515-3
- Niewiadomska-Cimicka A., Fievet L., Surdyka M., Jesion E., Keime C., Singer E., Eisenmann A., **Kalinowska-Pońska Ż.**, Nguyen HHP., Fiszer A., Figiel M., Trottier Y. (2024) AAV-Mediated CAG-Targeting Selectively Reduces Polyglutamine-Expanded Protein and Attenuates Disease Phenotypes in a Spinocerebellar Ataxia Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25(8), 4354 | DOI:10.3390/ijms25084354

Prezentowana rozprawa jest częścią manuskryptu eksperymentalnego w trakcie publikacji:

- Surdyka M.*, **Kalinowska-Pońska Ż.***, Niewiadomska-Cimicka A., Jesion E., Fiszer A., Singer-Mikosch E., Fievet L., Przybyl L., Caron NS., Hayden MR., Nguyen HP., Trottier Y., Figiel M. CAG-targeted brain-permeable therapy tested in biallelic humanized polyQ mouse models

2. Streszczenie

Choroby poliglutaminowe (poliQ) należą do grupy 9 rzadkich chorób genetycznych tj. choroba Huntingtona (HD), ataksje rdzeniowo-mózdkowe (SCA) typu 1, 2, 3, 6, 7, 17, zanik czerwienno-zębaty (DRPLA) i rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA). Choroby te są wynikiem mutacji w regionie kodującym genów sprawczych polegającej na ekspansji powtórzeń trójnukleotydowych cytozyna – adenina – guanina (CAG) kodujących nadmiernie wydłużony ciąg glutamin w białku. Pacjenci z chorobami poliglutaminowymi najczęściej posiadają dwa allele danego genu. Jeden allel z prawidłową liczbą (około 5–35), natomiast drugi zmutowany allel ze zwiększoną liczbą (>35) powtórzeń CAG. Częstotliwość występowania chorób poliQ mieści się w przedziale około 1–10 przypadków na 100 000 ludzi. HD (ang. *Huntington's disease*; HD) i SCA3 (ang. *spinocerebellar ataxia type 3*; SCA3) cechują się najwyższym wskaźnikiem występowania na świecie oraz są najlepiej opisane spośród wszystkich chorób poliQ.

W przypadku HD, SCA3 oraz innych chorób poliQ, strategia terapeutyczna celująca w zmutowany ciąg CAG w mRNA może okazać się skutecznym sposobem na obniżenie poziomu patogennego białka. Aby zbadać tę strategię terapeutyczną *in vivo*, zaprojektowano różne reagenty shRNA (ang. *short-hairpin RNA*) oraz siRNA (ang. *small interfering RNA*) odpowiednio w formie wektorowej oraz biwalentnej, ukierunkowane na powtórzenia CAG w mRNA. Humanizowane modele myszy HD (Hu^{128Q/21Q}) i SCA3 (Ki^{150Q/21Q}) ze zmutowanym allelem zawierającym ponad 100 powtórzeń CAG oraz z prawidłowym allelem zawierającym 21 CAG wykorzystano do symulacji warunków biallelicznych u pacjentów. Systemowo, do zatoki oczodołowej podano wektory AAV-PHP.eB zawierające shRNA jako nieinwazyjną terapię przechodzącą przez barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*; BBB). Cząsteczki biwalentne z siRNA podano bezpośrednio do mózgu poprzez iniekcje lokalne.

Pierwszym celem pracy był wybór reagentów do dalszych badań poprzez przeprowadzenie krótkoterminowych eksperymentów oceniających bezpieczeństwo i efektywność zaprojektowanych shRNA. Pozwoliło to wybrać dwa reagenty A4(P10A), A4(P10,11A) cechujące się najniższymi efektami ubocznymi i najefektywniejszym obniżaniem poziomów zmutowanego białka w różnych obszarach mózgu w porównaniu do pozostałych testowanych shRNA. Wybrane shRNA w formie AAV-PHP.eB

postanowiono przetestować w długoterminowych eksperymentach, uwzględniających obserwacje pooperacyjną, ocenę zaburzeń behawioralnych, ewentualnych skutków ubocznych, efektywność obniżania poziomu zmutowanych i prawidłowych białek, ocenę efektu terapeutycznego na poziomie komórkowym (inkluzyje) oraz związany z tym stopień alleloselektywności reagentów. Zaobserwowano, że wektor AAV-PHP.eB zawierający shRNA skutecznie transdukował mózg i jego określone regiony przy braku transdukcji tkanek obwodowych. Skuteczność obniżenia poziomu białek zależała od poziomu transdukcji regionu mózgu. W podejściu wektorowym, opracowano skuteczną transdukcję i dostarczanie reagentów celujących w CAG do mózgu przy użyciu wektorów przekraczających BBB, co jest szczególnie korzystne w terapii poliQ i innych zaburzeń OUN. Drugim testowanym podejściem był cząsteczki biwalentne z siRNA celujące w ciąg CAG, które również efektywnie transdukowały mysz mózgu, skutkując redukcją zmutowanego białka. Jednakże w przypadku tych cząsteczek zarejestrowano nasilone skutki uboczne w modelu HD. Wykazano działanie zastosowanych reagentów biwalentnych *in vivo* na modelach dwóch najczęściej występujących chorób poliglutaminowych, jednakże reagenty te wymagają dalszych badań w celu zminimalizowania efektów niepożądanych.

Podsumowując, pokazano skuteczność podejścia terapeutycznego celującego w ciąg powtórzeń CAG w mRNA zmutowanych genów dla HD i SCA3. Badania pokazują, że podejście to może zostać zastosowane w terapii wielu chorób poliQ. Co więcej reagenty shRNA powodują obniżanie zmutowanego białka poliQ w mózgu, a sposobem ich dostarczania jest mało inwazyjne podanie do krwi i przejście przez barierę-krew mózg co ma niebagatelne znaczenie kliniczne.

3. Abstrakt

Polyglutamine (polyQ) diseases belong to a group of 9 rare genetic diseases, i.e. Huntington's disease (HD), spinal-cerebellar ataxias (SCA) types 1, 2, 3, 6, 7, 17, dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) and spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). These diseases result from a special type of mutation involving the expansion of cytosine-adenine-guanine trinucleotide repeats (CAG) encoding the polyglutamine in the coding region of the causative genes. Patients with polyglutamine diseases most often have one allele with a normal number (around 5-35), while the other is a mutant allele with an increased number (>35) of CAG repeats. The incidence of polyQ diseases is in the range of about 1–10 cases per 100,000 people. HD (Huntington's disease, HD) and SCA3 (spinocerebellar ataxia type 3, SCA3) have the highest incidence rate worldwide and are the best described of all polyQ diseases.

A therapeutic strategy targeting the CAG tract in mRNA may prove to be an effective way to reduce the level of pathogenic protein in the case of HD and SCA3, as well as other polyQ diseases. I designed several different reagents, in vector and bivalent formats respectively, targeting CAG repeats in mRNA to test this therapeutic strategy *in vivo* Humanized HD (Hu^{128Q/21Q}) and SCA3 (Ki^{150Q/21Q}) mouse models with a mutant allele containing more than 100 CAG repeats and a normal allele containing 21 CAG repeats were used to simulate biallelic conditions in patients. AAV-PHP.eB vectors containing shRNA were administered by systemic injections into the orbital sinus as a non-invasive delivery of the therapeutic that passes through the blood-brain barrier (BBB). Bivalent particles with siRNA were administered intracerebrally.

The aim of work was to select reagents for further study by evaluating the safety by short-term post-operative observations and the efficiency of the designed shRNAs by conducting short-term experiments. This allowed to select A4(P10A) and A4(P10,11A) reagents characterized by the lowest side effects and the most effective reduction of mutant protein levels compared to other shRNAs. The selected shRNAs in AAV-PHP.eB were admitted for testing in long-term experiments, consisting of long-term post-operative observations, evaluation of behavioral disorders, possible side effects, efficiency of lowering the levels of mutant and normal proteins, and the associated degree of allele-selectivity of the reagents, evaluation of the therapeutic effect at the cellular level (inclusions). It was observed that the AAV-PHP.eB vector containing shRNA transduced

the brain and its specific regions effectively without peripheral tissue transduction. The efficiency of shRNA in lowering protein levels depended on the brain region transduction rate. The developed vector approach allowed for efficient transduction and delivery of CAG-targeting reagents to the brain over the BBB, which is particularly beneficial in treating polyQ and other CNS disorders. The second approach tested was bivalent molecules with siRNAs targeting the CAG sequence, which also achieved adequate transduction in the mouse brain, resulting in a reduction of the mutant protein; however, increasing side effects in the HD model. The bivalent reagents demonstrated therapeutic potential in the two models of the most common polyglutamine diseases; however, they require further study to minimize adverse effects.

In conclusion, the efficiency of a therapeutic approach targeting a sequence of CAG repeats in the mRNAs of mutant genes for HD and SCA3 is shown. The study shows that this approach can be applied to treating many polyQ diseases. Moreover, the shRNA reagents lower the mutant polyQ protein in the brain and are delivered by minimal invasive blood administration crossing the blood-brain barrier, which is of considerable clinical importance.

4. Wprowadzenie

4.1. Choroby poliglutaminowe i ich genetyczna etiologia

Choroby poliQ to grupa dziewięciu rzadkich i monogenowych zaburzeń neurodegeneracyjnych, do których należą: choroba Huntingtona (HD), zanik czerwiennozębata i rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (DRPLA), ataksje rdzeniowo-mózdkowe typu 1, 2, 3, 6, 7 i 17 (SCA 1, 2, 3, 6, 7 i 17) oraz nerwowo-mięśniowa choroba Kennedy'ego (SBMA). Choroby te są dziedziczone w sposób autosomalnie, dominująco, z wyjątkiem SBMA, którego dziedziczenie jest sprzężone z płcią (Lieberman i in., 2019). Częstotliwość występowania zaburzeń poliQ mieści się w przedziale 1–10 przypadków na 100 000 osób (Fan i in., 2014). HD i SCA3 charakteryzują się największym współczynnikiem występowania na świecie, spośród wszystkich zaburzeń poliQ (Bauer & Nukina, 2009).

Choroby poliQ są wynikiem mutacji zwanej ekspansją polegającej na zwiększeniu liczby powtórzeń trójnukleotydowych cytozyna – adenina – guanina (CAG) kodujących glutaminę. Wydłużona sekwencja CAG tworzą zmutowane białka, które negatywnie wpływają na procesy komórkowe (Bauer & Nukina, 2009; Paulson, 2018). Białka poliQ są nieprawidłowo zwinięte i akumulują się, tworząc agregaty (Bauer & Nukina, 2009; Zoghbi & Orr, 1999). Pacjenci najczęściej posiadają tylko jeden zmutowany allel danego genu, podczas gdy drugi jest prawidłowy. Prawidłowy allel zawiera mniejszą liczbę powtórzeń CAG, która nie przekracza 35 powtórzeń. Allel zmutowany zawiera zwiększoną liczbą powtórzeń CAG zwykle przekraczającą 35 powtórzeń CAG (Warby i in., 2009).

Każda z 9 chorób poliglutaminowych charakteryzuje się posiadaniem innego genu sprawczego, zlokalizowanego w różnych chromosomach oraz indywidualną liczbą powtórzeń progowych (Tab. 1). Choroby te najczęściej pojawiają się u pacjentów w średnim wieku, a towarzyszące im objawy są postępujące i prowadzą do pogorszenia stanu zdrowia, często będąc przyczyną śmierci pacjenta w ciągu 15–20 lat od diagnozy. Wiek diagnozy chorób poliQ często uzależniony jest od długości sekwencji CAG (Fan i in., 2014; Matos i in., 2011).

Tabela 1 Choroby poliQ, ich lokalizacja w genie i białka sprawcze

Choroby poliQ	Lokalizacja	Białko	Rozszerzone powtórzenia CAG	
			Normalna	Patologiczny
SCA1	6p23	ataksyna-1	6-39	41-83
SCA2	12q24	ataksyna-2	14-32	34-77
SCA6	19:13	CACNA1A	4-18	21-30
SCA7	3 s. 21 – s. 12	ataksyna-7	7-18	38-200
SCA17	6q27	białko wiążące element TATA	25-43	45-63
MJD/SCA3	14q24-q31	ataksyna-3	12-40	62-86
HD	4p16.3	huntingtyna	6-35	36-121
DRPLA	12:13	atrofina-1	3-38	49-88
SBMA	Xq11-q12	receptor androgenowy	6-36	38-62

Aktualnie istnieje wiele modeli chorobowych, które wspierają zrozumienie patogenezы chorób poliQ i umożliwiają opracowanie nowych metod ich leczenia. Jednak wciąż brakuje skutecznej terapii na choroby neurodegeneracyjne. Obecnie jedyną dostępną opcją jest leczenie objawowe chorób poliQ, które skupia się na poprawie warunków życia chorego, jednak nie jest w stanie zatrzymać postępującej choroby ani jej cofnąć.

4.2. Choroba Huntingtona

Choroba Huntingtona (ang. *Huntington disease*; HD) to autosomalne, dominujące zaburzenie neurodegeneracyjne, powszechnie znane również jako płasawica Huntingtona. Jest ona wynikiem ekspansji sekwencji trójnukleotydowej CAG w genie huntingtyny (*HTT*). W roku 1842 Waters opublikował pierwsze sprawozdanie dotyczące pacjenta cierpiącego na to schorzenie. Niemniej jednak, dopiero w 1872 roku, po

przedstawieniu precyzyjnego opisu tego stanu chorobowego przez George'a Huntingtona, schorzeniu nadano nazwę płasawicy Huntingtona (Koehler & Jennekens, 2008). W 1983 roku zlokalizowano gen *HTT* na chromosomie 4, poprzez badania i analizy genetyczne rodziny dotkniętej chorobą (Gusella i in., 1983). Natomiast, po 10 latach zespół badaczy w Bostonie zmapował gen *HTT* (Caron i in., 1993; MacDonald i in., 1993). Częstość występowania HD to 2,7 na 100 000 osób na całym świecie (Ajitkumar & De Jesus, 2023). Konsekwentnie zauważa się mniejszą częstość występowania w populacji azjatyckiej, natomiast wyższą w Europie, Ameryce Północnej i Australii. Może być to spowodowane różnicami w haplotypach genu *HTT*, z różnicami w podejściu do rozpoznawania przypadków oraz zastosowanych kryteriów diagnostycznych - różnice te sięgają aż dziesięciokrotności. W społecznościach europejskich występowania choroby Huntingtona waha się od 10 do 13 na 100 000 osób (Ajitkumar & De Jesus, 2023; Bates i in., 2015).

4.2.1. Kliniczne objawy HD

Symptomy choroby Huntingtona zazwyczaj ujawniają się między 30. a 50. rokiem życia. Przez kilka lat przed otrzymaniem diagnozy, są one sporadyczne i mogą pozostać niezauważone przez pacjenta (Sturrock & Leavitt, 2010). Klasyfikuje się je do trzech głównych obszarów: poznawczego, motorycznego i psychiatrycznego (Cattaneo i in., 2005; Roos, 2010; Sturrock & Leavitt, 2010).

Zespół postępujących objawów motorycznych określanych jako ruchy płasawicze jest charakterystyczną cechą obrazu klinicznego choroby Huntingtona. Są to krótkie, mimowolne ruchy, głównie obejmujące tułów, ramiona i twarz. Objawy te utrudniają wykonywanie dobrowolnych i zamierzonych ruchów powodując zaburzenia poruszania się, połykania i mowy. Do innych często występujących symptomów ruchowych w HD należą: dystonia, bradykinezja, spowolnienie ruchy gałek ocznych oraz hiperrefleksja (Caron i in., 1993; Nance, 1998). Podłoże symptomów motorycznych w HD jest powiązane z zaburzeniem modulacji kory ruchowej poprzez sygnały bezpośrednie i pośrednie ze zwojów podstawy prądkowia w mózgu. Szlak bezpośredni dotyczy zmiany białka, która bezpośrednio wpływa na dysfunkcje układu ruchu. Szlak pośredni zawiera złożone interakcje molekularne i komórkowe, które ostatecznie wpływają na neurodegenerację (Matz & Spocter, b.d.). W fazie wczesnej choroby Huntingtona, neurony w szlaku pośrednim nie są proporcjonalnie oraz są bardziej dotknięte niż neurony

w szlaku bezpośrednim. Szlak pośredni zazwyczaj hamuje ruchy mimowolne, uznaje się, że ta nierównowaga przyczynia się do charakterystycznej płasawicy obserwowanej u pacjentów z chorobą Huntingtona. Jednakże, w miarę upływu czasu i postępu choroby, neurony na szlaku bezpośrednim, także zostają dotknięte, co stanowi wyjaśnienie pojawiającej się bradykinezji i sztywności zaobserwowanej u chorych w zaawansowanym stadium (André i in., 2010; Gil & Rego, 2008).

Druga kategorią zaburzeń związanych z HD są zaburzenia poznawcze, które zazwyczaj objawiają się pogorszeniem funkcji wykonawczych, a chorzy mierzą się z trudnościami związanymi z koncentracją, uwagą, podejmowaniem decyzji i wielozadaniowością. Często u pacjentów pojawia się stany depresyjne oraz utrata pamięci (Galts i in., 2019). Możliwe jest także występowanie stanów lękowych, zaburzeń obsesyjnych oraz objawów psychiatrycznych, takich jak urojenia i halucynacje. Najczęściej występuje depresja, drażliwość i zwiększona impulsywność. Ponadto, u pacjentów HD wskaźnik występowania samobójstwa jest wyższy niż w przypadku populacji ogólnej (Alothman i in., 2022). Jako przyczyny objawów poznawczych i psychiatrycznych uznaje się rozregulowanie dopaminergiczne w prążkowie oraz upośledzenie plastyczności synaptycznej w obrębie pętli czołowo-prążkowiowo-limbicznej (Nithianantharajah & Hannan, 2013).

Kolejnym objawem choroby Huntingtona może być często zauważalna utrata wagi, kacheksja, zaburzenia rytmu dobowego i snu (Sturrock & Leavitt, 2010). Udowodniono, że pacjenci z HD, jak i niektóre mysie modele HD, wykazują ujemny bilans energetyczny i stany hipermetaboliczne. Uważa się, że jest to spowodowane wczesną atrofią podwzgórza, której konsekwencją są zaburzenia hormonalne (oreksyny, greliny i somatostatyny) (Goodman i in., 2008; Petersén i in., 2005; Petersén & Björkqvist, 2006).

Młodzieńcza forma choroby Huntingtona

Młodzieńcza choroba Huntingtona występuje u pacjentów, których objawy zaczynają się przed 20. rokiem życia, a liczba powtórzeń CAG wynosi więcej niż 60–70. Zaburzenia motoryczne, poznawcze i psychiatryczne, które są charakterystyczne dla dorosłych pacjentów z HD, występują również w postaci młodzieńczej, lecz ich kliniczny obraz jest odmienny. Najczęściej pierwszymi zauważalnymi objawami u młodych pacjentów są zaburzenia zachowania i trudności w nauce. Hipokinezja i bradykinezję z komponentami

dystonicznymi należą do najczęstszych objawów motorycznych. U młodocianych rzadko występuje płasawica, natomiast często dochodzi do napadów padaczkowych. Wszelkie negatywne zmiany stanu psychicznego, a także objawy mózdkowe związane z opóźnieniem motorycznym, dyzartrią, są charakterystyczne dla młodzieńczej postaci (Bakels i in., 2022; Quarrell i in., 2013).

4.2.2. Genetyka HD

HTT (IT15) jest to duży gen, którego *locus* ma długość 180 tysięcy par zasad (pz), zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 4 (4p16.3) i składa się z 67 eksonów. Mutacja odpowiedzialna za chorobę HD to ekspansja powtórzeń CAG zlokalizowana w eksonie 1 genu *HTT*. Powtórzenie trójki CAG są tłumaczone na odcinek poliQ. Choroba występuje, gdy fragment poliQ przekracza krytyczną długość glutaminy, którą uznaje się jako wartość chorobową (Scherzinger i in., 1999; Waelter i in., 2001).

U większości dorosłych pacjentów HD liczba powtórzeń CAG mieści się w zakresie około 36 do 55. Natomiast, u pacjentów z chorobą o młodzieńczym początku liczba powtórzeń trójek CAG jest zazwyczaj większa niż 60. Im większa liczba powtórzeń CAG w strukturze genu, tym wcześniejszy początek objawów (Reiner i in., 2011). Powtórzenia CAG w genie *HTT* wykazują zwiększoną mozaikowość długości powtórzeń w docelowym obszarze mózgu (Mouro Pinto i in., 2020; Shelbourne i in., 2007; Telenius i in., 1994), co prowadzi do niestabilności somatycznej (Mouro Pinto i in., 2020). Ta niestabilność zależy od długości powtórzeń, a poziomy niestabilności wykazują korelację z podatnością specyficzną dla typu komórki oraz wiekiem wystąpienia choroby (Mouro Pinto i in., 2020; Shelbourne i in., 2007; Swami i in., 2009). Wykazano, że różne polimorfizmy sekwencji powtórzeń DNA mają wpływ na wiek zachorowania. Większość pacjentów z HD ma nieprzerwane powtórzenie CAG kodujące glutaminę, po którym następuje dublet kodonu CAA-CAG kodujący glutaminę (Hong i in., 2021; Shelbourne i in., 2007; Swami i in., 2009). Jednakże rozszerzone powtórzenia CAG mogą być pozbawione przerwania CAA (utrata przerwania; LI) lub zawierać dwa kolejne CAA-CAG (zduplikowane przerwanie; DI). Zaobserwowano, że wiek zachorowania u pacjentów z HD posiadających allele LI lub DI najlepiej świadczy o długości ich nieprzerwanych powtórzeń CAG, a nie długość zakodowanej poliglutaminy (Ciosi i in., 2019; Hong i in., 2021). Wynika z tego, że wprowadzenie przerw CAA do powtórzeń CAG w genie *HTT*, aby zmniejszyć długość nieprzerwanego powtórzenia, może być

potencjalną strategią terapeutyczną opóźniającą początek HD. Niedawno opracowano technologię inżynierii genomu zwaną edycją zasad (BE), umożliwiającą konwersję C do T (edytory zasad cytozynowych; CBE) lub konwersję A do G (edytory zasad adeninowych; ABE), gdzie CBE można potencjalnie wykorzystać do konwersji kodonów CAG na CAA, aby skrócić nieprzerwane powtórzenie CAG bez zmiany długości poliglutaminy lub wprowadzania innych aminokwasów (Gaudelli i in., 2017; Nishida i in., 2016).

Allele pośrednie, o większej liczbie powtórzeń CAG w zakresie 27-35, często wykazują niestabilność i mogą ulegać dalszej ekspansji międzypokoleniowej. To zjawisko może prowadzić do wystąpienia choroby Huntingtona u osób bez rodzinnej historii tej choroby (Semaka i in., 2006). Niestabilność sekwencji powtórzeń CAG w trakcie spermatogenezy u mężczyzn jest znacznie wyższa niż w oogenezie u kobiet, co związane jest z większym ryzykiem ekspansji dla alleli pośrednich przekazywanych potomkom. To zjawisko przyczynia się również do wzrostu liczby przypadków choroby Huntingtona rozpoczynających się w młodym wieku w przypadku dziedziczenia wydłużonego, ale jeszcze nie patogennego allelu w linii ojcowskiej. W linii męskiej występuje zjawisko antycypacji, które spowodowane jest niestabilnością powtórzeń CAG w trakcie spermatogenezy (Savitt & Jankovic, 2019; Stoker i in., 2021). Zjawisko antycypacji polega na, że objawy chorób genetycznych w rodzinie pojawiają się wcześniej i w coraz większym nasileniu (Leotti i in., 2021).

4.2.3. Białko huntingtyny

Huntingtyna to duże białko o strukturze α -helisy o masie 350 kDa. W zależności od liczby powtórzeń składa się z około 3144 aminokwasów (Saudou & Humbert, 2016). Ekson 1 koduje 90 AA *HTT* i początkowy fragment białka huntingtyny, który zawiera N-końcowy segment o 17 aminokwasach (N17) o strukturze α -helikalnej (Gatto i in., 2020; Saudou & Humbert, 2016), której struktura jest istotna dla retencji w siateczce śródplazmatycznej. Funkcjonuje jako sygnał eksportu jądrowego (NES) i podlega modyfikacjom potranslacyjnym (Saudou & Humbert, 2016). N-końcowy region zawiera trakt poliQ oraz sekwencje z obszarów konserwatywnych zwanych HEAT (Huntingtyna, współczynnik wydłużania 3 (EF3)), fosfataza białkowa 2A (PP2A), kinaza drożdżowa TOR1). Obszary HEAT są strukturami odpornymi na rozszczepienie proteolityczne, co umożliwia białku pełnienie roli rusztowania. C-końcowy region zawiera domenę bogatą

w prolinę (PRD). Odpowiada ona za elastyczność struktury oraz interakcje z białkami (Gatto i in., 2020; Saudou & Humbert, 2016). Modyfikacje proteolityczne i potranslacyjne białka występują w obszarach konserwatywnych innych niż HEAT, co prowadzi do zmian konformacyjnych huntingtyny i zmiany interakcji tego białka z innymi (Gatto i in., 2020).

Badania przeprowadzone na wielu modelach komórkowych i modelach zwierzęcych potwierdzają, że ekspansja poliQ w zmutowanym HTT prowadzi do uzyskania nowych toksycznych funkcji i utraty funkcji neuroprotektoryjnych normalnej HTT (Borrell-Pagès i in., 2006). Białko huntingtyny jest przede wszystkim białkiem cytoplazmatycznym, które łączy się z mikrotubulami (MT) i pęcherzykami. Białko to reguluje wewnątrzkomórkowy transport różnych organelli, w tym pęcherzyków, poprzez interakcję ze szlakiem dyneina/dynaktyna (Caviston i in., 2007; Colin i in., 2008; Gauthier i in., 2004). HTT wchodzi w bezpośrednią interakcję z dyneiną (Caviston i in., 2007) i pośrednią poprzez białko związane z Huntingtin-Associated Protein 1 (HAP1). W sytuacjach patologicznych kompleks HTT-HAP1-dynactyna powoduje zmniejszenie transportu pęcherzykowego w neuronach (Gauthier i in., 2004). Odkrycia te pokazują, że HTT integruje transport pęcherzykowy poprzez regulację aktywności specyficznych kompleksów białkowych zawierających kompleksy dyneina/dynaktyna i kinezyne 1 oraz białek adaptorowych, takich jak HAP1.

Białko huntingtyny jest szeroko produkowane w komórkach i tkankach całego organizmu. Najczęściej produkowane jest w mózgu, głównie w prążkowie, korze mózgowej i mózdzku oraz w tkankach obwodowych tj. wątrobie, sercu, nerkach, trzustce, jądrze. Występuje w komórkach mózgowych, przede wszystkim w neuronach, a także w komórkach glejowych (Schulte & Littleton, 2011).

4.2.4. Mechanizmy molekularne i komórkowe HD

Neuropatologia ekscytotoksyczność

W chorobie Huntingtona (HD) kluczową kwestią jest postępująca atrofia jąder podstawy, którą można zaobserwować u chorego kilkanaście lat przed pojawieniem się objawów i diagnozy. W miarę postępu choroby, zanik staje się mniej selektywny, prowadząc ostatecznie do powszechnego zaniku mózgu, ze zmniejszeniem masy mózgu o 200 do 300 g. (Rüb i in., 2012; J. P. Vonsattel & DiFiglia, 1998). Główne obszary dotknięte

atrofią to przede wszystkim prążkowie (jądro ogoniaste i skorupa) oraz kora mózgowa (płaty czołowe, ciemieniowe, skroniowe), hipokamp i mózdzek (Martinez-Horta i in., 2020).

Neurodegeneracja prążkowiec wpływa głównie na populację średnich neuronów kolczastych GABAergicznym, która stanowi około 85% całego prążkowiec. Pozostałe komórki neuronalne prążkowiec, czyli interneurony są stosunkowo wolne od neurodegeneracji w HD (Ehrlich, 2012). Istnieją przypuszczenia, że selektywna degeneracja populacji GABAergicznym (MSN) może być rezultatem ekscytotoksyczności spowodowanej przez receptor N-metylo-D-asparaginowy (NMDA). Komórki MSN otrzymują istotny bodziec pobudzający glutaminergiczny układ z kory za pośrednictwem szlaku korowo-prążkowego. Dodatkowo, komórki MSN wykazują wyższy poziom receptorów NMDA (szczególnie podjednostki NR2B) w porównaniu do interneuronów, co sprawia, że są one bardziej podatne na ekscytotoksyczność (Landwehrmeyer i in., 1995). Zaobserwowano, że ekscytotoksyczność zależna od glutaminianu w HD, jest uwarunkowana upośledzeniem funkcji astrocytów i mikrogleju. W mózgu pacjentów HD zauważono obniżony poziom mRNA astrocytowego transportera glutaminianu (EAAT1) i transportera glutaminianu 1 (GLT1) w prążkowiec. Natomiast, w mikrogleju pacjentów zaobserwowano zwiększoną aktywność szlaku kinureniny. Ten szlak generuje nadmierną ilość 3-hydroksykinureniny (3HK) i kwasu chinolinowego (QA) w HD. QA uważany jest za selektywnego, agonistę receptora NMDA, natomiast 3HK wzmacnia uszkodzenia spowodowane przez QA (Palpagama i in., 2019; Schwarcz i in., 2010).

Dysfunkcja dopaminergiczna

Projekcje dopaminergiczne pomiędzy istotą czarną, a prążkowiec są również zaburzone u pacjentów HD. Badania na mózgach wykazały zwiększone poziomy dopaminy u pacjentów we wczesnym etapie choroby i obniżone w późnym (Garrett & Soares-da-Silva, 1992; Weeks i in., 1996; Yohrling i in., 2003). Zmiany wpływają na szlak nigrostriatalny, skutkujące wczesnym (hiperkinezja) i późnym stadium (akinezja) u chorych na HD. Sugeruje to, że poziomy dopaminy (DA) są dwufazowe w HD (Charvin i in., 2005; J. Y. Chen i in., 2013).

DA wspomaga również powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS), co może skutkować aktywacją proapoptotycznego szlaku kinazy c-Jun N-końcowej (JNK)/c-Jun (poprzez

synergiczną interakcji ze zmutowaną HTT) (Charvin i in., 2005). Aktywacja proapoptotycznego szlaku kinazy c-Jun N-końcowej (JNK)/c-Jun to jeden z mechanizmów, przez który stres oksydacyjny może prowadzić do śmierci komórkowej. W chorobie Huntingtona, zmutowane białko huntingtyna (HTT) może współdziałać z dopaminą, nasilając te szkodliwe efekty (Vidoni i in., 2016). Natomiast, sama dopamina może tworzyć ROS, zmieniając się w kwas 3,4-dihydrofenylooctowy (DOPEC) i nadtlenek wodoru (H₂O₂) (Miyazaki & Asanuma, 2009). Przez co dopamina prowadzi do wzrostu ROS, który może być przyczyną śmierci komórek poprzez nieprawidłowe fałdowanie i agregację białek, lipoperoksydację błon i wyciek organelli. Utleniona dopamina może generować bardzo reaktywne rodniki. Prowadzi to do stresu oksydacyjnego i potencjalnego uszkodzenia komórek. Stres oksydacyjny jest czynnikiem ryzyka dla wielu chorób neurodegeneracyjnych (Miyazaki & Asanuma, 2009).

Rozregulowanie autofagii

HTT może być poddawane degradacji zarówno przez układ ubikwityna-proteasom, jak i przez autofagię. W chorobie Huntingtona obserwuje się zmiany w procesach autofagii (Gómez-Virgilio i in., 2022), która jest kluczowym procesem dla utrzymania zdrowych komórek organizmu. W trakcie postępującej choroby, następuje akumulacja zmutowanego białka HTT, dlatego skuteczne eliminacja agregatów, może być mniej efektywna w podejściach terapeutycznych. W odpowiedzi na źle sfałdowane patogenne białka i nadmiar agregatów dochodzi do aktywacji komórkowych mechanizmów obronnych, takich jak makroautofagia (Martinez-Vicente, 2015; Ravikumar i in., 2004).

4.3. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (ang. *spinocerebellar ataxia type 3*; SCA3), znana również jako choroba Machado-Josepha (ang. *Machado-Joseph Disease*; MJD), jest drugą najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną należącą do grupy chorób poliglutaminowych. Choroba ta wynika z ekspansji powtórzeń trójki nukleotydowej CAG w genie *ATXN3*, kodującej białko ataksyny-3 (ATXN3). SCA3 po raz pierwszy została odkryta i opisana w 1957 roku na podstawie pierwszych zdiagnozowanych przypadków pacjentów pochodzących z Azorów (Coutinho & Andrade, 1978). Obecnie największą częstotliwość zachorowania obserwuje się w Azji Wschodniej, w takich

krajach jak: Chiny, Tajwan i Japonia; oraz Brazylii i Portugalii (Buijsen i in., 2019). SCA3 jest najczęstszą postacią ataksji na świecie (Bettencourt & Lima, 2011).

4.3.1. Kliniczne objawy SCA3

Badania mózgu pacjentów chorych na SCA3 wskazują, że różnią się one od mózgów osób zdrowych. Podstawowym badaniem określającym chorobę SCA3 jest rezonans magnetyczny mózgu. Obraz z tego badania wskazuje, że masa mózgu jest znacząco mniejsza przy zaawansowanej ataksji typu 3 w porównaniu do zdrowych pacjentów (Costa i Paulson 2012). Najczęściej można zaobserwować powiększenie 4 komory mózdzku, wiąże się to z zanikiem rdzenia (Onodera i in. 1998). Ponadto, występuje depigmentacja istoty szarej (Bettencourt & Lima, 2011) oraz degeneracja w mózdzku (w tym głównie robaka i jąder głębokich), jądrach podstawnych (w tym gałki bladej, jądra ogoniastego i skorupy), śródmózgowiu i rdzeniu przedłużonym (Etchebehere i in., 2001; Yoshizawa i in., 2003). Zmiany w mózdzku i pniu mózgu są związane z wiekiem pacjenta i liczbą powtórzeń CAG. Natomiast zanik śródmózgowia poprzez degeneracje tylko niewielkiej istoty czarnej nie wykazuje znaczącej progresji chorobowej, w obrazie całego mózgu (Horimoto i in., 2008). Zaburzenia związane z mózdzkiem związane są w problemami w poruszaniu się pacjenta, natomiast zaburzenia w okolicach pnia mózgu odpowiadają za problemy z mową, przełykaniem oraz widzeniem (Koeppen 2018).

Początkowe symptomy ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3) zazwyczaj pojawiają się u pacjentów w dorosłym wieku, między trzecią a piątą dekadą życia (Rüb i in., 2013). Do pierwszych objawów należy stopniowa utrata równowagi oraz problem z mową. Wraz z upływem czasu mogą pojawić się różnorodne trudności związane ze wzrokiem i układem okoruchowym, takie jak oczopląs, nieregularne i gwałtowne ruchy gałek ocznych oraz oftalmoplegia z opadaniem powiek i wyłupiastymi oczami. W zaawansowanych stadiach choroby pacjenci są zmuszeni korzystać z wózków inwalidzkich, doświadczając ciężkiej dysfagii i dyzartrii, a także możliwego zaniku twarzy i skroni, spastyczności, amiotrofii i dystonii (Costa & Paulson, 2012). Pacjenci chorzy na SCA3 po diagnozie przeżywają około 20-25 lat (Jacobi i in., 2023).

4.3.2. Genetyka SCA3

W 1972 uznano ataksję rdzeniowo-mózdkową typu 3 jako chorobę genetyczną, którą dziedziczy się w stopniu dominującym. Po 11 latach odkryto, że gen *ATXN3*

zlokalizowany jest na chromosomie 14 (14q32.1) (Evers i in., 2014; Schöls i in., 1995). Gen *ATXN3* obejmuje około 48 kpz i składa się z 11 eksonów z powtórzeniami CAG znajdującymi się przy końcu 3' genu w eksonie 10 (Ichikawa i in., 2001). Liczba powtórzeń trójnukleotydowych w genie *ATXN3* u zdrowych osób mieści się w przedziale około 12–44, natomiast u ludzi chorych podnosi się od około 52 do 86 powtórzeń. Liczbę powtórzeń CAG mieszczącą się w przedziale 45–51 koreluje z niepełną penetracją choroby (McLoughlin i in., 2020). Nadzwyczaj rzadkie jest występowanie dwóch zmutowanych alleli u chorych na SCA3. Dużo częściej chorzy posiadają pojedynczy zmutowany allel. Pacjenci ze zdiagnozowanymi przypadkiem homozygotności wykazują cięższą postać choroby oraz szybszy jej początek (Carvalho i in., 2008; Fukutake i in., 2002).

4.3.3. Białko ataksyny-3

Prawidłowe białko ataksyny-3 posiada masę około 42 kDa, natomiast masa zmutowanego białka jest zależna od wielkości powtórzeń poliQ i izoformy (Bettencourt i in., 2010). Białko ataksyny-3 posiada domenę N-końcową typu Josephin, składającą się ze 198 aminokwasów i charakteryzującą się aktywnością proteazy ubikwitynowej, ciąg poliglutaminowy oraz C-końcowy ogon z 2 lub 3 motywami oddziałującymi z ubikwityną (UIM), zależnie od izoformy (Evers i in., 2013; Zeng i in., 2020).

Chociaż translacji może ulec kilka różnych form ataksyny-3 najwięcej informacji jest dostępnych na temat dwóch najważniejszych izoform. Są one białkami o pełnej długości, zawierają ciąg poliQ oraz UIM1 i 2, różnią się końcami C oraz obecnością UIM3. Badania sugerują, że izoforma posiadająca 3UIM *ATXN3* ulega ekspresji w mózgu w sposób dominujący (Martinez-Vicente i in., 2010; Schmidt i in., 1998; Trottier i in., 1998).

Domena Josephin przyjmuje półwydłużoną strukturę w kształcie litery L, złożoną z kulistej katalitycznej subdomeny oraz spiralnej subdomeny podobnej do struktury spinki do włosów (Mao i in., 2005; Nicastro i in., 2005, 2006).

Białko *ATXN3* ulega ekspresji w wielu różnych typach komórek, zarówno w tkankach obwodowych, jak i w tkance nerwowej (Paulson, 2018; Schmidt i in., 1998; Trottier i in., 1998). Ataksyna-3 posiada zdolność przemieszczania się (Chai i in., 2002), jednak głównie zlokalizowana u osób zdrowych jest w cytoplazmie. U pacjentów SCA3

wykazuje skłonność do akumulacji w jądrach komórek nerwowych. ATXN3 wykazuje wysoką ruchliwość zarówno w transporcie do jądra oraz do cytoplazmy. Zawiera sekwencje sygnałowe, które rozpoznawane są przez białka transportowe, ułatwia to przemieszczanie się przez błonę jądrową. Przy transporcie nukleo–cytoplazmatycznym ataksyny częściowo pośredniczy słaby sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), 282RKRR285 i dwa sygnały eksportu jądrowego (NES), NES77 i NES141 (zależnie od CRM1/eksportu) (Antony i in., 2009; Macedo-Ribeiro i in., 2009; Reina i in., 2010).

Lokalizacja wewnątrzkomórkowa ATXN3 podlega także regulacji przez określone stresory proteotoksyczne. Wpływ szoku cieplnego lub stresu oksydacyjnego skutkuje akumulacją ATXN3 w jądrze (Reina i in., 2010).

Rola białka ATXN3 polega głównie na monitorowaniu jakości białek komórkowych, zwłaszcza w kontekście systemu proteasomów ubikwityny (UPS), odpowiedzialnego za rozkład nieprawidłowo sfałdowanych białek. Kontrola poziomu ubikwitynacji wielu białek przez ATXN3 widoczna jest w zwiększeniu całkowitego poziomu ubikwitynowanego białka w mózgu myszy z ATXN3 (Scaglione i in., 2011).

Ataksyna–3 posiada wiele motywów UIM (ang. *ubiquitin-interacting motif*) sąsiadujących z domeną poliglutaminową. UIM są elementami białkowymi, które pośredniczą w przyłączaniu ubikwityny do białek związanych zarówno z tradycyjnymi (czyli proteasomalnymi), jak i nie tradycyjnymi funkcjami szlaków ubikwityny (Hofmann & Falquet, 2001). Jeśli UIM ataksyny–3 ulegną zmutowaniu, zachodzi utrata zdolności do wiązania ubikwityny. Ataksyna–3 preferencyjnie rozpoznaje łańcuchy ubikwityny składające się z co najmniej trzech cząsteczek z wysokim powinowactwem (Chai i in., 2002). Podczas farmakologicznego hamowania proteasomu, szeroki zakres poliubikwitynowanych białek, które gromadzą się w komórkach, łączy się z ataksyną–3 i dochodzi do współstrącenia się z nią (Bowman i in., 2005; Donaldson i in., 2003).

Nadmierna ekspresja ATXN3 w modelach poliQ-neurodegeneracji u *Drosophila* wykazała redukcję toksyczności i zapobiega śmierci komórkowej, co wskazuje, że ATXN3 pełni rolę neuroprotekcyjną. Ponadto, skuteczność jego działania neuroprotekcyjnego zależy zarówno od aktywności DUB, jak i prawidłowego funkcjonowania proteasomu (Warrick i in., 2005).

4.3.4. Ogólny mechanizm SCA3

Wspólnym elementem chorób poliglutaminowych jest obecność inkluzji neuronalnych, które zawierają zmutowane białko (Taylor i in., 2002). To nieprawidłowe białko ma kluczowe znaczenie w patogenezie chorób, do której należy ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (Chai i in., 2002). Agregaty ATXN3 mogą powstawać z normalnej oraz zmutowanej ataksyny, jednak ich proces tworzenia różni się. W odróżnieniu od normalnej ATXN3, zmutowana ATXN3 podlega dwuetapowemu procesowi agregacji w warunkach *in vitro* (Ellisdon i in., 2006). Dokładna rola agregatów ATXN3 w SCA3 pozostaje nadal w pełni niewyjaśniona w patologii tej choroby. Przyjmuje się, że powodują one stres neuronalny oraz mają negatywny wpływ na białka funkcjonalne, poprzez ich wiązanie i blokowanie (Li i in., 2002; McLoughlin i in., 2020).

Stres oksydacyjny, który obniża zdolność komórek do obrony przed wolnymi rodnikami może być wywołany przez stany zapalne. W neuronach pacjentów cierpiących na SCA3 stwierdzono zwiększoną ekspresję cytokin prozapalnych, do których należą antagoniści receptora interleukiny (IL)-1 oraz IL-1 β . Temu zjawisku towarzyszy wzrost liczby reaktywnych astrocytów oraz aktywowanych komórek mikrogleju (Evert i in., 2001, 2006). Wzrost cytokin prozapalnych, sugeruje, że proces zapalny może być częścią patologii SCA3. Ponadto, w fenotypowym mysim modelu choroby SCA3 zaobserwowano zmniejszoną odporność immunologiczną, co może mieć wpływ na zdolność organizmu do radzenia sobie z infekcjami i innymi wyzwaniami dla układu odpornościowego (Hübener i in., 2012).

Homeostaza

Ataksyna-3 oddziałuje z dwiema ligazami E3, które są niezbędne do utrzymania właściwej homeostazy komórkowej, a konkretnie koniec C białka ataksyny oddziałującego z Hsc70 (CHIP) i parkiną. CHIP działa jako neuroprotekcjna ligaza E3. Jest ona zaangażowana do kontroli jakości białek poprzez współdziałanie z białkami opiekuńczymi, aby wspomagać degradację nieprawidłowo sfałdowanych białek (Connell i in., 2001).

Białko ATXN3 posiada umiejętność do wiązania DNA i interakcji z regulatorami transkrypcji, co wskazuje na jego rolę w transkrypcji prawdopodobnie jako korepresor transkrypcji (Li i in., 2002). Oddziałując z białkiem wiążącym element odpowiedzi

cAMP (CREB), p300 oraz czynnikiem związanym z p300/CREBBP (PCAF), ATXN3 hamuje transkrypcję za pośrednictwem szlaku CREB (Chai i in., 2001).

4.4. Terapie genowe w chorobach poliglutaminowych

Terapia genowa to metoda terapeutyczna, w której obce kwasy nukleinowe (DNA lub RNA) są wprowadzane do komórek w celu obniżenia, podwyższenia lub skorygowania ekspresji genów odpowiedzialnych za powstawanie choroby (B. Hu i in., 2020; Sayed i in., 2022). Do głównych terapii genowych opartych na wyciszaniu genów w leczeniu choroby Huntingtona oraz ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 należą: terapia oparta na oligonukleotydach antysensownych oraz terapia RNA interferencyjnego.

4.4.1. Terapia genowa oparta na ASO

Oligonukleotydy antysensowne (ASO, ang. *AntiSense Oligonucleotide*) to syntetyczne, jednoniciowe i krótkie łańcuchy chemicznie zmodyfikowanych kwasów nukleinowych. Zwykle składające się z 8-50 nukleotydów. Ich celem jest wiązanie się z określonymi sekwencjami jednoniciowego mRNA. W 1978 roku Stephenson i Zamecnik wykazali, że zastosowanie oligonukleotydów antysensownych (ASO) umożliwia precyzyjne i skuteczne hamowanie ekspresji genów. Ich badania pokazały, że 13-nukleotydowa cząsteczka DNA komplementarna do części genomu wirusa mięsaka Rousa powstrzymywała proces translacji wirusowego RNA (Zamecnik & Stephenson, 1978; Bennett & Swayze, 2010). ASO kwalifikują się do obiecującej klasy leków o dużym potencjale w leczeniu chorób wpływających na OUN. Posiadają one zdolność do hybrydyzacji z cząsteczkami RNA poprzez standardowe parowanie zasad Watsona-Cricka i w ten sposób modyfikują ekspresję docelowego RNA. Oligonukleotydy antysensowne mogą być także zaprojektowane w taki sposób, aby prowadzić do degradacji docelowego transkryptu, zakłócać translację docelowego transkryptu lub zmieniać dojrzewanie transkryptu poprzez modulację *splicingu* (Bennett & Swayze, 2010).

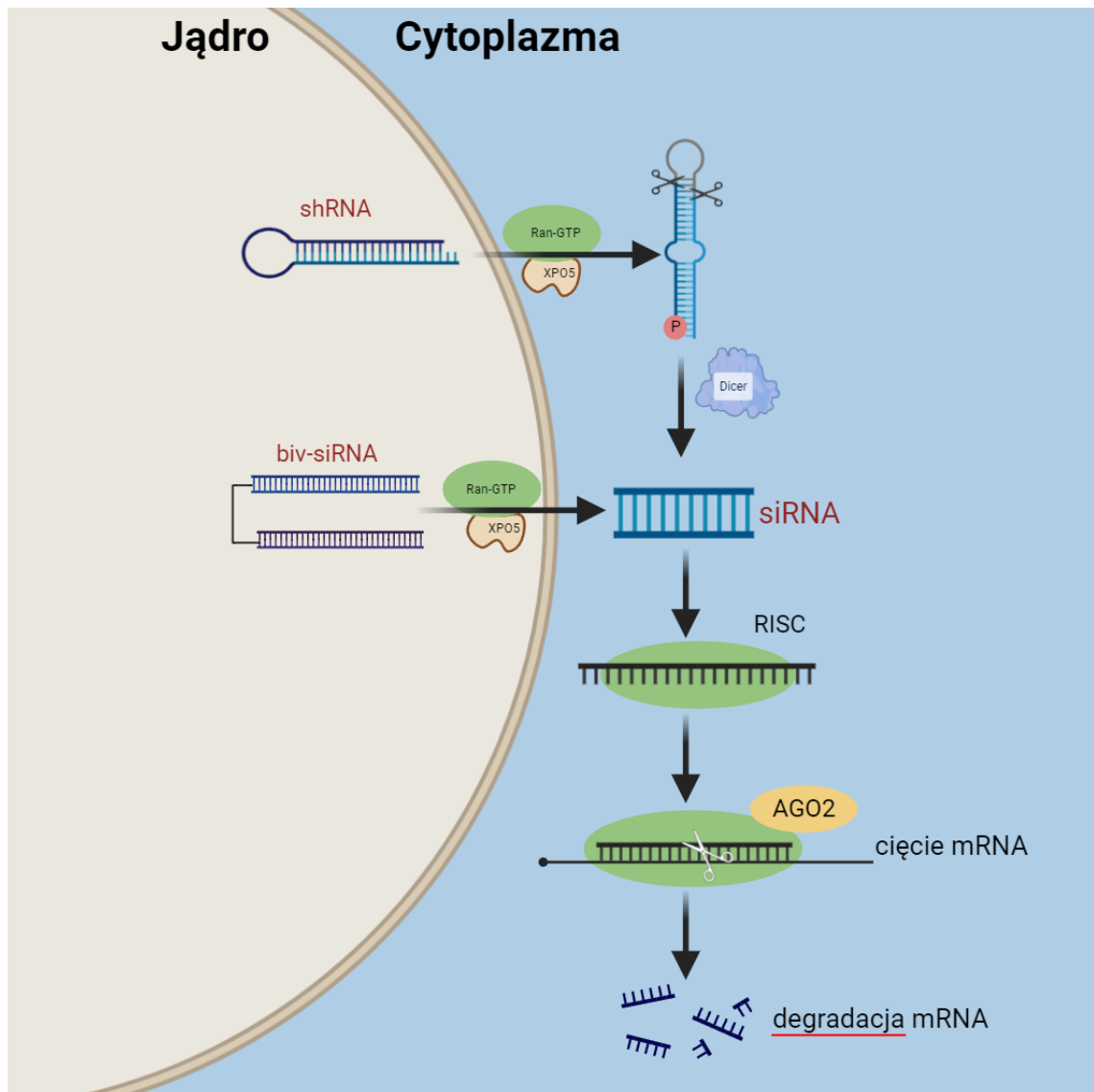
ASO modyfikuje RNA przez różne mechanizmy, w zależności od celu terapeutycznego oraz ich konstrukcji. Do głównych mechanizmów działania ASO należy: degradacja mRNA za pośrednictwem RNazy H, blokowanie translacji oraz regulacja *splicingu* pre-mRNA, które prowadzi do pomijania eksonu kodującego mutacje. Specyficzność alleli można podzielić na polimorfizm pojedynczego nukleotydu SNP (ang. *Single Nucleotide*

Polymorphism) oraz na powtarzające się CAG (Buijsen i in., 2019). Mimo perspektywicznych możliwości terapeutycznych, bariera krew-mózg stanowi główną przeszkodę w dostarczaniu ASO do OUN (McCartan i in., 2023), bardzo ograniczone ilości ASO jest w stanie pokonać barierę krew-mózg i dotrzeć do docelowych komórek mózgowych po podaniu ogólnoustrojowym. Jednak wiele badań wykazało, że po wstrzyknięciu bezpośrednio do komór mózgowych (ICV) (Casaca-Carreira i in., 2017; Chauhan, 2002) lub podaniu dooponowym (Butler i in., 2005). ASO wykazują szeroką dystrybucję w ośrodkowym układzie nerwowym. Kolejnym problemem terapii opartej na ASO jest stosunkowo krótki okres półtrwania chemicznych kwasów nukleinowych. W wyniku czego następuje szybka degradacja oraz zmiana stężenia podczas podziałów komórkowych (Bramsen i in., 2009). Terapie z ASO przez to wymagają kilkukrotnej iniekcji reagentem.

4.4.2. Terapia oparta na RNAi

Działanie mechanizmu terapii opierającej się na RNAi polega na dostarczeniu różnych cząsteczek niekodującego RNA (ang. *non-coding RNA*) do komórek (Matos i in. 2018). Te cząsteczki to chemicznie uzyskane siRNA (ang. *small interfering RNA*) lub dostarczane shRNA (ang. *short hairpin RNA*), które komórka generuje do siRNA. shRNA może być dostarczane do komórek za pomocą zmodyfikowanych wirusów tj. lentowirusów lub adenowirusów, a następnie przekazują swój materiał genetyczny do komórek gospodarza (Sliva & Schnierle, 2010).

Pierwszy etap mechanizmu interferencji polega na przetwarzaniu i cięciu dłuższego dwuniciowego RNA do siRNA. Za tę przemianę odpowiada enzym o podobnej funkcji do RNazy III, zwanym Dicer (Bernstein i in., 2001; Kim i in., 2005; McNamara i in., 2006). Następnie siRNA są wiązane przez kompleks RISC (ang. *RNA induced Silencing Complex*) składający się z wielu białek. W kompleksie RISC nici siRNA są rozdzielane, nici o stabilniejszym końcu 5' zazwyczaj zostaje włączona do aktywnego kompleksu RISC. Antysensowny jednoniciowy składnik siRNA następnie kieruje i wyrównuje kompleks RISC na docelowym mRNA, a za pomocą aktywnego białka katalizującego w kompleksie RISC, jak Ago2 (członek rodziny argonautów), dochodzi do rozszczepienia mRNA (**Rys. 1**) (Choung i in., 2006; Meister i in., 2004; Song i in., 2004; Zamore i in., 2000).



Rysunek 1 Schemat szlaku wirusowego shRNA i biwalentego siRNA.

Samo dostarczenie RNAi podobnie jak z przypadku ASO charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania. Rozwiązaniem tego problemu wydaje się być zastosowanie cząsteczki biwalentnej, w której skład wchodzi dwie pojedyncze cząsteczki siRNA połączone wiązaniem kowalencyjnym (**Rys. 1**). Cząsteczka ta utrzymuje się 6 miesięcy w mysim mózgu HD (Alterman i in., 2019). Drugim rozwiązaniem problemu jest zastosowanie wektorów wirusowych AAV, które wprowadzają cząsteczki do organizmu gospodarza. Wówczas transdukcja komórek utrzymuje się nawet do kilku lat. Geny, które kodują shRNA lub siRNA są wklonowane do cząsteczki AAV pod odpowiednim promotorem zapewniającym ekspresję w docelowych komórkach. Aktualnie wiele terapii genowych opartych na wektorach AAV jest w trakcie badań przedklinicznych, jak i klinicznych. Czego efektem jest pojawienie się nowych produktów, przeznaczonych do

leczenia różnych chorób u ludzi, włączając w to także te, które dawniej uznawano za nieuleczalne (Issa i in., 2023).

Wirus związany z adenowirusem (AAV) należy do rodziny *Parvoviridae*, która obejmuje dwudziestościenny kapsyd składający się z 60 białek oraz zawierający genom jednoniciowego DNA (ssDNA) (Mezzina & Merten, 2011). Rekombinowany wektor AAV (rAAV) jest obiecujący nośnik dostarczania w dziedzinie terapii genowej ze względu na jego zakaźność, zarówno w stosunku do komórek dzielących się, jak i niedzielących się oraz ich niską patogenność (Mietzsch, Péntzes, i Agbandje-McKenna 2019). Ze względu na wysoką transdukcję do komórek, może on transdukować komórki poza celem terapeutycznym. W zależności od serotypu AAV mogą wykazywać specyficzny tropizm w stosunku do określonych narządów i tkanek organizmu. Serotyp AAV-PHP.eB wybrany do doświadczeń charakteryzuje się przejściem przez barierę krew-mózg (BBB) jest to kluczowe dla chorób związanych z OUN. Serotyp ten powstał poprzez ewolucja kapsydu AAV9 poprzez insercję aminokwasu heptameru w sekwencji kapsydu (Chan i in., 2017; Deverman i in., 2016).

4.4.3. Strategia celowania w powtórzenia CAG

Białko HTT jest kluczowym białkiem dla wielu procesów komórkowych, tj. transport wewnątrzkomórkowy, regulacja transkrypcji, autofagia oraz neuroprotekcja (Wu & Zhou, 2009). Dlatego najlepszym rozwiązaniem dla leczenia chorób poliglutaminowych (zwłaszcza HD) wydaje się być terapia nakierowana na ciąg CAG. Badania prowadzone w Instytucie Chemii Bioorganicznej m.in. przez zespół dr hab. Agnieszka Fiszer, prof. ICHB PAN oraz przez zespół prof. Coreya doprowadziły do zaprojektowania cząsteczki A2, celującej w ciąg CAG oraz utworzenia terapii alleloselektywnej. Aby zachować prawidłowe funkcje białka, najbezpieczniejszym rozwiązaniem jest zaprojektowanie terapii celujące tylko w zmutowany gen, nie obniżając poziomu prawidłowego genu (J. Hu i in., 2010; Fiszer i in. 2010). Leczenie opierające się na obniżeniu poziomu całkowitego białka HTT, może przyczynić się nieprawidłowego funkcjonowania organizmu. Gen Htt jest niezbędny we wczesnym rozwoju embrionalnym myszy, jego usunięcie na etapie wczesnego rozwoju embrionalnego prowadzi do letalności organizmów (Liu i in., 2016). U dorosłych mysich osobników usunięcie genu Htt nie ujawniło negatywnego wpływu. Inaczej jest u myszy bez genu *Atn3* (myszy z nokautem *Atn3*), nie zaobserwowano różnic na każdym etapie rozwoju (Schmitt i in., 2007).

Terapia alleloselektywna celuje w różnicę długości pomiędzy allelem prawidłowym, a zmutowanym. W zmutowanym allelu występuje więcej miejsc do których może przyłączyć się cząsteczka terapeutyczna. W efekcie czego do zmutowanego allelu przyłącza się wiele kompleksów RISC, które blokują translacje (Kotowska-Zimmer i in., 2022).

4.4.4. Badania kliniczne w chorobach poliglutaminowych

W ostatnich latach prowadzone były trzy badania kliniczne fazy 3 nad chorobą Huntingtona. Jednak w marcu 2021 te 3 badania nie zostały kontynuowane. Badania firmy Roche skupiały się na badaniu cząsteczki Tominersen (GENERATION HD1 ClinicalTrials.gov ID NCT03761849). Tominersen to antysensowny oligonukleotyd, które przyłącza się do mRNA huntingtyny i dzięki temu prowadzi do jej degradacji. W wyniku czego zahamowana jest produkcja zmutowanego białka HTT. W 1 i 2 fazie badań klinicznych udowodniono, bezpieczeństwo stosowania tominersenu oraz jego działanie na redukcji zmutowanego białka HTT. Badanie 3 fazy zostały wstrzymane, ponieważ wyniki stosowania tego leku nie różniły się stosowania cząsteczki placebo, a profil ryzyka do korzyści okazał się niekorzystny. PRECISION-HD1 (ClinicalTrials.gov ID NCT03225833) i PRECISION-HD2 (ClinicalTrials.gov ID NCT03225846) to dwa badania fazy 1b/2a, w których sprawdzano bezpieczeństwo i działanie docelowe dwóch leków opracowanych przez Wave Life Sciences w celu obniżenia poziomu zmutowanego białka Huntingtyny. Te dwie cząsteczki zaprojektowano w taki sposób, aby selektywnie wyciszały zmutowaną kopię genu *HTT*, przy tym minimalizując wpływ na zdrową kopię genu. To podejście ma na celu zmniejszenie toksyczności przy jednoczesnym zachowaniu funkcji normalnej huntingtyny. Badania te zakończyły się zgodnie z planem, ale w przypadku obu leków nie udało się obniżyć poziomu Huntingtona. Kolejne badania prowadzona nad HD to badania firmy uniQure dotyczące terapii genowej AMT-130 (ClinicalTrials.gov ID NCT04120493). To badanie również zostało wstrzymane na 1 i 2 fazie z powodu powikłań neurologicznych u niektórych uczestników oraz badanie VIBRANT-HD (ClinicalTrials.gov ID NCT05111249) firmy Novartis doustnej terapii hipoglikemizującej, branaplam zawiesił dawkowanie ze względu na zgłoszoną neuropatię obwodową (Andrew i Fox, 2023.) Te same firmy UniQure oraz Voyager Therapeutics szukają też skutecznej terapii dla leczenia ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Terapie te opierają się na zastosowaniu różnych serotypów AAV dostarczających miRNA, które

celuje w mRNA ataksyny-3. Firma Biohaven Pharmaceuticals złożyła wniosek o nowy lek (NDA) do leczenia ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Troriluzolu to prolek riluzolu trzeciej generacji. Riluzol jest zatwierdzonym przez Agencję ds. Żywności i Leków do leczenia stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Troriluzol działa poprzez modulację glutamin, co może zmniejszać ich toksyczność i chroni neurony przed uszkodzeniem (Ayala i in., 2022).

4.5. Modele chorób poliQ

Istnieją różne modele badawcze, które pozwalają lepiej zrozumieć przebieg chorób. W przypadku chorób poliglumanowych używane są, zarówno komórkowe, zwierzęce, jak i inne modele chorobowe. Do najskuteczniejszych modeli badawczych w tym przypadku uznaje się myszy model. Można wyróżnić: myszy transgeniczne lub z genami *knock-in*. Myszy transgeniczne zostały poddane genetycznej modyfikacji w celu wprowadzenia ekspansji sekwencji poliQ w właściwych genach, np. gen *HTT* w przypadku HD lub geny *ATXN* w przypadku ataksji rdzeniowo-mózdkowych. Myszy z genami *knock-in* to myszy, u których ekspansja poliQ została naturalnie przyłączona przez insercje do genu, bez zastosowania transgenicznych konstrukcji (Figiel i in., 2012; Mangiarini i in., 1996). Kolejnym modelem chorób poliQ są kultury komórkowe. Komórki indukowane pluripotencjalne (iPSCs), czyli komórki somatyczne ulegają reprogramowaniu do postaci pluripotencjalnej, a następnie są różnicowane w neurony, w celu odwzorowania zmian patologicznych (J. Chen i in., 2023). Komórki neuronalne zmutowane genetycznie, czyli komórki nerwowe, które zostały zmutowane genetycznie, aby zawierać ekspansję sekwencji poliQ (Lieberman i in., 2019) komórek pacjentów z chorobami poliQ oraz organoidy mózgu. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są stosowane jako modele dla niektórych chorób poliQ, ponieważ posiadają odpowiedniki genów ludzkich z ekspansją poliQ, co umożliwia badanie mechanizmów patologicznych na poziomie komórkowym (Krobitsch & Lindquist, 2000).

4.5.1. Zwierzęce bialleliczny model HD Hu^{128Q/21Q}

Model Hu^{128Q/21Q} został utworzony w Centrum Medycyny Molekularnej i Terapeutyki, która jest częścią Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Kolumbii Brytyjskiej w Vancouver, Kanada. Aby utworzyć myszy model choroby Huntingtona (HD) z humanizowanym eksonem 1 genu *HTT* najpierw konieczne było uzyskanie linii myszy z

genem *HTT* typowym dla haplogrupy A. Stworzono linię myszy transgenicznych Bac^{21Q} poprzez skrzyżowanie myszy $HTT^{null/wt}$ z $Bac^{wt/wt}$ w wyniku czego otrzymano myszy $Bac^{null/wt}$, następnie skrzyżowano $Bac^{null/wt}$ z $Bac^{null/wt}$ z czego otrzymano $Bac^{null/null}$, czyli model pozbawiony mysiego genu *Htt* Bac^{21Q} . To samo zrobiono z modelem Yac^{128Q} . Skrzyżowano $HTT^{null/wt}$ z $Yac^{wt/wt}$, a następnie $Yac^{null/wt}$ z $Yac^{null/wt}$. Kolejno przeprowadzono krzyżowanie myszy Bac^{21Q} z myszami Yac^{128Q} na tle $HTT^{null/null}$, co zaowocowało utworzeniem nowej, zhumanizowanej linii myszy HD oznaczonej jako $Hu^{128Q/21Q}$ (Southwell i in., 2017). Myszy te scharakteryzowano pod kątem zmian w zachowaniu behawioralnym, neuropatologicznym, biochemicznym i ekspresji genów przypominających HD. Ustalono, poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie eksonu 1, że myszy $Hu^{128Q/21Q}$ można wykorzystać do badań przedklinicznych terapeutyków ukierunkowanych na ludzki ekson *HTT* 1. Southwell i in. 2017, udowodnili, że poziomu białka prawidłowego i zmutowanego *HTT* u myszy $Hu^{128Q/21Q}$, jest podobny co w liniach Yac^{128Q} i Bac^{21Q} , co sugeruje uniwersalność badania huntingtyny o prawidłowej i zwiększonej ilości powtórzeń CAG. Kolejne ich badania wykazują, że myszy $Hu^{128Q/21Q}$ mają znaczną nadwagę w porównaniu do linii *FVB/N* (ang. *background*), największy przyrost wagi wykazują po 4 miesiącu życia. Samice wykazują wyższy przyrost wagi niż samce, jednak u obu płci zaobserwowano zwiększony przyrost wagi w stosunku do myszy kontrolnych. Nie jest to objaw chorobowy, ale zaobserwowano też w moich badaniach zwiększoną masę ciała tego modelu w porównaniu do innych myszy. Zwyródnienie jąder jest jednym z objawów choroby Huntingtona, zatem w nowo stworzonym zhumanizowanym modelu myszy zaobserwowano tę cechę. Zaobserwowano mniejszy przyrost jąder w modelu chorobowym niż u osobników kontrolnych. Myszy $Hu^{128Q/21Q}$ poddane zostały testom behawioralnym, w wyniku których zaobserwowano objawy charakterystyczne dla pacjentów z HD, takie jak postępujące deficyty motoryczne, zachowania przypominające stany depresyjne i lękowe, a także postępujące deficyty w uczeniu się przestrzennego i rozpoznawaniu obiektów. Selektywny zanik przedniego mózgu, który jest najbardziej widoczny w prążkowie, ale także widoczny w korze mózgowej i istocie białej (J. P. G. Vonsattel i in., 2011) jest cechą HD, która jest powtórzona u myszy $Hu^{128Q/21Q}$. Wykorzystany w pracy mysi model choroby HD cechuje się mniejszą masą mózgu niż myszy kontrolne w 12 miesiącu życia. Badacze zaobserwowali także postępującą atrofię specyficzną dla przodomózgowia oraz zmiany histologiczne w mózgu, objawiające się występowaniem licznych inkluzji *HTT* w prążkowie (Southwell i in., 2017).

4.5.2. Zwierzęce bialleliczny model SCA3 Ki^{150Q/21Q}

Mysi model choroby SCA3 typu knock-in został wygenerowany w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (Switonski i in., 2015). Początkowo nazwany był Ki^{91Q}, ponieważ myszy posiadały 90, 91 i 92 powtórzeń CAG zlokalizowanych w hybrydowym humanizowanym genie *ATXN3*. Model ten powstał poprzez insercje ludzkiego cDNA, obejmującego egzony 7–11 genu *ATXN3* z dodatkowymi 91 powtórzeniami CAG w egzonie 10, w miejsce mysich egzonów i intronów 7–11 genu *ATXN3*. Mysie egzony 1–6 kodowały część białka ataksyny–3 z jedną zmianą aminokwasową w porównaniu do ludzkiego białka *ATXN3* i dlatego exony 1–6 nie zostały zmodyfikowane. Mysi model Ki^{91Q} scharakteryzowano pod kątem zmian behawioralnych, neuropatologicznych, biochemicznych i ekspresji genów SCA3 (Switonski i in., 2015). Ustalono, że jest to model badawczy charakteryzujący się postępującym fenotypem. Wiatr i in. 2019 wyodrębnili 3 stadia chorobowe w mysim modelu Ki^{91Q} tj. fazę presymptomatyczną, wczesną symptomatyczną oraz późną symptomatyczną. Stadium presymptomatyczne charakteryzuje się niewystępowaniem zmian behawioralnych u myszy SCA3, w porównaniu do myszy kontrolnych, faza ta trwa do 2 miesiąca życia mysz. Podczas tej fazy zaobserwowano rzadko występujące komórki z lokalizacją jądrową zmutowanej ataksyny–3, a jednocześnie zaobserwowano znaczne zmiany w poziomie całkowitego proteomu, jak i na poziomie fosfoprotein. Wczesne stadium symptomatyczne przypadające na 4–8 miesiąc życia myszy, w którym nie zaobserwowano znacznych zmian w ich zachowaniu. Natomiast faza późno symptomatyczna występująca po 8 miesiącu życia myszy wykazała postępujące zmiany motoryczne oraz neuropatologiczne, które dobrze naśladują objawy pacjentów SCA3. Wykazano zaburzenia motoryczne (w szczególności utrata koordynacji, zaburzenia koncentracji, osłabienie siły mięśniowej), zmiany w obrazowaniu mózgu (zmniejszenie objętości mózgu) oraz występowaniem agregatów białkowych ataksyny–3 w śródmózgowiu, prążkowiu, hipokampie i mózdzku (Piasecki i in., 2023; Switonski i in., 2015).

W tej pracy zastosowano mysy model chorobowy SCA3 Ki^{150Q/21Q}. Ten model został stworzony poprzez modyfikacje mysiego modelu Ki^{91Q}. W wyniku zwiększenia ilości powtórzeń CAG powstał mysy model SCA3 Ki^{150Q}, mający zmutowany ludzki gen ataksyny–3 na obu allelach o ilości powtórzeń 140–165 CAG. Model ten został skrzyżowany z homozygotycznym mysim modelem Ki^{21Q}, zawierającym hybrydowy ludzki

transgen ataksyny-3 zawierający 21 powtórzeń CAG. W wyniku tego skrzyżowania powstał model biallelicznych $Ki^{150Q/21Q}$, posiadający jeden allel ze zmutowaną liczbą powtórzeń CAG oraz drugi allel z normalną liczbą CAG. Dzięki takiej kombinacji alleli w myszy można ocenić działanie potencjalnie terapeutycznych cząsteczek na obniżanie poziomu białka kodowanego przez normalny i zmutowany allel ataksyny-3.

5. Cel pracy

- Przedkliniczna charakterystyka podejścia terapeutycznego w HD i SCA3, w którym terapie RNA powodują obniżanie zmutowanego białka poliQ w mózgu poprzez celowanie w ciąg powtórzeń CAG w mRNA zmutowanych genów.
- Testowanie terapeutyków shRNA w formie wektorowej AAV-PHP.eB transportowanych przez barierę krew-mózg i sprawdzanie ich biodystrybucji w mózgu.
- Testowanie terapeutyków w postaci chemicznie modyfikowanych siRNA w formie biwalentnej i sprawdzanie jego biodystrybucji w mózgu.
- Określenie parametrów przedklinicznych terapeutyków takich jak efekty uboczne, efektywność obniżania poziomu zmutowanych i normalnych białek, alleloselektywność i efektu terapeutycznego na poziomie komórkowym (inkluzyje).
- Wytypowanie najbardziej obiecującego terapeutyku do dalszych badań przedklinicznych lub potencjalnych studiów klinicznych.

6. Materiały i metody

6.1. Materiały

6.1.1. Konstrukty terapeutyczne

6.1.1.1. Cząsteczki wirusowe AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA

Cząsteczki AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA wyprodukowano w Zakładzie Biologii Molekularnej i Wirusologii przy Instytucie Genetyki, Biologii Molekularnej i Komórkowej (IGBMC) w Strasburgu. Pomiar miana wektorów wirusowych wykonano techniką qPCR. Aby uzyskać końcową dawkę do iniekcji retro-orbitalnych, wektory rozcieńczono w sterylnej soli fizjologicznej bezpośrednio przed użyciem (**Tab. 2**).

Tabela 2. Nazwy konstruktów wirusowych z shRNA, ich miano oraz dawki zastosowane do iniekcji

Nazwa	Miano [vg/ul]	Dawka [vg/kg]
AAV-PHP.eB_eGFP_H1_shA2Scrambled	$2,20 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{13}$
PHP.eB_eGFP_H1_shA15	$4,30 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{13}$
PHP.eB_eGFP_H1_shA4	$3,10 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{13}$
PHP.eB_eGFP_H1_shA2	$5,00 \times 10^9$	$0,5 \times 10^{13}$
PHP.eB_eGFP_H1_shA2(P10,11A)	$9,80 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{13}$
PHP.eB_eGFP_H1_shAG4	$1,30 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{13}$
PHP.eB_eGFP_H1_shA4(P10A)	$1,90 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{13}$
PHP.eB_eGFP_H1_shA4(P10A,11A)	$2,10 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{13}$
PHP.eB_eGFP_H1_shAA4	$2,50 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{13}$

Konstrukty wirusowe dla wszystkich wykorzystanych cząsteczek AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA zawierały kasetę ekspresyjną składającą się z sekwencji kodującej rekombinowane białko zielonej fluorescencji (eGFP) pod promotorem wirusa cytomegalii (CMV ang. *Cytomegalovirus*), oraz sekwencji kodującej shRNA (**Tab. 3**) pod promotorem H1. Obie kasety zawarte były pomiędzy sekwencjami odwróconych

powtórzeń końcowych wraz z otoczonymi sekwencjami odwróconego terminalnego powtórzenia (ITR ang. *inverted terminal repeat*) (Rys. 2).



Rysunek 2. Schemat konstruktu genetycznych

Tabela 3. Sekwencja konstruktu shRNA celujące w ciąg CAG

Nazwa	Niś sens	Pętla	Niś antysens
Scrambled	GGCCCAGCCGUAGCCGAGUG	AACUCCUGUCAUU	CACUCGGCUACGGCUGGGCCUU
A2	GCAGCAGCAGCUGCAGCAGC	UGCUCUGUCACA	GCUCUGCAGCUGCUGCUCUU
A2(P10,11A)	GCAGCAGCAUUUGCAGCAGC	UGCUCUGUCACA	GCUCUGCAAAUGCUGCUCUU
A4	GCAGCUGCAGCUGCAGCAGC	UGCUCUGUCACA	GCUCUGCAGCUGCAGCUCUU
A4(P10A)	GCAGCUGCAGUUGCAGCAGC	UGCUCUGUCACA	GCUCUGCAACUGCAGCUCUU
A4(P10,11A)	GCAGCUGCAGUUGCAGCAGC	UGCUCUGUCACA	GCUCUGCAAAUGCAGCUCUU
AG4	GCAGCCGCAGCUGCAGCAGC	UGCUCUGUCACA	GCUCUGCAGCUGCAGCUCUU
AA4	GCAGUUGCAGUUGCAGCAGC	UGCUCUGUCACA	GCUCUGCAACUGCAACUCUU
A15	GCAGCUGCUCUUGCAGCAGC	UGCUCUGUCACA	GCUCUGCUAAAGCAGCUCUU

6.1.1.2. Czasteczki biwalentne

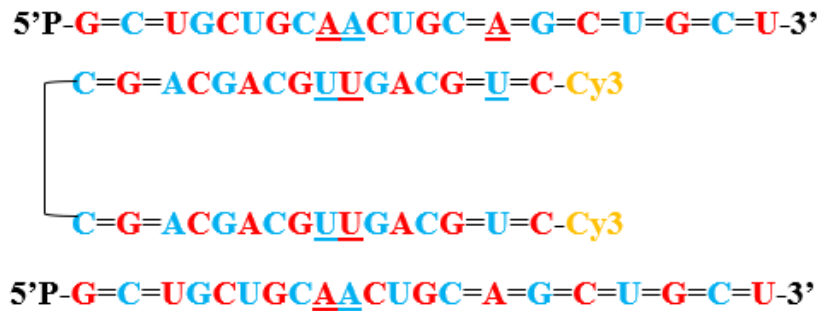
Czasteczki w formie chemicznie modyfikowanych krótkich RNA wytworzono w FutureSynthesis (Poznań, Polska). Czasteczkę reagenta (CGACGACGUUGACGUC-Cy3; CGACGACGUUGACGUC-Cy3) oraz czasteczkę rusztowania (P-GCUCUGCAACUGCAGCUCU) połączono w stosunku 1:2 w celu uzyskania końcowego stężenia 5000 μM reagenta. Aby uzyskać ostateczną objętość do iniekcji domózgowej, czasteczki zostały rozcieńczone w sterylnym roztworze soli fizjologicznej bezpośrednio przed podaniem (Tab. 4).

Tabela 4. Nazwa reagentów, ich stężenie oraz dawki zastosowane do iniekcji

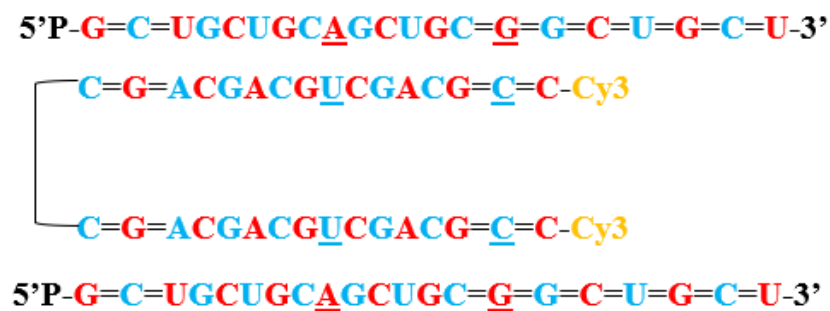
Nazwa	Stężenie reagenta [μM]	Dawka – iniekcja do STR [$\mu\text{g}/\text{mysz}$]	Dawka – iniekcja do ICV [$\mu\text{g}/\text{mysz}$]
Biwalentne AG4	5000	12,5	200
Biwalentne A4(P10A)	5000	12,5	200

Cząsteczki bivalentne składają się z sekwencji nukleotydów, wiązania fosforotioanowego, 2'-O-metylu, 2'-fluoru, 5' fosforanu oraz Cy3 jako barwnika na 5' końcu rusztowania (Rys. 3).

A4 (P10A)



AG4



Rysunek 3. Schemat konstruktów genetycznych A4(P10A) i AG4 (Legenda: „=” – wiązanie fosforotioanowe, „kolor czerwony” – 2'-O-metyl, „kolor niebieski” – 2'-fluoro, „P” – 5' fosforan, Cy3-barwnik na 5' końcu rusztowania).

6.1.2. Materiał biologiczny

Do przeprowadzenia badań wykorzystano mysie modele chorób poliQ. Skorzystano z modelu mysiego dla choroby Huntingtona - Hu^{128Q/21Q} (Southwell i in., 2017) oraz modelu mysiego dla ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 Ki^{150/Q21Q} (Switonski i in., 2015). Hodowlę zwierząt oraz eksperymenty przeprowadzono w Zwierzętarni Wielkopolskiego Centrum Zaawansowanych Technologii (Poznań, Polska).

6.1.3. Oligonukleotydy

Sekwencje starterów do reakcji PCR wykorzystywanych w pracy przedstawiono w **Tab. 5**, zostały wyprodukowane na zlecenie w Sigma Aldrich (Stany Zjednoczone) oraz Genomed (Polska).

Tabela 5. Sekwencje starterów

Nazwa	Orientacja startera	Sekwencja (5'→3')
<i>HTT</i>	F	GAGCCGCTGCACCGAC
	R	CTGACAGACTGTGCCACTATGTTT
<i>ATXN3</i>	F	CGCAGGGCTATTTCAGCTAAG
	R	GCTTTTGCTGCTGTTTTTCA
<i>Aktyna (qPCR)</i>	F	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT
	R	ATGGAGGGGAATACAGCCC
Intron 9 genu <i>ATXN3</i>	F	TCCTCTCTAGGATGGCTTTG
	R	TAAACGCCCCTACCTATTTG
Region CAG <i>ATXN3</i>	F	GGAAGAGACGAGAAGCCTAC
	R	TCACCTAGATCACTCCCAAGT
<i>HTT CAG</i>	F	ATT GCC CCG GTG CTG AGC G
	R	GCG GGC CCA AAC TCA CGG
<i>RYA</i>	F	CTT GAG ATC GGG CGT TCG ACT CGC
	R	CCG CAC CTG TGG CGC CGG TGA TGC
<i>LYAI</i>	F	CCT GCT CGC TTC GCT ACT TGG AGC
	R	GTC TTG CGC CTT AAA CCA ACT TGG
<i>Aktyna (PCR)</i>	F	AGC CTC AGG GCA TCG GAA CC
	R	GGA GAC GGG GTC ACC CAC AC

6.1.4. Najważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne

Tabela 6. Odczynniki wykorzystywane w eksperymentach

Nazwa odczynnika	Producent
Agaroza	EURx, Gdańsk, Polska
BSA (surowicza albumina wołowa ang. <i>bovine serum albumin</i>)	Thermo Scientific, Stany Zjednoczone
Chlorek magnezu	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
Chlorek sodu	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
Chloroform cz.d.a.	PoCh, Gliwice, Polska
Cytrynian sodu	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
DMSO	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone
dNTP	EURx, Gdańsk, Polska
EDTA	PoCh, Gliwice, Polska
Etanol	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone
Isotek (1000 mg/g płyn do sporządzania inhalacji parowej)	Centrowet-Cezal, Poznań, Polska
Izopropanol cz.d.a.	PoCh, Gliwice, Polska
Koktajl inhibitora proteazy (PIC)	Roche, Niemcy
Kwas borowy	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
Kwas octowy	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
Kwas solny	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
Metanol	PoCh, Gliwice, Polska
Nadsiarczan amonu	Bioshop Canada Inc., Burlington, Kanada
OCT Tissue Freezing Medium	Leica
Octan sodu	PoCh, Gliwice, Polska
Opokan (Meloxicam 1mg/kg m.c.)	AFLOFARM, Pabianice, Polska

Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone
Roztwór zamykający Mounting medium Fluoroshield™	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone
Sacharoza	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
SDS	Bioshop Canada Inc., Burlington, Kanada
Siarczan amonu	Chempur, Piekary Śląskie, Polska
Simple Safe	EURx, Gdańsk, Polska
Sól fizjologiczna (0.9% NaCl)	Polpharma, Starogard Gdański, Polska
TRI reagent	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone
Tribiotic, maść	KATO LABS, Warszawa, Polska
Tris-Base	Bioshop Canada Inc., Burlington, Kanada
Tween 20	Bioshop Canada Inc., Burlington, Kanada
Vidisic, żel do oczu	Dr Mann Pharma, Berlin, Niemcy
Wodorotlenek sodu	PoCh, Gliwice, Polska
β-Merkaptoetanol	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone

6.1.5. Roztwory i bufony

Tabela 7. Odczynniki do sporządzenia buforów wykorzystywane w metodzie western blottingu

Bufor PB do izolacji (3x stęż.)		Bufor obciążający do białek (3x stęż.)	
TRIS	60 mM	TRIS-HCl pH 6,8	150 mM
SDS	2 %	SDS	6 %
Sacharoza	10 %	β-merkaptoetanol	6 %
PIC	2 mM	Glicerol	30 %
		Błękit bromofenolowy	3 %

Bufor do elektroforezy (10x stęż.)		Bufor do elektrotransferu (1x stęż.)	
TRIS	25 mM	TRIS	25 mM
Glicyna	190 mM	Glicyna	192 mM
SDS	0,1 %	Metanol	20 %
		SDS	0,02 %

Bufor TBS (10x stęż., pH 7.4)		Bufor TBS-T (1x stęż., pH 7.4)	
TRIS	0,2 M	TRIS	20 mM
NaCl	1,5 M	NaCl	150 mM
		Tween 20	0,1 %

Bufor blokujący TBST-M (1x stęż.)		Roztwór Ponceau S	
TRIS (0,5x)	20 mM	Ponceau S	0,5 %
NaCl	150 mM	Kwas octowy	1 %
Tween 20	0,1 %		
Mleko odtłuszczone	5 %		

Tabela 8. Odczynnik do sporządzenie buforów wykorzystywanych w elektroforezie agarozowej

TBE (10x stęż.)		GB bufor (5x stęż.)	
TRIS (0,5x)	1 M	TRIS (pH 8.8)	3,35 mL
Kwas borowy	1 M	β-merkaptoetanol	35 μL
EDTA	20 M	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,83 mL
		H ₂ O	5,685 mL
		MgCl ₂	0,1 mL

Tabela 9. Odczynnik do sporządzenie buforu wykorzystywanego w barwieniu immunofluorescencyjnym

Bufor cytrynianowy	
Kwas cytrynowy jednowodny (C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)	2,1 g
Dihydrat trisodowy (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	14,7 g
H ₂ O	800 ml

6.1.6. Bufory dostępne komercyjnie

- Bufor do elektroforezy poliakrylamidowej NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer 20x (Invitrogen™, Stany Zjednoczone)
- Bufor do ligazy T4, stężony 10x (Promega, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone)
- Bufor do polimerazy GoTaq Flexi, stężony 10x (Promega, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone)
- Bufor PBS (Bioshop Canada Inc., Burlington, Kanada)

6.1.7. Zestawy i materiały komercyjne

- Butla z mieszaniną tlenu medycznego (Air Products, Poznań, Polska)
- EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone) Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- Marker długości DNA - Perfect Plus DNA Ladder (EURx, Gdańsk, Polska)
- Marker wielkości białek - PAGERuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Membrana nitrocelulozowa Amersham™Protran™ (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Stany Zjednoczone)
- Mieszanina dNTP (EURx, Gdańsk, Polska)
- Odczynniki SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Polimeraza DNA GoTaq Flexi 5 (Promega, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone)
- RNaseZap (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)

- Simple safe (EURx, Gdańsk, Polska)
- Traktowana DEPC woda wolna od nukleaz (EURx, Gdańsk, Polska)
- TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Zestaw do izolacji DNA - Spin Column Genomic DNA Kit (Bio Basic Inc., Markham, Canada)
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji – cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Zestaw do oznaczania białka metodą BCA – Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Żele komercyjne BIO-RAD Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels, 4-15% 15 dołkowe (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Żele komercyjne NuPAGE™ 3-8%, Tris-Acetate (Invitrogen™, Stany Zjednoczone)

6.1.8. Przeciwciała

Tabela 10. Przeciwciała wykorzystywane w eksperymentach

Nazwa	Typ	Gospodarz	Rozcieńcze nie	Producent
Przeciwciała I rzędowe				
Anty-huntingtyna	monoklonalne	<i>Mus musculus</i>	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich MAB2166
Anty-ataksyna 3	poliklonalne	<i>Mus musculus</i>	1:1000 (WB)	Proteintech 13505-1-AP
Anty-winkulina	poliklonalne	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:5000 (WB)	Proteintech 26520-1-AP
Anty-lamina B1	poliklonalne	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	1:5000 (WB)	Proteintech 12987-1-AP
Anty-GADPH	monoklonalne	<i>Mus musculus</i>	1:1000 (WB)	Invitrogen MA1-16757
Anty-huntingtyna	monoklonalne	<i>Mus musculus</i>	1:100 (IHC)	Sigma-Aldrich MAB5374
Anty-ataksyna 3	monoklonalne	<i>Mus musculus</i> <i>Capra hircus</i>	1:500 (IHC)	Sigma-Aldrich MAB5360

Hoechst33342			1:5000 (IHC)	Sigma Aldrich 28718-90-3
Przeciwciała II rzędowe				
Anty-mysie HRP	poliklonalne	<i>Equus asinus</i>	1:500 (WB)	Jackson ImmunoResearch 715-035-150
Anty-królicze HRP	poliklonalne	<i>Equus asinus</i>	1:5000 (WB)	Jackson ImmunoResearch 711-035-152
Anty-królicze Alexa 647	poliklonalne	<i>Capra hircus</i>	1:500 (IHC)	Jackson ImmunoResearch 111-607-003
Anty-mysie Alexa 647	poliklonalne	<i>Capra hircus</i>	1:500 (IHC)	Jackson ImmunoResearch 115-605-205

6.1.9. Sprzęt laboratoryjny i materiały trwałe

- Aparat do elektroforezy pionowej Invitrogen™ Mini Gel Tank (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Aparat do elektroforezy pionowej Mini-Protean®Tetra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Aparat do elektroforezy poziomej (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Aparat do transferu mokrego Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Aparat sterotaktyczny (RWD Life Science, San Diego, Stany Zjednoczone)
- Homogenizator TissueRuptor (Qigen, Hilden, Niemcy)
- Mata grzewcza do klatek operowanych myszy (RWD Life Science, San Diego, Stany Zjednoczone)
- Maty grzewcze dla zwierząt wykorzystywane przy operacjach stereotaktycznych (RWD Life Science, San Diego, Stany Zjednoczone)

- Mieszadło (SunLab, Warszawa, Polska)
- Mikroskop konfokalny Opera Phenix™ (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Mikroskop stereoskopowy (Motic, Chiny)
- NanoDrop Onec Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Nici chirurgiczne wchłaniane (Madens, Poznań, Polska)
- pH-metr Seven Easy (Mettler Toledo, Warszawa, Polska)
- Pompa do perfuzji (własna konstrukcja)
- Sonikator Sonoplus mini20 BANDELIN (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- Strzykawka do insuliny 0,5ml U-100 0,30mm (30G) (Becton Dickinson, Wrocław, Polska)
- Strzykawka insulinowa 1ml U-100 0,30mm (30G) (Becton Dickinson, Wrocław, Polska)
- Strzykawki Hamilton 10- μ l z igłą 26G (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stany Zjednoczone)
- System dokumentacji żeli G:box (Syngene, Cambridge, Wielka Brytania)
- System pompy infuzyjnej (KD Scientific Inc., Holliston, Stany Zjednoczone)
- Systemy do znieczulania i anestezji zwierząt (RWD Life Science, San Diego, Stany Zjednoczone)
- Termocykler do qPCR CFX Connect™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- Termocykler ProFlex™ 3 x 32-well (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- Termomikser TS-100 (Biosan, Józefów, Polska)
- Wirówka 5424R (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- Wirówka Mikro120 (Hettich, Lusowo, Polska)
- Wirówka multi spin MSC-600 (Biosan, Józefów, Polska)
- Zasilacz do elektroforezy PowerPac™Basic (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone).

6.1.10. Programy komputerowe i bazy danych

- CFX Maestro Software- analiza wyników qPCR (Biorad, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone)
- GeneSys – analiza i wizualizacja żeli agarozowych oraz membran nitrocelulozowych (Syngene, Cambridge, Wielka Brytania)
- GraphPad Prism v.6.01 – analiza statystyczna wyników (GraphPad Software, San Diego California USA)
- Harmony High-Content Imaging and Analysis Software - wykonywanie fotografii mikroskopowych (Parkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone)
- ImageJ – analiza zdjęć mikroskopowych oraz membran nitrocelulozowych (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)
- Leica Angle Two™ - oprogramowanie stereotaktyczne ATLAS (MYNEUROLAB.COM, VWR International, Radnor, Pensylwania, Stany Zjednoczone)
- Peak Scanner 1.0 – analiza ilości powtórzeń CAG po rozdziale kapilarnym (Life Technologies, Carlsbad, USA)
- Tecan Infinite – analiza stężenia białka (Tecan Group AG, Männedorf, Szwajcaria)

6.2. Metody

6.2.1. Hodowla

Myszy eksperymentalne hodowano w ściśle określonych i kontrolowanych warunkach. W pomieszczeniu hodowlano-bytowym temperaturę utrzymywano na poziomie 22°C (+/- 2°C), wilgotność powietrza była w zakresie od 55 do 60%, zapewniono kilkukrotną (8-15 razy) wymianę powietrza w ciągu godziny oraz cykl dobowy, który trwał 12 godz. światła i 12 godz. ciemności. Zwierzęta hodowano w regale klatkowym IVC. Klatki o powierzchni podłogi 550 cm² i wysokości 14 cm wyposażono w filtr zewnętrzny i oznakowano odpowiednią tabliczką. Każdą klatkę indywidualnie wentylowano oraz zapewniano kilkukrotną wymianę powietrza w ciągu godziny. W jednej klatce przebywało od 2 do 5 zwierząt, zapewniono im urozmaicenie w postaci drewnianych klocków lub bawełnianych kokonów. Ściółkę wymieniano, co najmniej raz na tydzień (w zależności od potrzeby). Zwierzętom zapewniono nieograniczony dostęp do wody i pokarmu odpowiedniego dla myszy (*ad libitum*). Pomieszczenia w zwierzętarni były zgodne z normą dotyczącą pomieszczeń przeznaczonych dla zwierząt laboratoryjnych („Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2016 r. w sprawie minimalnych wymagań, jakie powinien spełniać ośrodek oraz minimalnych wymagań w zakresie opieki nad zwierzętami utrzymywanymi w ośrodku”).

6.2.1.1. Mysi model bialleliczny HD

Mysi model choroby Huntingtona Hu^{128Q/21Q} odtworzono, poprzez niepłatne przekazanie par zarodowych w ramach współpracy z partnerem projektu „TREAT-PolyQ” (ERA-NET-E-RARE-3/III/TreatPolyQ/08/2018) z Centrum Medycyny Molekularnej i Terapii, które jest częścią Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Kolumbii Brytyjskiej w Vancouver, Kanada (Southwell i in. 2017). Model Hu^{128Q/21Q} na tle genetycznym *FVB/N* niezawierającym ekspresji mysiego genu *HTT* (*HTT*^{null/null}) stworzono poprzez skrzyżowanie samicy Bac^{21Q} (*HTT*^{null/null}) i samca Yac^{128Q} (*HTT*^{null/null}). Transgeniczny myszy model Hu^{128Q/21Q} zawiera zmutowaną huntingtynę ludzką (128Q) i normalną huntingtynę ludzką (21Q) (Southwell i in., 2017).

6.2.1.2. Mysi model bialeliczny SCA3

Mysi model $Ki^{150Q/21Q}$ wykorzystywany w eksperymentach stworzono w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Model $Ki^{150Q/21Q}$ na tle genetycznym *C57Bl/6J* stworzono przez skrzyżowanie $Ki^{150Q/150Q}$ (hom/hom) i $Ki^{21Q/21Q}$ (hom/hom) i poddano genotypowaniu. Model $Ki^{150Q/21Q}$ zawiera zmutowaną ludzką ataksynę (150Q) i normalną ludzką ataksynę (21Q) (Piasecki i in., 2023; Switonski i in., 2015).

6.2.2. Genotypowanie myszy

6.2.2.1. Izolacja DNA

Do izolacji DNA z końcowego fragmentu ogona myszy wykorzystano zestaw Spin Column Genomic DNA Kit (Bio Basic Inc). Materiał biologiczny zwierzęcia poddano lizie z zastosowaniem Proteiny K. Następnie postępowano według standardowego protokołu producenta (Bio Basic Inc).

6.2.2.2. Pomiar jakościowy i ilościowy DNA

Stężenie i czystość kwasów nukleinowych oceniono za pomocą pomiarów przy użyciu spektrofotometru NanoDrop One Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Stężenie oceniano bezpośrednio poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm (A_{260}). Natomiast czystość analizowano na podstawie stosunku absorbancji, mierzonej przy długości fali 280 nm do 230 nm ($A_{260}/280$), a także przy długości fali 260 nm do 230 nm ($A_{260}/230$). Wartości wskazujące na wysoką jakość i czystość mieściły się w zakresie od około 2,0 do 2,2. Wyizolowane DNA doprowadzono do jednakowych stężeń (25 ng), poprzez rozcieńczenia w dH_2O .

6.2.2.3. PCR mysiego modelu $Hu^{128Q/21Q}$

Wyizolowane DNA poddano reakcji PCR z wykorzystaniem GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, USA) oraz z zestawem odpowiednich starterów.

Do oznaczenia pozytywnego produktu Bac21 wykonano reakcje PCR z zastosowanym zestawem primerów: HTT CAG F3 (ATT GCC CCG GTG CTG AGC G) oraz HTT CAG

R3 (GCG GGC CCA AAC TCA CGG) oraz pozostałych składników mieszaniny reakcyjnej (**Tab.11**).

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR Bac21 (na 1 reakcje)

Składniki	Objętość
czysty bezwodny DMSO	2 μ L
CAG F3, 10um	0,8 μ L
CAG R3, 10um	0,8 μ L
20XBSA	1 μ L
5XGB bufor	4 μ L
dNTPs, 2.5mM	1,6 μ l
Taq, Invitrogen	0,2 μ l
dH2O	7,6 μ L
DNA	1,2 μ L

Program reakcji PCR Bac21:

94°C 1,5 min

37 cykle: 94°C 30 s, 62°C 1 min, 72°C 90 s

72°C 10 min

4 °C ∞

Wynik reakcji PCR uwidocznił się podczas rozdzielania w 1,5 % żelu agarozowym z dodatkiem SimplySafe (Eurx) w buforze 1xTBE. Prążek na wysokości 400 pz był pozytywny dla Bac^{21Q}, natomiast prążek 700 pz był pozytywny dla Yac^{128Q} lub Hu^{128Q/21Q}.

W celu potwierdzenia odpowiedniego genotypu przeprowadzono drugą reakcję PCR TRIPLEX. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły 3 par starterów RYA (CTT GAG ATC GGG CGT TCG ACT CGC; CCG CAC CTG TGG CGC CGG TGA TGC), LYA (CCT GCT CGC TTC GCT ACT TGG AGC; GTC TTG CGC CTT AAA CCA ACT TGG), aktywa (AGC CTC AGG GCA TCG GAA CC; GGA GAC GGG GTC ACC CAC AC) oraz pozostałe reagenty (**Tab. 12**).

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR Triplex (na 1 reakcje)

Składniki	Objętość
PCR bufor 10X	2,4 μ L
MgCl ₂	1,44 μ L
DMSO 4%	0,48 μ L
dNTP, 10 mM	0,5 μ L
LYA 1, 10 μ M	0,5 μ L
LYA 2, 10 μ M	0,5 μ L
RYA 1, 10 μ M	0,5 μ L
RYA 2, 10 μ M	0,5 μ L
Aktyna R, 10 μ M	0,75 μ L
Aktyna F, 10 μ M	0,75 μ L
Taq, 5U/ μ L	0.06 μ L
dH ₂ O	2,62 μ L
DNA	1.2 μ L

Program reakcji PCR TRIPLEX:

94 °C 3 min

37 cykli: 94°C 30 s, 63°C 60 s, 72°C 30 s

72°C 10 min

4°C ∞

Wynik reakcji PCR także uwidoczniło podczas rozdźwięku w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem SimplySafe (Eurx) w buforze TBE. Jeśli obserwowano prążki o wielkości 450 pz (aktyna), 230 pz (LYA) i 170 pz (RYA) wynik był pozytywny dla Yac^{128Q} oraz Hu^{128Q/21Q}. Jeśli zaobserwowano tylko prążek na wysokości 450bp (aktyna) był to wynik potwierdzający genotyp Bac^{21Q}. Na podstawie zobrażonych na żelu prążków po dwóch reakcja PCR, do eksperymentów wybrano myszy o genotypie odpowiadającym biallelicznemu modelowi Hu^{128Q/21Q}.

6.2.2.4. PCR mysiego modelu Ki^{150Q/21Q} oraz elektroforeza kapilarna

W przypadku mysiego modelu SCA3 zastosowano zestaw primerów: GGACCTATCAGGACAGAGTTCACATCCA; CACATTACCAAAGTGGACCCTATGCTGT, skierowany w humanizowany region

genu *ATXN3* oraz TCCTCTCTAGGATGGCTTTG; TAAACGCCCTACCTATTTG, skierowany w endogenny region genu *Atxn3*. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR podano w **Tab. 13**.

Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR ATXN3 (na 1 reakcje)

Składniki	Objętość
PCR bufor 10X	2,4 μ L
MgCl ₂ (25mM)	0,96 μ L
dNTP (10mM)	0,24 μ L
Primer F	0,24 μ L
Primer R	0,24 μ L
Taq, 5U/ μ L	0,06 μ L
dH ₂ O	6,6 μ L
DNA	1.2 μ L

Program reakcji PCR ATXN3:

180 s 94°C, 12× (35 s 94°C, [45 s 64°C - 0.5°C/cykl]

45 s 72°C

25× (35 s 94°C, 30 s 58°C, 45 s 72°C)

2 min 72°C

4 °C ∞

Wynik reakcji PCR uwidocznilo podczas rozdzielania w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem SimplySafe (Eurx) w buforze TBE. Zidentyfikowano właściwy genotyp myszy wykorzystywanych w badaniach na podstawie prążków obserwowanych na żelu. Prążek na wysokości 252 pz jest odpowiedni dla ludzkiej ataksyny, natomiast prążek na wysokości 197 pz odpowiada wielkości ataksyny mysiej.

Do oznaczenia ilości powtórzeń CAG u modelowych myszy wykonano reakcje łańcuchowej polimerazy z zestawem starterów: znakowanym 6-FAM GGAAGAGACGAGAAGCCTAC i TCACCTAGATCACTCCCAAGT. Pozostałe składniki mieszaniny reakcyjnej były takie same jak przedstawione w **Tabeli 13**.

Program reakcji PCR CAG:

5 min 94°C

30× (20 s 94°C, 10 s 60°C, 30 s 72°C)

7 min 72°C

4°C ∞

Następnie przeprowadzono elektroforezę kapilarną używając ABI 3130xl Analizer przez Laboratorium Technik Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Wynik elektroforezy kapilarnej przeanalizowano w programie Peak Scanner 1.0 (Life Technologies, Carlsbad, USA) z zastosowaniem krzywej kalibracyjnej, na którą składają się z oznaczone sekwencji fragmentów o długości 21, 69, 81, 91 i 97 powtórzeń CAG.

6.2.3. Iniekcje retro-orbitalne

Myszy wprowadzono w stan głębokiej anestezji wziewnej przez cały czas wykonywanej procedury. Jeżeli zwierzę nie wykazywało reakcji na bodźce, umieszczono je w pozycji bocznej na macie grzewczej. Skórę w okolicach oka naciągnięto, aby oko wystawało z oczodołów. Iglę z reagentem wprowadzono pod kątem 45° do zatoki oczodołowej (ang. *retroorbital sinus*). Następnie zamknięto powiekę i obserwowano miejsce iniekcji. W przypadku braku wycieku substancji lub krwawienia, mysz została umieszczona z powrotem w klatce. Klatka znajdowała się na macie grzewczej. Zwierzęta poddawano dalszej obserwacji.

6.2.4. Operacje stereotaktyczne

Myszy zostały poddane głębokiej anestezji wziewnej na czas przeprowadzenia całej procedury. Oceniono ich reakcję na bodźce, a jeśli nie zaobserwowano u zwierzęcia odruchów, zostało ono unieruchomione na ramce stereotaktycznej. Głowę zwierzęcia unieruchomiono za pomocą dousznych kołków i stożka donosowego z uchwytym na górne zęby. Obszar zabiegowy poddano dezynfekcji, a następnie osłoniętą folią w celu ograniczenia ryzyka zakażenia. Aby zapobiec wysychaniu oczu, zastosowano środek nawilżający. W celu utrzymania odpowiedniej temperatury ciała zwierzęcia użyto podgrzewanej maty, a kontrolę temperatury przeprowadzano za pomocą termometru rektalnego. Usunięto sierść z miejsca iniekcji. Skórę oczyszczono jodyną, a następnie wykonano nacięcie. Bregma stanowiącą punkt odniesienia dla procedury iniekcji śródmiażdżowych (intraparenchymalnych) uwidoczniona została za pomocą wody utlenionej. Przy użyciu aparatu stereotaktycznego i oprogramowania ATLAS określono współrzędne (**Tab. 13**), w których nawiercono otwór w czaszce. Reagenty wprowadzono za pomocą pomp infuzyjnych (KD Scientific Inc., Holliston, Stany Zjednoczone) ze stałą prędkością 0,3 µl/min. Skórę głowy zszyto rozpuszczalnymi nićmi chirurgicznymi, a na

ranę nałożono maść z antybiotykiem. Myszy umieszczono z powrotem w klatce, która znajdowała się na macie grzewczej. Zwierzęta monitorowano po operacji i podano im podskórną dawkę środka przeciwbólowego.

Tabela 14. Koordynaty do iniekcji lokalnych

Iniekcje do prążkowania (STR)			Iniekcje do prążkowania (STR)			Iniekcje do jąder głębokich mózdzku (DCN)		
ML	AP	DV	AP	DV	ML	DV	ML	AP
-1,8	0,7	-3,9	-1,0	-0,2	-2,0	-1,2	-6,4	-3,0
1,8	0,7	-3,9	-1,0	-0,2	-2,0	1,2	-6,4	-3,0

6.2.5. Ocena fenotypu

Testy punktowej oceny fenotypu

PST (ang. *phenotype score test*) zaprojektowano do oceny choroby poliQ (Guyenet i in., 2010). Test przeprowadzono dzień przed iniekcją oraz w dniu poświęcenia zwierząt (15 tygodni po wstrzyknięciu). Test punktowej oceny fenotypu obejmuje cztery testy:

- chód (ang. *gait*)
- test krawędzi (ang. *ledge test*)
- kifoza (ang. *kyphosis*)
- chwytanie kończyn tylnych (ang. *hindlimb clasping*)

Każdy z czterech testów składał się na ogólny wynik testu, który waha się od 0 do 12, reprezentując całkowitą ocenę fenotypową. Indywidualnie, każdy test został oceniony w skali od 0 do 3 (0 = brak objawów fenotypowych, 1 = lekkie objawy fenotypowe, 2 = średnie objawy fenotypowe, 3 = duże objawy fenotypowe).

Ocena drżenia

Oceny drżenia dokonywano, obserwując myszy co tydzień przez 3 lub 15 tygodni w tych samych warunkach eksperymentalnych. Zastosowano następującą skalę: (-) brak drżenia, (+) drżenie obserwowane podczas przenoszenia, (++) drżenie okolicy głowy,

(+++) drżenie całego ciała. W przypadku ostrego i postępującego pogarszania się stanu myszy, eksperyment zakończono przed czasem.

6.2.6. Monitorowanie masy ciała myszy oraz waga organów

Myszy biorące udział w doświadczeniach regularnie obserwowano, a ich masę ciała monitorowano. Pomiar masy ciała przeprowadzano w określonych punktach czasowych: od dnia poprzedzającego iniekcję reagentem, do dnia, w którym zwierzę zostało poświęcone (15 tydzień po iniekcji). Po uśmierceniu zwierząt zważono poszczególne organy, takie jak mózg, serce, śledzionę i jądra.

6.2.7. Pobór tkanek

Myszy zostały poddane znieczuleniu za pomocą głębokiej anestezji wziewnej na czas przeprowadzenia całej procedury. Sprawdzone ich reakcje na bodźce i jeśli nie zaobserwowano odruchów, mysz unieruchomiono w pozycji grzbietowej. Następnie dokonano nacięcia przez powłoki zewnętrzne, jamę brzuszną, przeponę, żebra, aż do jamy opłucnej i serca. W lewej komorze serca umieszczono igłę, pobrano około 1 ml krwi, a następnie podano 20 ml roztworu PBS o temperaturze 4°C. Jednocześnie nacięto wątrobę, aby kontrolować wypływ krwi i kolor wątroby. Dodatkowo, u myszy przeznaczonych do badań immunopatologicznych przeprowadzono perfuzję 4% roztworem PFA o temperaturze 4°C. Następnie zwierzę poddano dekapitacji, pobrano mózg i inne organy. Odpowiednie organy zważono. W zależności od kierunku badań, tkanki umieszczono w 4% roztworze PFA o temperaturze 4°C lub przeprowadzono dyssekcję mózgu na poszczególne struktury, które szybko zamrożono w ciekłym azocie.

Tkanki i struktury mózgu pobrane od myszy to: opuszki węchowce, kora mózgu, płat czołowy, prążkowie, hipokamp, wzgórze, podwzgórze, międzymózgowie, pień mózgu, mózdzek, wątroba, śledziona, jądra i serce.

6.2.8. Biochemia z krwi

Myszom znieczulonym izofluranem pobrano krew z lewej komory serca. Krew pełną odwirowano w celu oddzielenia surowicy od skrzepu. Analizę surowicy przeprowadzono w celu określenia zawartości cholesterolu całkowitego (chol), trójglicerydów (TG), aminotransferazy asparaginianowej (AST), aminotransferazy alaninowej (ALT),

magnezu (Mg), wapnia (Ca) i kinazy kreatynowej (CK-MB) w Laboratorium Biochemii i Hematologii w Centrum Zaawansowanych Technologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

6.2.9. PCR w czasie rzeczywistym

6.2.9.1. Izolacja RNA i oznaczenie stężenia

Tkanki mózgowe pobrano podczas selektywnej dysekcji do próbek z odpowiednią ilością (zależną od struktury) TriReagentu (MRC, Cincinnati, OH, USA) i zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temp. -80°C . W celu izolacji RNA, tkanki powoli rozmrożono i poddano homogenizacji z użyciem Tissue Ruptor (Qigen, Hilden, Niemcy). Parametry homogenizacji ustawiono zgodnie z zaleceniami producenta. Do próbek dodano TRIreagent do sumarycznej jego objętości 1 ml i 200 μl chloroformu. Probówki zworteksowano i poddano inkubacji przez 15 min w temperaturze pokojowej, a następnie zwirowano przez 15 min, 12000 g, w temp 4°C . Po zakończeniu wirowania roztwór rozdzielił się na warstwy. Warstwę bezbarwną przeniesiono do nowej próbki, dodano 0,5 ml izopropanolu, wymieszano, poddano inkubacji przez 10 min w temperaturze pokojowej i zwirowano 10 min, 12000 g, w 4°C . Usunięto supernatant, a powstały pelet zawieszono w 75% etanolu 1 ml i zwirowano przez 5 min w temp 4°C . Powstałe RNA osuszono w temp. 37°C i zawieszono w 40 μl wody (EURx, Gdańsk, Polska).

6.2.9.2. Synteza cDNA

Wykonano oznaczenie stężenia i czystości RNA za pomocy spektrofotometru NanoDrop przy długości fali 230 nm, 260 nm i 280 nm. Do przeprowadzonych analiz wykorzystano RNA, których wartość absorbancji A_{260}/A_{280} była w zakresie 1,7-2,1, a A_{260}/A_{230} była >2 .

500 ng całkowitego RNA przepisano na cDNA przy użyciu odwrotnej transkryptazy MultiScribe™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) zgodnie z protokołem producenta. Przygotowano 2-krotnie stężony RT master mix oraz zestaw starterów dla HTT: GAGCCGCTGCACCGAC i CTGACAGACTGTGCCACTATGTTT oraz dla ATXN3: CGCAGGGCTATTCAGCTAAG i GCTTTTGCTGCTGTTTTTCA.

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej syntezy cDNA (na 1 reakcje)

Składniki	Objętość
2x RT master mix	6,8 μ L
RNA	1000 ng
H2O wolna od nukleaz	do 20 μ L

Program reakcji PCR RT:

25°C 10 min

37°C 120 min

85°C 5 min

4°C ∞

6.2.9.3. qPCR

Przeprowadzono amplifikacje otrzymanego cDNA w systemie detekcji CFX Connect real-time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA). Mieszanina reakcyjna składała się z 2x EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), matrycy oraz pary specyficznie zaprojektowanych starterów. Zaprojektowano je za pomocą bazy sekwencji nukleotydowych NCBI przy użyciu komercyjnego programu Primer-BLAST (Tab. 5). Jako gen referencyjny zastosowano β -aktynę. RT-PCR przeprowadzono w warunkach cyklu termicznego: denaturacja w 95°C przez 30 s, a następnie 40 cykli denaturacji w 95°C przez 15 s, przyłączenie w 60°C przez 30 s. Następnie nastąpił odczyt płytki oraz krzywa topnienia: 65°C \rightarrow 95°C (0,5°C/s). Wydajność amplifikacji par starterów oznaczono poprzez rozcieńczenia matrycy. Wyznaczono do tego krzywą regresji, z wykorzystaniem współczynnik nachylenia prostej i kilku punktów pomiarowych. Wartości względnej ekspresji transgeny liczone metodą E, w której gen β -aktyny posłużył do normalizacji wraz z badanymi genami *HTT* oraz *ATXN3*. Poziomy ekspresji mRNA znormalizowano do myszy kontrolnych Scrambled.

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR (na 1 reakcje)

Składniki	Objętość
2x EvaGreen Supermix	9 μ l
cDNA	1 μ l
Startery	200 nM każdy

6.2.10. Western blotting

6.2.10.1. Lizowanie tkanek i pomiar stężenia białka

Tkanki mózgowe pobrano podczas selektywnej dysekcji, a następnie zanurzone w ciekłym azocie (temperatura -196°C). Próbkę przechowywano w temperaturze -80°C . W procesie izolacji białek, tkankę zawieszono w 250-500 μl (w zależności od wielkości struktury) w buforze PB z dodatkiem PIC (Roche) i poddano inkubacji przez 2 godziny w temperaturze 4°C . Następnie przeprowadzono sonikację za pomocą sonikatora Sonoplus mini 20 (Bandelin) z zastosowaniem następujących parametrów: 10 s, 80% mocy, 1-2 cykle. Próbkę zwirowano przez 5 minut przy 14000 obr./min w temperaturze pokojowej oraz denaturowano przez 7 minut w temperaturze 95°C .

Stężenie białka otrzymanych lizatów mierzono za pomocą zestawu Pierce™ BCA Protein Assay Kit zgodnie z instrukcją producenta, przy użyciu czytnika Infinite 200 PRO NanoQuant Plate™ (Tecan) przy długości fali 562 nm. Stężenie białka oznaczono na podstawie krzywej standardowej stężenia BCA sporządzonej dla 5 stężeń białka wzorcowego.

6.2.10.2. Przygotowanie prób oraz elektroforetyczny rozdział białka w warunkach denaturujących

Próby przygotowano do rozdziału poprzez doprowadzenie ich do pożądanej ilości, odpowiadającej 20-25 μg białka. Poprzez dodanie do lizatów białkowych odpowiednią ilość PB oraz 3x stężonego buforu obciążającego. Próbkę zdenaturowano przez 5 min w temp. 95°C .

Elektroforetyczny rozdział białek prowadzono w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących stosując żel rozdzielający i żel zagęszczający. Dla myszy HD zastosowano żel komercyjny NuPAGE™ 3-8 %, Tris-Acetate (Invitrogen™); natomiast dla myszy SCA3 rozdział nastąpił na żelu komercyjnym BIO-RAD Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels, 4-15 % (Bio-Rad Laboratories)

Elektroforezę prowadzono przez 10 min przy napięciu 80V, a następnie podwyższono wartość napięcia do 200V. Rozdział elektroforetyczny trwał 1-2 godzin w zależności od badanego białka w aparacie Mini-Protean® Tetra (Bio-Rad) lub Mini Gel Tank (Invitrogen). Do określenia masy molekularnej badanych białek wykorzystano marker

wielkości białek Pageruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific), o zakresie od 10 kDa do 180 kDa.

6.2.10.3. Transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową

Mokry transfer białek na membranę wykonano przy użyciu Mini Trans-Blot® Module (Bio-Rad). Membranę nitrocelulozową zawierającą pory o wielkości 0,45 μm (Amersham™Protran™; GE Healthcare) i bibułę Whatman przycięto do rozmiaru żelu poliakrylamidowego. Membranę nitrocelulozową aktywowano przez 1 min w wodzie, a następnie gąbki do transferu, bibułę Whatman, żel oraz membranę inkubowano w roztworze do transferu przez 10 min. Na kasecie do transferu zanurzonej w roztworze 1x Towbinu umieszczono w następującej kolejności: gąbkę, 3x bibuły Whatmann, żel poliakrylamidowy, membranę nitrocelulozową, 3x bibuły Whatmann i gąbkę. Kasetkę umieszczono pomiędzy elektrodami w aparacie do mokrego transferu wypełnionego buforem. Transfer mokry prowadzono przez 1,5 godz., przy 90 V, w temp 4°C. Efektywność transferu była sprawdzana poprzez barwienie roztworem Ponceau S.

6.2.10.4. Detekcja białek

Białka przepłukano trzykrotnie w 1x TBS-T przez 10 min w celu usunięcia roztworu Ponceau S. Membranę zablokowano przez godzinę w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w buforze TBS-T, aby uniknąć wiązania się białek w miejscach niespecyficznych. Kolejno membranę ponownie przepłukano 3x TBS-T przez 10 min i inkubowano przez całą noc w temp. 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym (**Tab. 10**). Przeciwciało rozpuszczono w roztworze TBS-T z 5% mlekiem odtłuszczonym. Następnie membranę ponownie przepłukano trzykrotnie w roztworze TBS-T i poddano godzinnej inkubacji z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym, sprzężonym z peroksydazą chrzanową i rozpuszczonym w roztworze TBS-T z 5% mlekiem odtłuszczonym (**Tab. 7**). Po zakończonej inkubacji, membranę przepłukano trzykrotnie w TBS-T przez 10 min. Przeprowadzono detekcję białek stosując substrat dla peroksydazy chrzanowej (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Zarejestrowano sygnał przy użyciu systemu G:box.

6.2.11. Barwienia immunofluorescencyjne

6.2.11.1. Przygotowanie skrawków mózgu oraz wątroby na kriostacie

Tkanki utrwalono przez noc w 4% PFA, a następnie poddano kriokonserwacji poprzez umieszczenie w roztworze sacharozy o gradientowym stężeniu: 10%, 20%, 30% przez 24 godziny każde lub 22% przez 72 godziny w temperaturze 4 °C. Mózgi i wątroby zatopiono w medium do zamrażania tkanek w OCT (ang. *Tissue Freezing Medium*, Leica) i zamrożono w suchym lodzie. Na kriostacie cięto skrawki wybranych narządów w temperaturze -20°C. Sagitalne skrawki o grubości 20 µm zebrano na szkiełka SuperFrost Plus (Thermo Fisher Scientific). Skrawki przechowywano w temperaturze -80°C i pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu przez 10 minut przed przystąpieniem do barwienia immunohistochemicznego.

6.2.11.2. Immumofluorescencja

Skrawki poddano inkubacji w buforze cytrynianowym o pH 9,0 (**Tab. 9**) przez 15 minut w temperaturze 90°C oraz inkubacji przez 10 minut w temperaturze -20 °C. Szkiełka z tkanką zostały zablokowane w 4% roztworze normalnej surowicy koziej (ang. *Normal Goat Serum*: NGS) w PBS przez 1 godzinę. Następnie skrawki mózgu były inkubowane z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym w temperaturze 4°C przez noc (**Tab. 10**). Skrawki poddano trzykrotnym płukaniu roztworem PBS oraz inkubacji z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym znakowanym AlexaFluor647 lub Cy3 (**Tab. 10**). Kolejno, skrawki mózgowi wybarwiono kontrastowo Hoechst33342 (Sigma Aldrich) i przykryto szkiełkiem nakrywkowym za pomocą Medium Montażowego Fluoroshield (Sigma Aldrich). Skrawki pociętej wątroby również wybarwiono Hoechst33342 (Sigma Aldrich) oraz przykryto szkiełkiem nakrywkowym za pomocą Medium Montażowego Fluoroshield (Sigma Aldrich). Obrazy mikroskopowe zostały zarejestrowane przy użyciu systemu mikroskopowego Opera LX (PerkinElmer). Zdjęcia przetwarzano przy użyciu oprogramowania ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda).

6.2.11.3. Wizualizacja biodystrybucji eGFP oraz wybranych markerów neurologicznych na skrawkach mózgu myszy

Wizualizacje obrazów mózgu uzyskano przy użyciu mikroskopowego systemu Opera LX (PerkinElmer) z zastosowaniem różnych obiektywów: 20x, 40x, 63x. Przy dwóch największych obiektywach zastosowano immersję wodną. Parametry lasera podczas wykonywania zdjęć wynosiły 50-70%, zdjęcia nakładano na poziomie 0-10% (ang. *overlapping*), czas ekspozycji wynosił 100 ms. Zdjęcia z mikroskopu obrabiano za pomocą oprogramowania ImageJ z wtyczką BIOP (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

6.2.11.4. Natężenie fluorescencji

Fluorescencja głównego natężenia sygnału eGFP określono ilościowo dla jednakowych obszarów we wszystkich strukturach. Łączną intensywność fluorescencji obliczono z jednakowej powierzchni dla wszystkich struktur. Wybrane obszary zostały wytypowane z uwzględnieniem obecności sygnału eGFP. Obliczono jaki procent zajmowały agregaty względem całego pola powierzchni. W tych samych obszarach wyselekcjonowanych na podstawie wyznakowania eGFP pomierzono średnią gęstość optyczną agregatów. Zastosowane parametry były spójne dla wszystkich struktur.

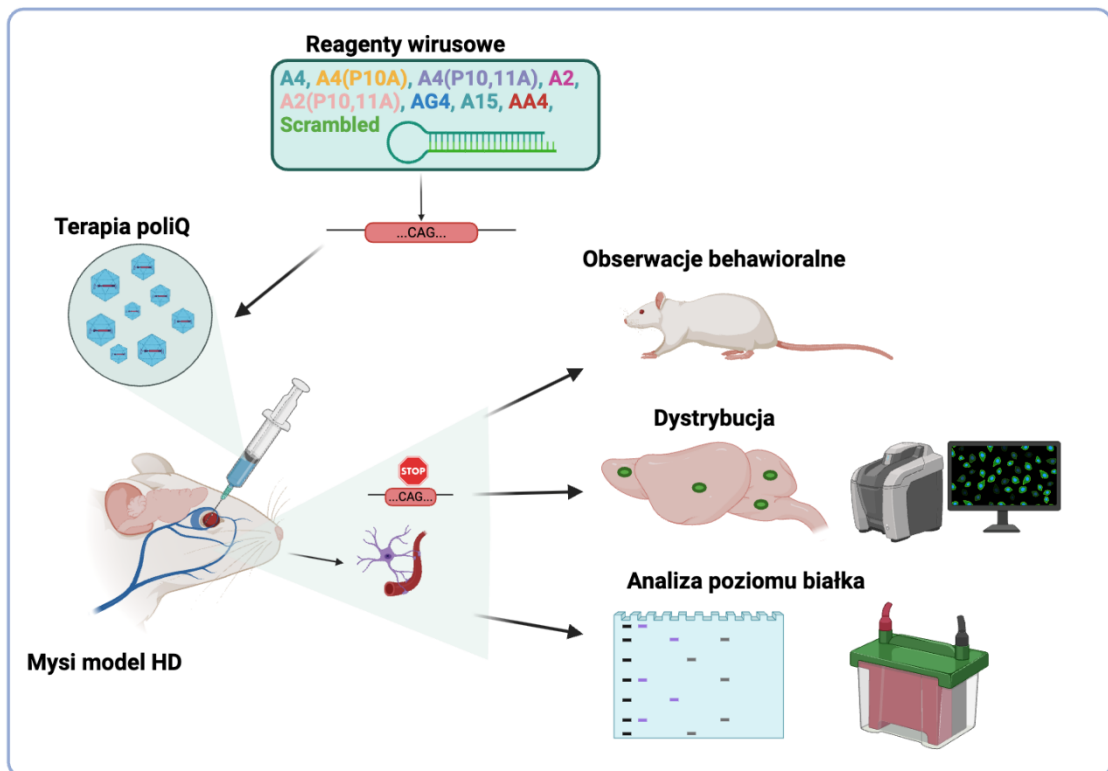
6.2.12. Statystyka

Każdy eksperyment został powtórzony co najmniej trzykrotnie. Analizę uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism (wersja 8.0.1.). Dla każdego eksperymentu testy statystyczne zostały określone w legendach do rysunku. Wszystkie dane przedstawiono jako średnie i jako krotność zmiany poziomu białka lub mRNA (Scrambled i odpowiedni reagent). Słupki błędów reprezentują standardowe średnie błędów (\pm SEM).

7. Wyniki

7.1. Walidacja efektywności shRNA celujących w ciąg CAG w eksperymencie krótkoterminowym

Osiem reagentów poddano wstępnej ocenie *in silico*, która miała na celu określenie potencjalnych miejsc ich wiązania z innymi RNA niż docelowe (ang. *off-target*). Oceniono wpływ shRNA na sprawność motoryczną, dystrybucję oraz efekty terapeutyczne w 3–tygodniowym eksperymencie *in vivo*. W wektorze wirusowym AAV–PHP.eB umieszczono konstrukty reagentów shRNA: A4; A4(P10A); A4(P10,11A); A2; A2(P10,11A), AG4, AA4, A15 oraz kontrolny shScrambled (Tab. 3).

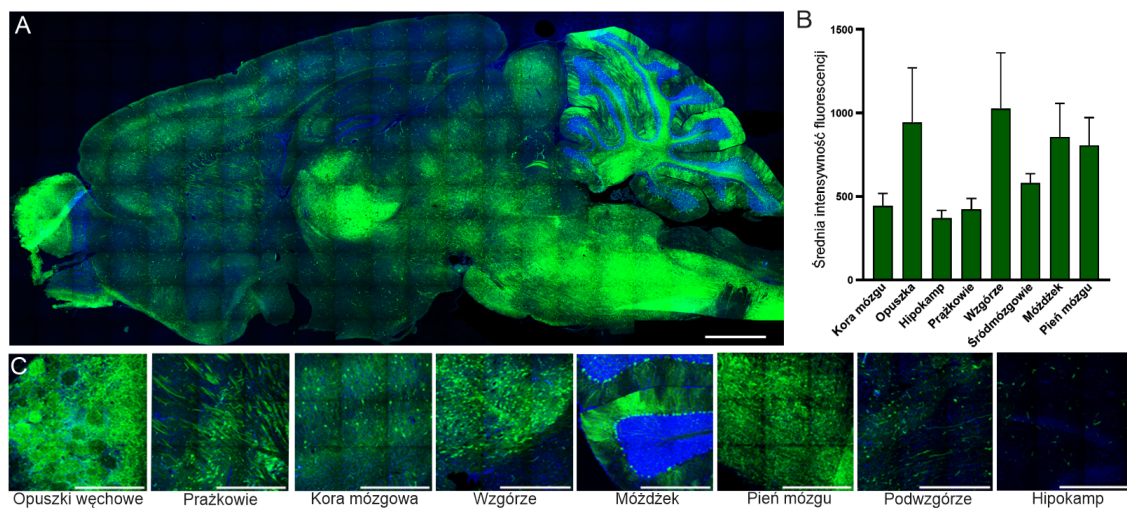


Rysunek 4. Schemat eksperymentów krótkoterminowych. Iniekcje reagentami AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA mysiego modelu HD na okres 3 tygodni oraz kierunki badań

7.1.1. Ocena dystrybucji po wstrzyknięciu AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA

W pierwszym podejściu eksperymentalnym oceniono skuteczność dystrybucji i transdukcji struktur mózgu mysiego modelu choroby poliQ po 3 tygodniach od systemowych iniekcji 8 nowych reagentów AAV–PHP.eB_eGFP_shRNA oraz reagenta kontrolnego shScrambled. Zwierzętom Hu^{128Q/21Q} wstrzyknięto do zatoki oczodołowej

wektor wirusowy zawierający sekwencję kodującą eGFP wraz z jedną z 9 sekwencji shRNA w dawce $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg dla wszystkich reagentów (z wyjątkiem A2 w dawce $0,5 \times 10^{13}$ vg/kg). Potwierdzono zdolność wektora AAV- PHP.eB do pokonania bariery krew-mózg, analizując sygnał eGFP w przekroju sagitalnym mózgu. Sygnał zielonego białka fluorescencji zaobserwowano w opuszce węchowej, korze mózgowej, prążkowie, hipokampie, wzgórzu, śródmózgowiu, mózdzku i pniu mózgu (**Rys. 5 A, C**). Oceniono średnią intensywność fluorescencji (3 tygodnie po iniekcji) w poszczególnych strukturach mózgu, wyrażono ją w jednostkach powierzchni (a.u.). Ocena średniej sygnału fluorescencji w poszczególnych strukturach mózgu wykazała, że opuszka węchowa (943 j.m.), wzgórze (1025 j.m.), mózdzek (857 j.m.) i pień mózgu (807 j.m.) charakteryzowały się wyższą intensywnością sygnału eGFP niż pozostałe cztery struktury (kora mózgowa, podwzgórze, prążkowie, śródmózgowie) (**Rys. 5 B**). Wyniki pokazują wysoki tropizm serotypu AAV- PHP.eB do komórek mózgu.



Rysunek 5. Ocena dystrybucji wektora AAV- PHP.eB _eGFP_shRNA w mózgu mysiego modelu HD 3 tygodnie po iniekcji.

(A) sagitalny przekrój mózgu mysiego modelu $\text{Hu}^{128\text{Q}/21\text{Q}}$ pokazujący intensywność fluorescencji eGFP; (B) histogram pokazujący średnią intensywność fluorescencji odpowiadającą poziomowi transdukcji w ośmiu strukturach mózgu; (C) mikrografie pokazujące intensywność fluorescencji eGFP w poszczególnych strukturach mózgu. Regiony mózgu: opuszka węchowa, prążkowie, kora mózgowa, wzgórze, mózdzek, pień mózgu, podwzgórze i hipokamp. Zdjęcia pokazują eGFP (zielony) i DAPI (niebieski). Dawka $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg, N = 4. (A) Powiększenie 20x; skala 100 μm (C). Powiększenie 40x; skala 1000 μm .

7.1.2. Ocena objawów niepożądanych po wstrzyknięciu AAV- PHP.eB_eGFP_shRNA

Do oceny bezpieczeństwa stosowania nowych reagentów przeprowadzono obserwacje zachowania myszy po podaniu każdego z 8 reagentów z shRNA oraz kontrolnego Scrambled. Myszy obserwowano od dnia iniekcji do zakończenia eksperymentu. Przez pierwsze 10 dni nie zaobserwowano żadnych skutków ubocznych oraz zmienionego zachowania myszy. Natomiast od 11 dnia zauważono nasilające się drżenie u wszystkich myszy w grupach po iniekcji: A2 i A2(P10A), AG4 i AA4, co może wskazywać na toksyczność tej grupy reagentów lub podania zbyt wysokiej dla tych reagentów dawki. Do oceny stanu zwierząt po podaniu shRNA zastosowano czterostopniową arbitralną punktację: (-) brak drżenia; (+) drżenie obserwowane podczas przenoszenia; (++) drżenie okolicy głowy; (+++) drżenie całego ciała. W przypadku 3 cząsteczek z shRNA (A2, A2(P10A) i AG4) drżenie obejmowało całe ciało (+++), a w przypadku AA4 jedynie obszar głowy (++). Pozostałe 4 reagenty shRNA (A4, A4(P10A), A4(P10,11A), A15) i kontrolny Scrambled nie powodowały skutków ubocznych (-) na tym etapie eksperymentu (**Tab. 17**). Ze względu na złą kondycję myszy w 4 grupach eksperymentalnych, eksperyment zakończono po 3 tygodniach.

Tabela 17. Wynik drżenia u myszy Hu^{128Q/21Q} po 3 tygodniach od iniekcji 9 reagentów shRNA

shRNA	Ocena tremoru
Scrambled	-
A4(P10A)	-
A4(P10,11A)	-
A4	-
A2	+++
A2(P10,11A)	+++
AG4	+++
AA4	++
A15	-

(-) brak drżenia,

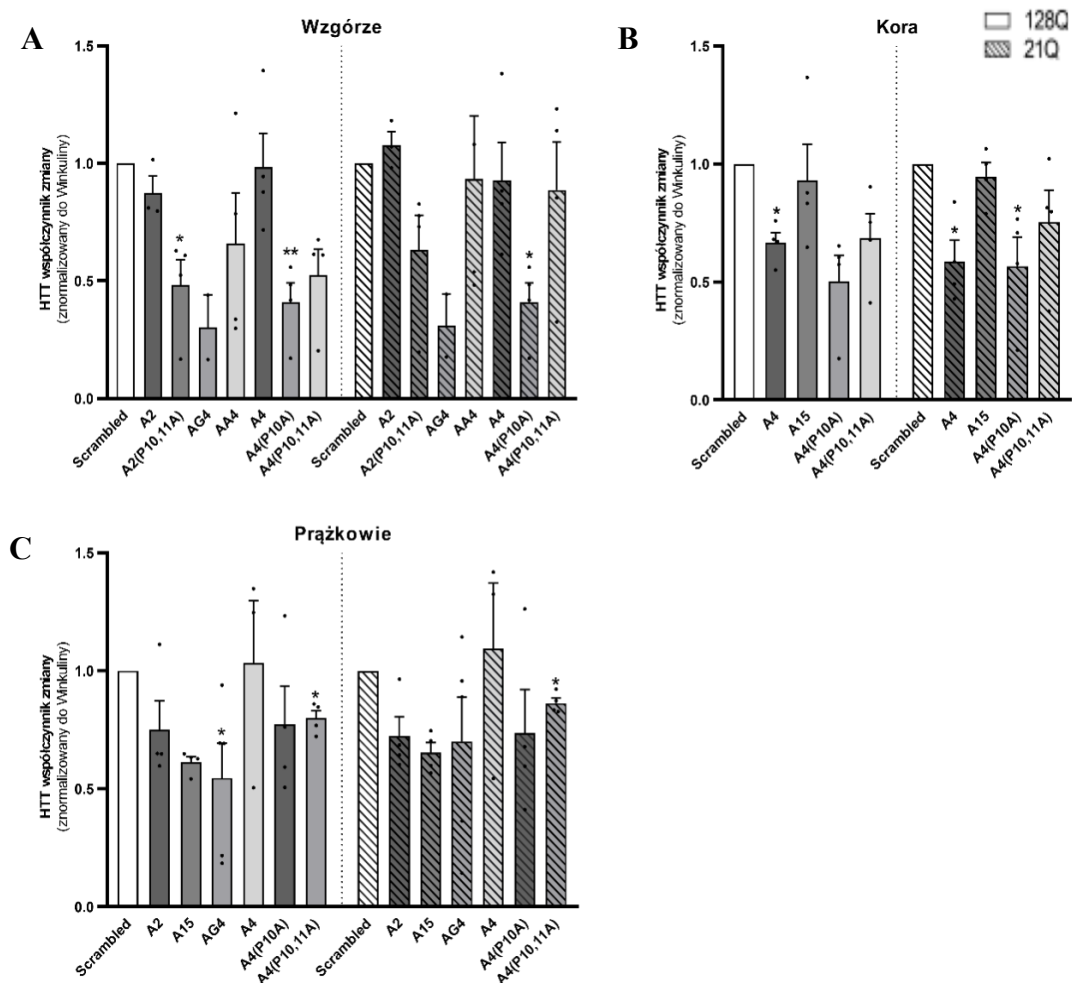
(++) drżenie w okolicach głowy,

(+++) drżenie całego ciała.

7.1.3. Krótkoterminowe badanie potencjału terapeutycznego wszystkich reagentów

Potencjalne działanie lecznicze oceniano w krótkoterminowym eksperymencie, wykorzystując technikę western blottingu. Do oceny zmiany poziomu białka huntingtyny zarówno normalnego (21Q), jak i zmutowanego (128Q) wykorzystano bialleliczny model $Hu^{128Q/21Q}$. Zbadano poziomy białka HTT w trzech strukturach mózgu po podaniu każdego z 8 reagentów shRNA, względem grupy kontrolnej Scrambled. We wzgórzu charakteryzującym się wysokim poziomem transdukcji, stwierdzono statystycznie istotne obniżenie poziomu zmutowanej huntingtyny po iniekcji reagentami A2(P10,11A) o 52% i A4(P10A) o 60% ($p = 0,0128$ i $p = 0,0085$). Natomiast pozostałe reagenty (poza A4) również charakteryzowały się tendencją do obniżania poziomu zmutowanego białka HTT: A2 o 13%, AG4 o 70%, AA4 o 34%, A4(P10,11A) o 48% (bez istotności statycznej) (**Rys. 6 A**). Spośród wszystkich 8 testowanych cząsteczek połowa wykazywała obniżenie zmutowanego białka HTT w okolicach 50% lub więcej. W prążkowie, w którym wyznakowanie eGFP było słabsze niż we wzgórzu zaobserwowano znaczącą redukcję zmutowanego białka HTT po wstrzyknięciu AG4 o 45% ($p = 0,0432$) i A4(P10,11A) o 20% ($p = 0,0423$) (**Rys. 6 C**). W korze mózgowej redukcje zmutowanego HTT zaobserwowano po podaniu cząsteczki A4 o 33% ($p = 0,0156$) oraz A4(P10A) o 50% ($p = 0,0156$) (**Rys. 6 B**).

Podsumowując w eksperymentach krótkoterminowych do dalszych badań wybrano reagenty A4(P10A) i A4(P10,11A) biorąc pod uwagę potencjał terapeutyczny w obniżaniu zmutowanego białka przy braku efektów ubocznych.

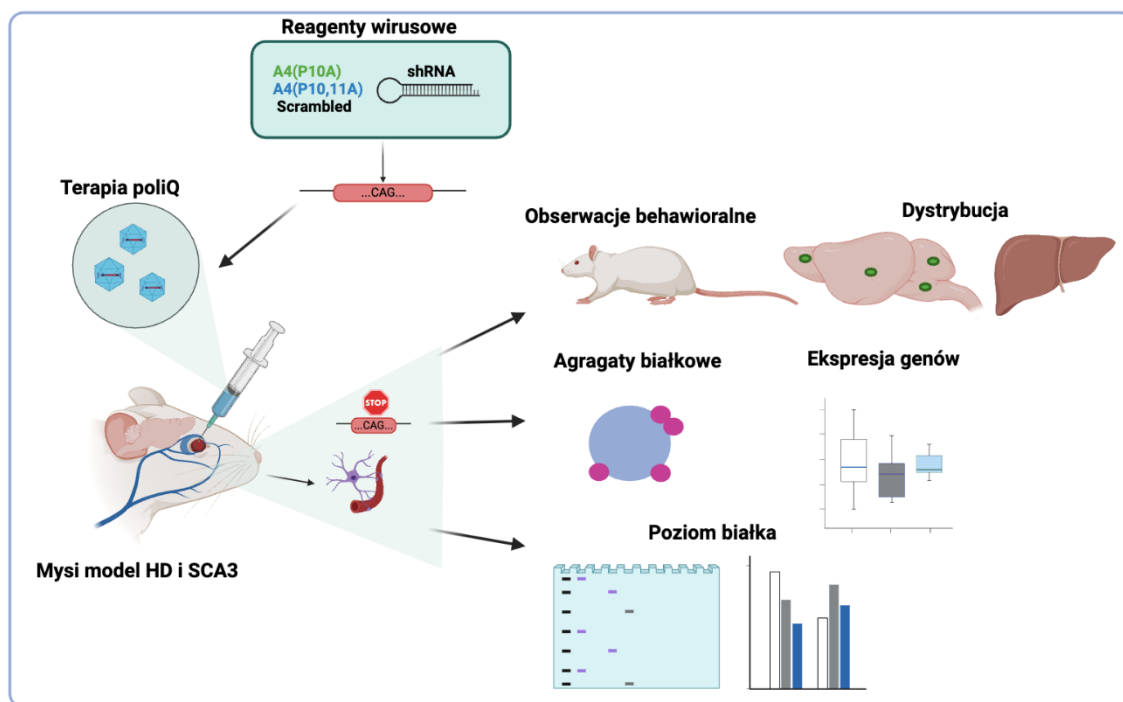


Rysunek 6. Ocena skuteczności obniżania poziomu białka HTT 3 tygodnie po iniekcji retro-orbitalnej 8 reagentów AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA.

(A) we wzgórzu (B) w korze mózgowej, (C) w prążkowie. Białko HTT znormalizowano o białko referencyjne winkulinę. Test one-way Anova i t-test jako posthoc $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=2, 3 lub 4.

7.2. Badanie długoterminowego potencjału terapeutycznego wybranych reagentów AAV-PHP.eB_A4(P10A) oraz AAV-PHP.eB_A4A4(P10,11A) na myszy model chorobowy HD i SCA3

Obiecujące reagenty AAV-PHP.eB_A4(P10A) i AAV-PHP.eB_A4(P10,11A) przetestowano w dwóch mysich biallelicznych modelach chorobowych tj. HD (Hu^{128Q/21Q}) i SCA3 (Ki^{150Q/21Q}), posiadających jeden allel zmutowany i jeden normalny w 15-tygodniowym eksperymencie długoterminowym *in vivo*. Szczegółowej ocenie poddano zachowania behawioralne myszy, monitorowano zmianę masy ciała względem grupy kontrolnej Scrambled, a *post mortem* oceniono masę organów oraz wykonano testy molekularne i biochemiczne.

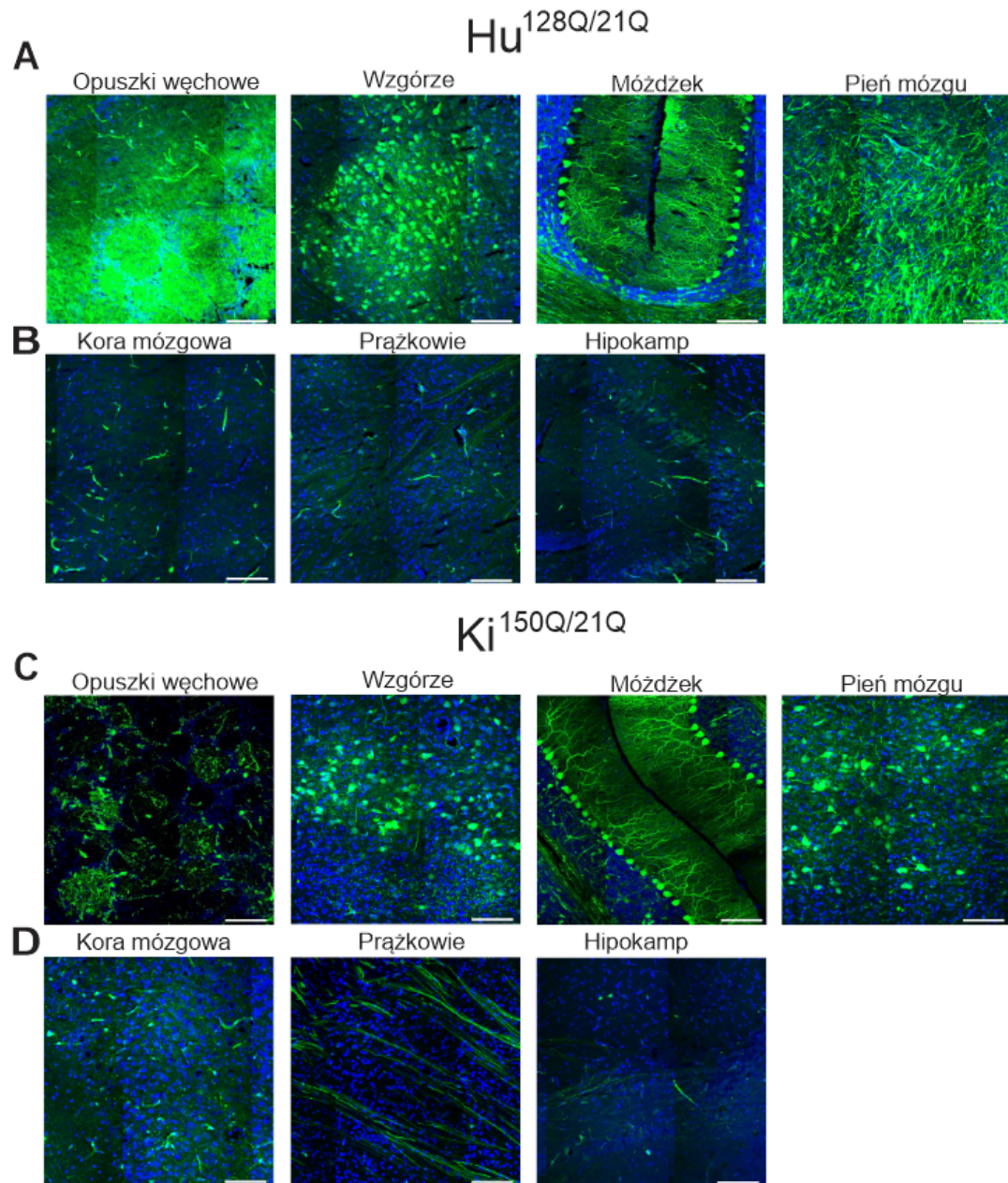


Rysunek 7. Schemat eksperymentów długoterminowych.

Iniekcje 2 wybranymi reagentami mysiego modelu HD i SCA3 w okresie 15 tygodni oraz kierunki badań.

7.2.1. Długoterminowa ocena dystrybucji wybranych reagentów AAV-PHP.eB_shRNA w mózgu mysiego modelu choroby HD i SCA3

Oceniono i porównano wzór transdukcji pomiędzy 3. a 15. tygodniem oraz poddano ocenie stabilność sygnału eGFP w czasie. Wyniki zostały podzielone na dwa panele ustalone według wcześniejszych wyników transdukcji fragmentem sekwencji genu kodującego eGFP po 3 tygodniach. Panel górny przedstawia struktury dobrze wyznakowane, a panel dolny struktury mózgu o słabszym wyznakowaniu eGFP (**Rys. 8**). W mysim modelu HD i SCA3 do struktur o dobrej transdukcji należą: opuszki węchowe, wzgórze, mózdzek i pień mózgu. Trzy obszary, tj. kora mózgu, prążkowie i hipokamp charakteryzowały się słabszą transdukcją. Obserwacje sygnału eGFP między 3. a 15. tygodniem pozwalają nam stwierdzić, że wzór transdukcji eGFP w mózgu myszy HD i SCA3 w czasie nie uległ zmianie. Podział na struktury dobrze i słabo wyznakowane w eksperymencie krótko- i długoterminowym oraz w dwóch badanych modelach chorób poliQ po podaniu retro-orbitalnym AAV-PHP.eB_eGFP był zbliżony (**Rys. 8**).

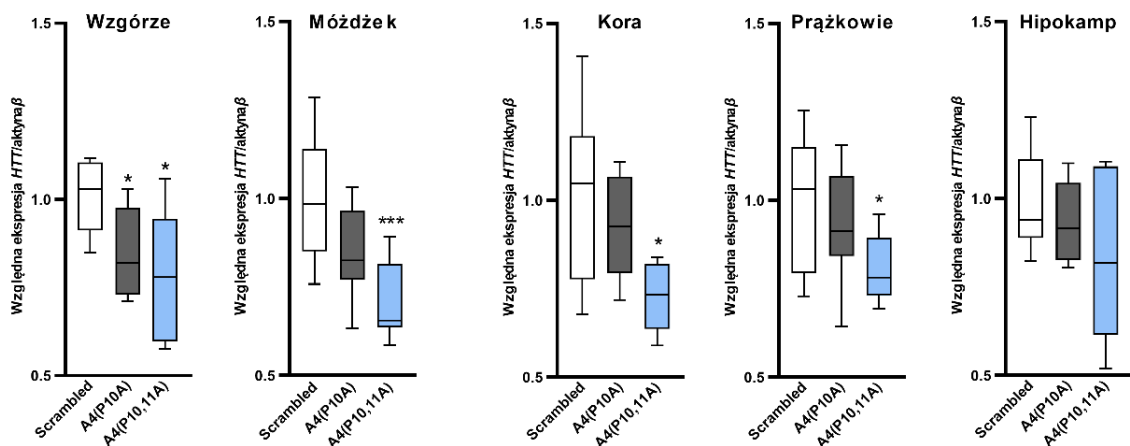


Rysunek 8. Ocena sygnału eGFP w strukturach mózgu Hu^{128Q/21Q} i Ki^{150Q/21Q} 15 tygodni po wstrzyknięciu.

Panele (A) i (C) przedstawia 4 dobrze wyznakowane eGFP obszary mózgu (opuszki węchowe, wzgórze, mózdzek i pień mózgu) w mysim modelu (A) HD i (C) SCA3; panele (B) i (D) przedstawia słabo wyznakowane obszary mózgu (korę mózgową, prążkowie i hipokamp) w mysim modelu (B) HD i (D) SCA3. Zdjęcia pokazują eGFP (zielony) i DAPI (niebieski). Dawka $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg. Powiększenie 40x; skala 1000 μ m. N=3.

7.2.2. Analiza zmiany poziomu ekspresji mRNA *HTT* w wybranych tkankach mózgowych po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A) mysiego modelu choroby HD

Oceniono efekt działania reagentów na ekspresję mRNA genu *HTT* za pomocą metody qPCR w pięciu obszarach mózgu. Wybrano dwie struktury o dobrym wyznakowaniu eGFP (wzgórze i mózdzek) oraz trzy o słabym (kora, prążkowie i hipokamp). W mysich mózgach po wstrzyknięciu shRNA zaobserwowano obniżony poziom mRNA genu *HTT* we wszystkich badanych strukturach. Statystycznie istotne różnice zaobserwowano po wstrzyknięciu A4(P10,11A). Reagent ten obniżył poziom mRNA genu *HTT* we wzgórzu o 22% ($p = 0,0220$), mózdzku o 29% ($p = 0,0009$), korze mózgowej o 27% ($p = 0,0122$) i prążkowie o 21% ($p = 0,0221$) (Rys. 9). Natomiast A4(P10A) istotnie statystycznie obniżył mRNA genu *HTT* we wzgórzu o 15% $p = 0,0311$ (Rys. 9).



Rysunek 9. Względny poziom mRNA genu *HTT* w różnych regionach mózgu modelu myszy HD po 15 tygodniach od iniekcji reagentami A4(P10A) i A4(P10,11A).

Poziomy transkryptu genu *HTT* (zmianę krotności) mierzono metodą qPCR i znormalizowano poziomem mRNA genu *Actinβ*. mRNA wyizolowano z wzgórza, mózdzku, kory mózgowej, prążkowie i hipokampu myszy Hu^{128Q/21Q}. Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=3.

7.2.3. Analiza zmiany poziomu białka HTT w wybranych tkankach mózgowych po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A) mysiego modelu choroby HD

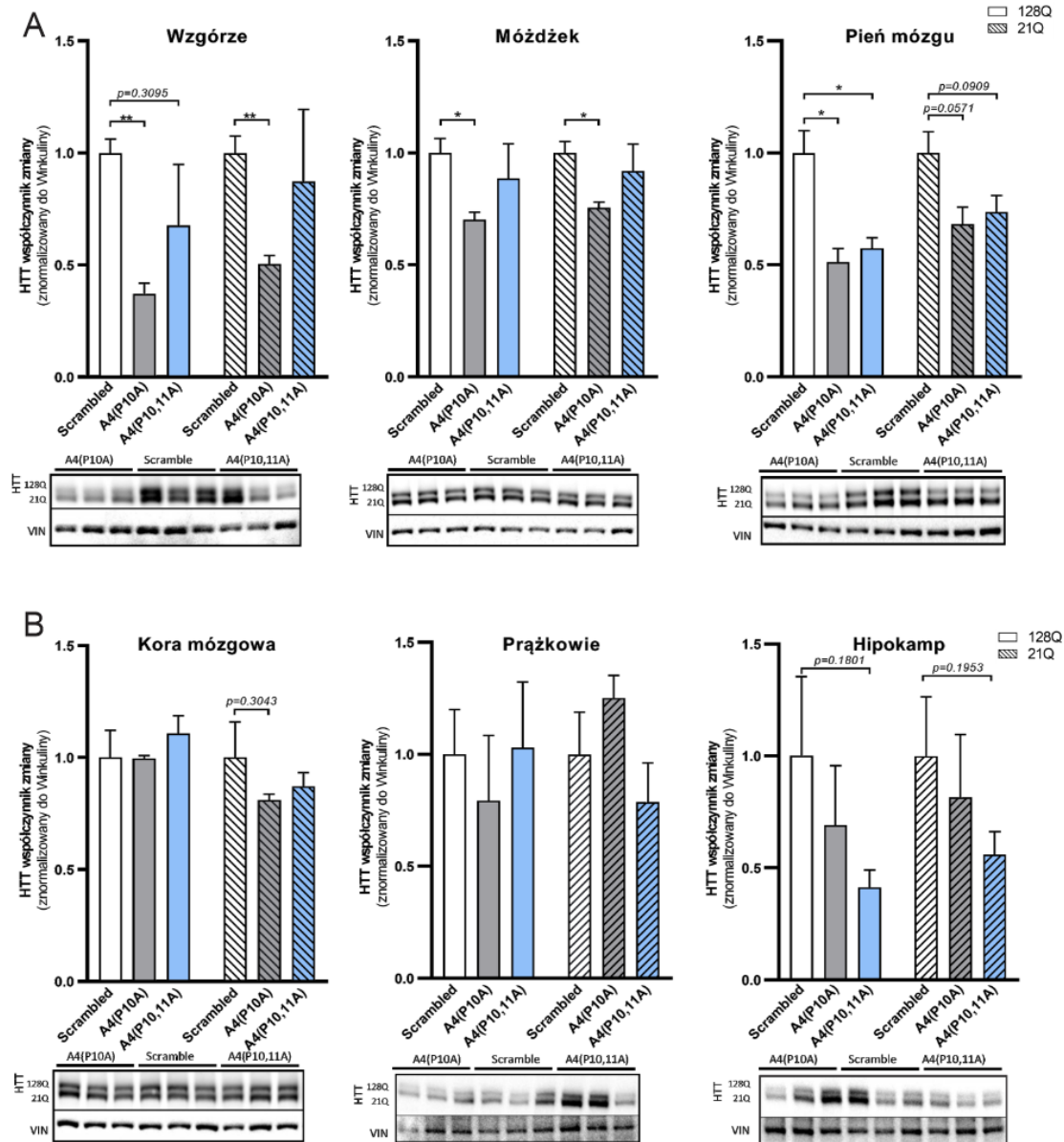
Poziomy zmutowanego i normalnego białka HTT oceniano za pomocą techniki western blotting w sześciu obszarach mózgu myszy HD, gdzie wykryto sygnał eGFP (Rys. 5).

Stosowany bialleliczny myszy model choroby HD pozwolił na ocenę zmutowanej ludzkiej HTT (128Q) oraz normalnej ludzkiej HTT (21Q). Wyniki przedstawiono uwzględniając struktury mózgu dobrze i słabo wyznakowane białkiem eGFP. We wszystkich trzech dobrze transdukowanych strukturach, tj. wzgórzu, mózdzku i pniu mózgu, zaobserwowano obniżenie poziomu zmutowanego białka (**Rys. 10 A**).

Po iniekcjach reagentem A4(P10A) obserwowano obniżenie poziomu zmutowanego białka we wzgórzu na poziomie 63% ($p = 0,0013$), w mózdzku 30% ($p = 0,0144$), a w pniu mózgu 49% ($p = 0,0137$). W porównaniu do zmutowanego białka, obniżenia poziomu normalnego białka po iniekcjach A4(P10A) wynosiły odpowiednio: 50% ($p = 0,0042$), 25% ($p = 0,0121$) oraz 32% ($p = 0,6818$).

Po iniekcji reagentem A4(P10A) w strukturach o słabym wyznakowaniu eGFP (**Rys. 10 B**) nie zaobserwowano redukcji poziomu zmutowanego białka w korze mózgowej. Natomiast w prążkowie zaobserwowano obniżenie zmutowanego HTT o 20%, a w hipokampie 30% bez istotności statystycznej.

Iniekcje drugim reagentem A4(P10,11A) wykazały obniżenie poziomu zmutowanego HTT we wzgórzu o 32%, w mózdzku o 11% (w obydwóch przypadkach nieistotne statystycznie) i pniu mózgu o 43% ($p = 0,0180$). W słabiej wyznakowanych strukturach obniżenie poziomu zmutowanego HTT zaobserwowano tylko w hipokampie (bez istotności statystycznej).

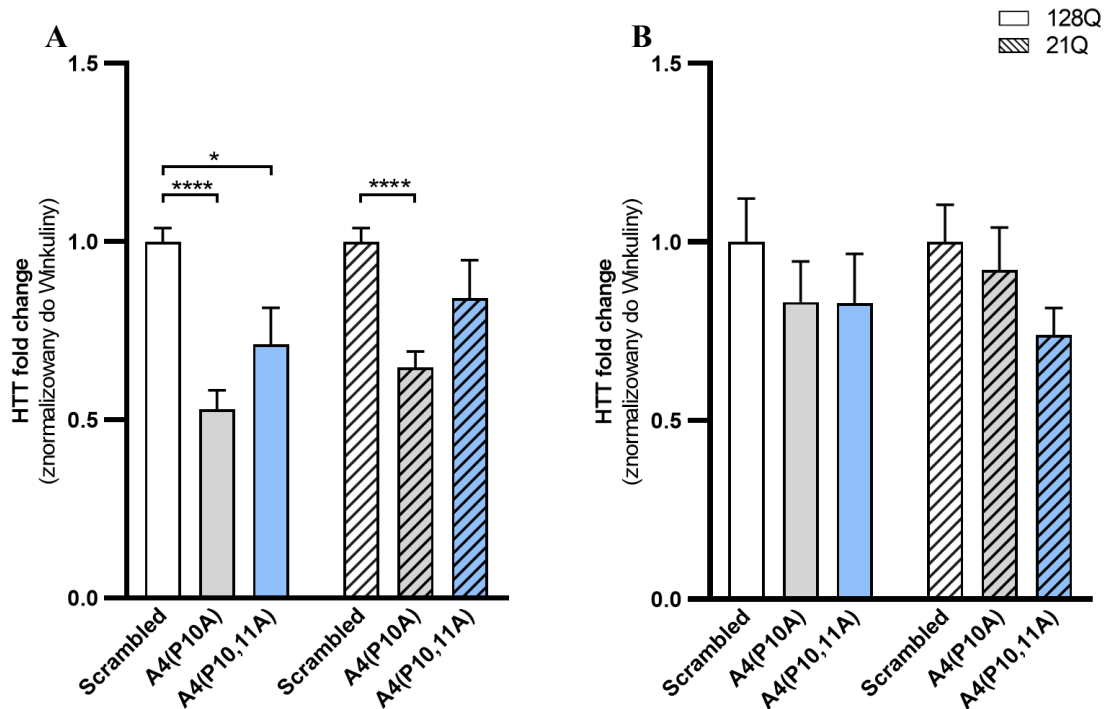


Rysunek 10. Zmiana poziomu białka HTT we wzgórzu, mózdzku, pniu mózgu, korze mózgowej, prążkowie i hipokampie myszy $Hu^{128Q/21Q}$, którym wstrzyknięto AAV-PHP.eB z ekspresją A4(P10A) i A4(P10,11A) oraz Scrambled ($1,5 \times 10^{13}$ vg/kg).

(A) Górny panel przedstawia dobrze wyznakowane eGFP struktury mózgu (wzgórze, mózdzek i pień mózgu), (B) Przedstawia słabiej wyznakowane eGFP struktury mózgu (korę mózgową, prążkowie i hipokamp). 128Q reprezentuje zmutowane białko HTT, a 21Q białko prawidłowej HTT. Białko HTT znormalizowano o białko referencyjne winkulinę. Reprezentatywne obrazy western blottingu pokazano pod wykresami. Test one-way ANOVA i t-test jako posthoc $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, $N=3$.

Dane ze struktur mózgu zagregowane zgodnie z ich poziomem wyznakowania eGFP, zarówno dla A4(P10A), jak i A4(P10,11A) pokazują znaczące obniżenie poziomu zmutowanego HTT w dobrze wyznakowanych regionach (odpowiednio o 47%,

$p < 0,0001$ i 29%, $p = 0,0181$) i brak efektu w strukturach słabiej wyznakowanych eGFP (Rys. 11).



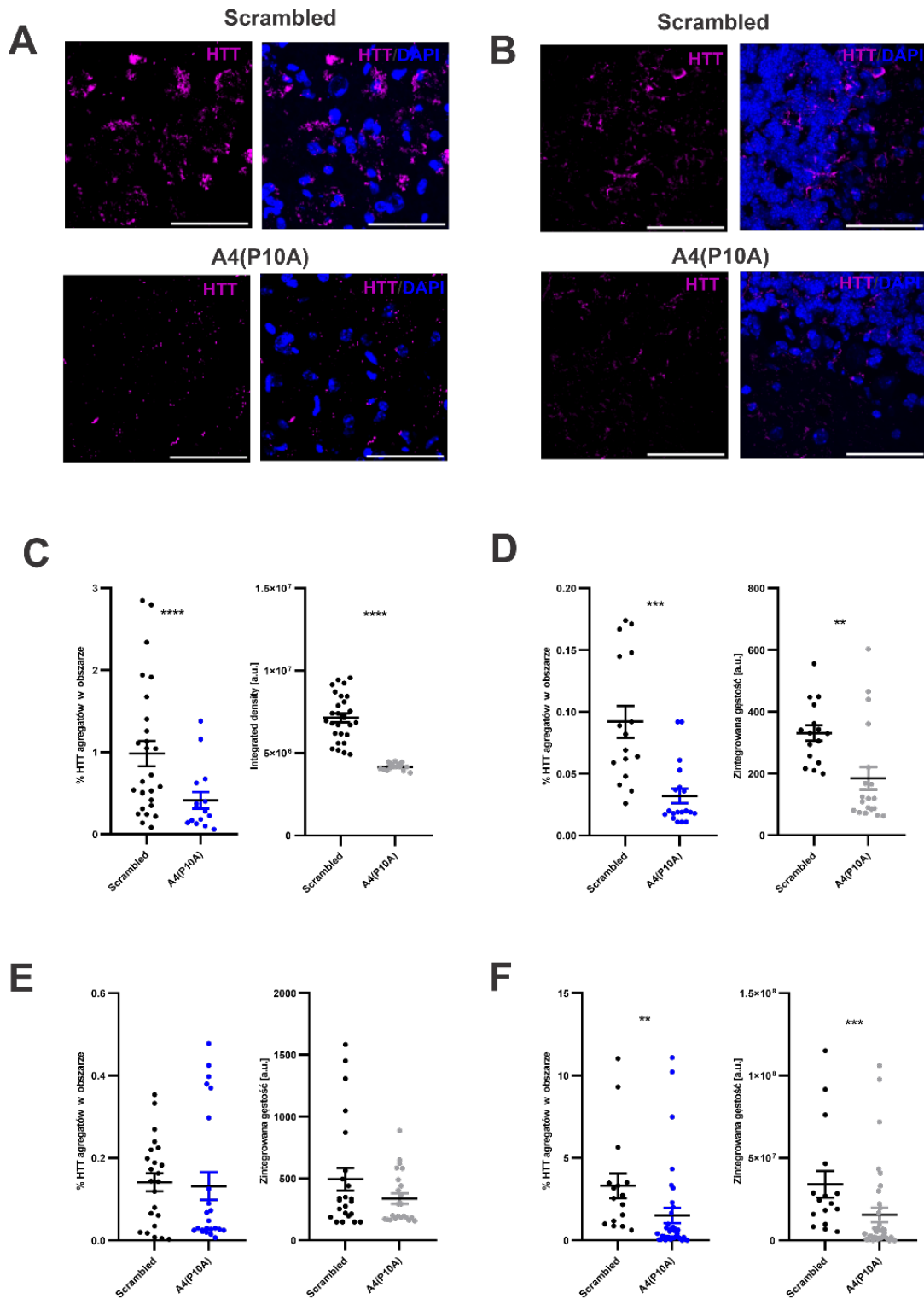
Rysunek 11. Wykresy uśrednionych zmian poziomu białka HTT dla dobrze i słabiej wyznakowanych sygnałem eGFP regionów mózgu myszy $Hu^{128Q/21Q}$, którym wstrzyknięto AAV-PHP.eB z ekspresją A4(P10A) i A4(P10,11A) oraz Scrambled ($1,5 \times 10^{13}$ vg/kg).

(A) Wykres pokazujący uśrednione dane ze struktur mózgu o dobrym stopniu wyznakowania eGFP (wzgórze, mózdzek i pień mózgu); (B) Wykres pokazujący uśrednione dane ze struktur mózgu o słabym stopniu wyznakowania eGFP (korę mózgową, prążkowie i hipokamp). 128Q reprezentuje zmutowane białko HTT, a 21Q białko prawidłowej HTT. Białko HTT znormalizowano o białko referencyjne winkulinę. Test one-way ANOVA i t-test jako posthoc $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=9.

7.2.4. Wpływ cząsteczek A4(P10A) i A4(P10,11A) na obniżenie poziomu agregatów HTT w wybranych strukturach mózgu mysiego modelu choroby HD

Przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne przy użyciu przeciwciała EM48 na skrawkach mózgu myszy HD. Największą odnotowano liczbę agregatów w obszarze pnia mózgu, prążkowie i mózdzku. Zaobserwowano istotny statystycznie spadek % agregatów w pniu mózgu ($p = 0,0142$), w prążkowie ($p < 0,0001$) oraz w mózdzku ($p = 0,0374$) (Rys. 12 C, D, F). W tych samych obszarach, w których analizowano % agregatów, obliczano także zintegrowaną gęstość agregatów. Zaobserwowano znaczną redukcję tego

parametru w pniu mózgu, prążkowie i mózdzku ($p < 0,0001$, $p = 0,0033$ i $p = 0,0347$) w grupie potraktowanej reagentem A4(P10A) w porównaniu do grupy kontrolnej Scrambled (Rys. 12 C, D, F).



Rysunek 12. Agregaty HTT w pnia mózgu, prążkowie, wzgórzu oraz mózdzku wybarwione przeciwciałem anti-HTT EM48.

Zdjęcia poglądowe pokazujące agregaty HTT (różowy) i DAPI (niebieski) w (A) pniu mózgu; (B) w mózdzku po iniekcji reagentem A4(P10A) oraz Scrambled. Wykresy przedstawiają % obszaru zajmowanego przez agregaty HTT na jednostkę powierzchni i średnią zintegrowaną gęstość optyczną agregatów w (C) pniu mózgu; (D) prążkowie; (E) wzgórzu i (F) mózdzku 15 tygodni po iniekcji. Dawka $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg. Powiększenie 40x; skala 1000 μm . Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów $\pm\text{SEM}$, $N=3$.

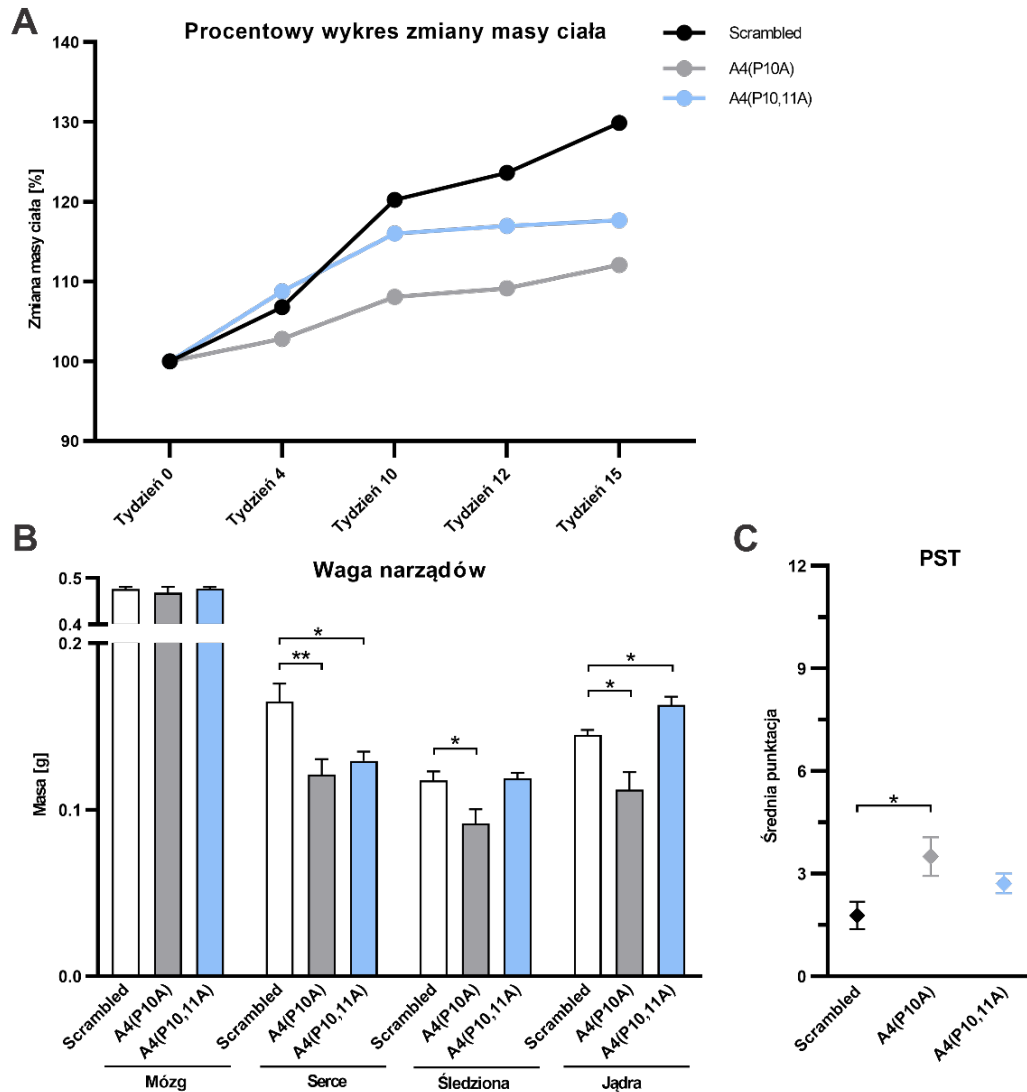
7.2.5. Zmiany fenotypowe w mysim modelu HD po retro-orbitalnych iniekcjach reagentami A4(P10A) i A4(P10,11A)

Myszy HD obserwowano pod kątem zmiany masy ciała po iniekcjach reagentami shRNA. Początkowo, w trakcie trwania eksperymentu, myszy poddane iniekcji A4(P10A) i A4(P10,11A) nie różniły się znacząco pod względem masy ciała w porównaniu do grupy, która otrzymała reagent kontrolny Scrambled. Jednak od 10. tygodnia trwania eksperymentu myszy, które otrzymywały iniekcje reagentem A4(P10A), wykazywały statystycznie istotnie mniejszy przyrost masy ciała niż grupa Scrambled. Po 15 tygodniach od operacji myszy z reagentem A4(P10A) ważyły o 22% mniej niż myszy z reagentem kontrolnym Scrambled. Natomiast myszy nastrzyknięte A4(P10,11A) wykazały o 14% niższą masę ciała niż myszy grupy kontrolnej (**Rys. 13 A**).

Pośmiertnie przeanalizowano masę narządów (mózg, serce, śledziona, jądra). Masa mózgu w modelach HD była podobna i również nie różniła się istotnie po podaniu reagentów. U myszy $\text{Hu}^{128\text{Q}/21\text{Q}}$ zaobserwowano istotne statystycznie zmiany w masie serca i jąder po wstrzyknięciu A4(P10A) i A4(P10,11A) (odpowiednio $p = 0,0087$ i $p = 0,0131$ dla serca, $p = 0,0386$ i $p = 0,0324$ dla jąder). Reagent A4(P10A) spowodował także statystycznie istotne zmniejszenie masy śledziony w modelu HD (**Rys. 13 B**).

W ocenie fenotypu na podstawie punktowanej oceny fenotypu (PST) zastosowano subiektywną skalę (patrz 6.2.5). Badanie to przeprowadzono dzień przed iniekcją myszy i wykazało pomijalny wynik (średni wynik < 1) fenotypu we wszystkich grupach doświadczalnych. Przed zakończeniem eksperymentów ponownie przeprowadzono ocenę fenotypu na podstawie punktacji. Po 15 tygodniach zaobserwowano nieznaczne pogorszenie fenotypu u pojedynczych zwierząt. W żadnej z grup eksperymentalnych średni wynik nie przekroczył 4,5 punktu w 12-punktowej skali. Statystycznie istotne pogorszenie fenotypu w porównaniu do grup kontrolnych Scrambled zaobserwowano po iniekcjach A4(P10A) ($p = 0,0233$) (**Rys. 13 C**).

U zwierząt z grupy HD z reagentami A4(P10A) oraz A4(P10,11A) po upływie 4 tygodni od iniekcji zaobserwowano lekkie drżenie podczas przenoszenia, jednak nie obserwowano dalszej progresji tego fenotypu. Podobnych objawów nie obserwowano u myszy nastrzykniętych reagentem kontrolnym Scrambled. Zastosowano subiektywną skalę (patrz 6.2.5) i ten efekt uboczny u myszy po iniekcji A4(P10A) oraz A4(P10,11A) zaklasyfikowano jako (+ ; drżenie obserwowane podczas przenoszenia).



Rysunek 13. Zmiany fenotypowe (ocena zmiany masy ciała, masy poszczególnych narządów oraz punktowa ocena fenotypu po iniekcji A4(P10A) i A4(P10,11A)

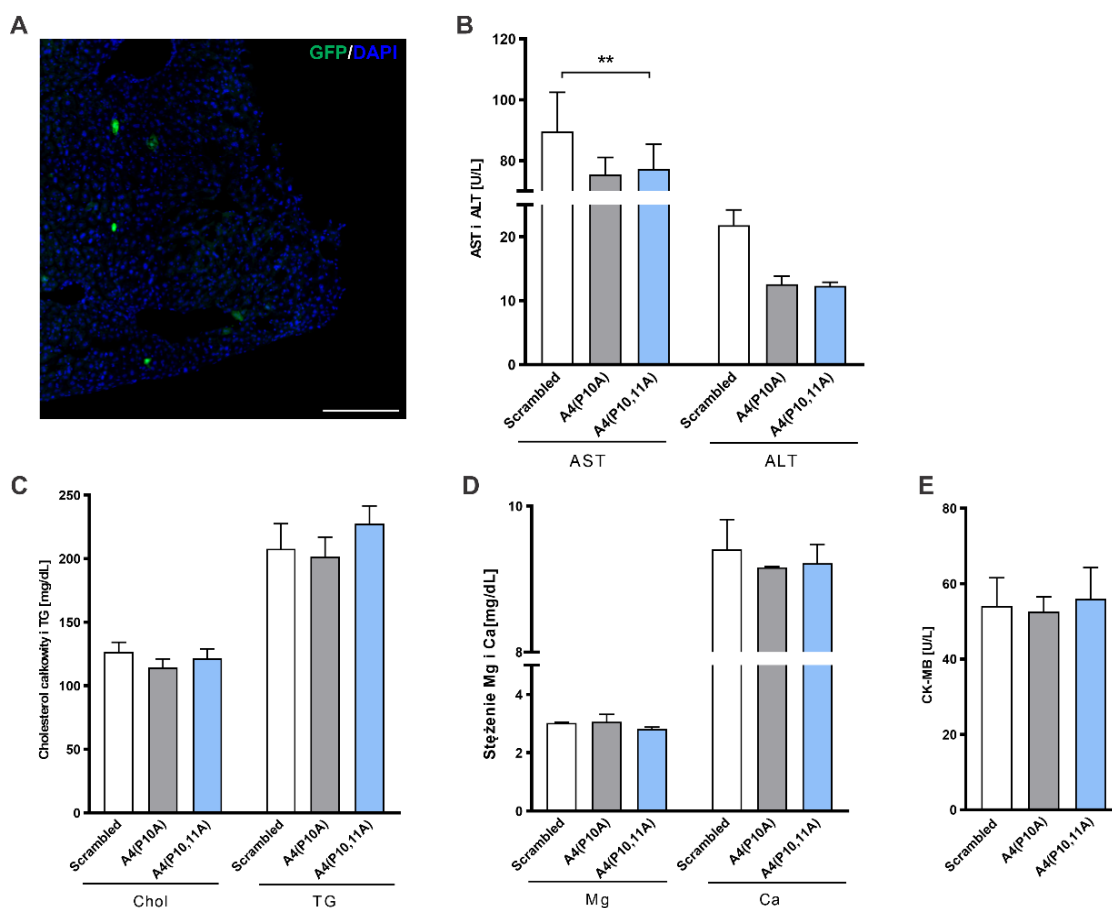
(A) Procentowy wykres zmiany masy ciała myszy w ciągu 15 tygodni eksperymentu. Masę ciała mierzono przed iniekcją (0 tygodni) oraz w 4, 10, 12 i 15 tygodniu po iniekcji A4(P10A), A4(P10,11A). Aby pokazać różnice w przybieraniu na wadze w czasie, początkowa waga została wyrażona jako 100%; (B) Masa narządów ważona pośmiertnie: mózg, serce, śledziona i jądro 15 tygodni po iniekcji reagentami do mysiego modelu HD;

(C) Podsumowanie wyników testu oceny fenotypu (PST). Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=3-6.

7.2.6. Ocena wpływu iniekcji A4(P10A) i A4(P10,11A) na tkanki obwodowe w mysim modelu HD

W mysim modelu HD, sygnał eGFP zaobserwowano w mniej niż 1,5% wszystkich komórek wątroby (**Rys. 14 A**). W celu uzupełniania wiedzy o wpływie zastosowanej terapii na fizjologię wątroby zbadano poziom biochemicznych markerów wątrobowych ALT i AST w surowicy krwi (**Rys. 14 B**). Poziomy tych parametrów wykazywały jedynie niewielkie różnice u myszy, którym podano A4(P10A) lub A4(P10,11A), w porównaniu do grupy kontrolnej Scrambled. Obniżenie ALT było statystycznie istotne po iniekcji A4(P10A) i A4(P10,11A), co może wskazywać na zmniejszenie stanu zapalnego wątroby w Hu^{128Q/21Q}. Stąd możemy wywnioskować, że systemowe iniekcje AAV-PHP.eB mają minimalny wpływ na transdukcję wątroby i nie mają niekorzystnego wpływu na parametry biochemiczne ALT i AST.

Przeanalizowano także zmiany w metabolizmie lipidów, tj. poziom cholesterolu i trójglicerydów (**Rys. 14 C**), stężenie magnezu i wapnia (**Rys. 14 D**), oraz specyficzne dla serca izoformy kinazy kreatynowej (**Rys. 14 E**). Zaobserwowano obniżenie ogólnego poziomu cholesterolu po iniekcji dwoma reagentami A4(P10A) i A4(P10,11A). Najwyższy poziom cholesterolu odnotowano u myszy HD, które otrzymały reagent Scrambled i wykazały największy przyrost masy ciała po 15 tygodniach. Pomiar stężeń magnezu i wapnia we krwi nie ujawnił znaczących zmian w porównaniu z grupą kontrolną. Ocena parametru kinazy kreatynowej, nie wykazała zmian po podaniu reagentów AAV-PHP.eB_shRNA.



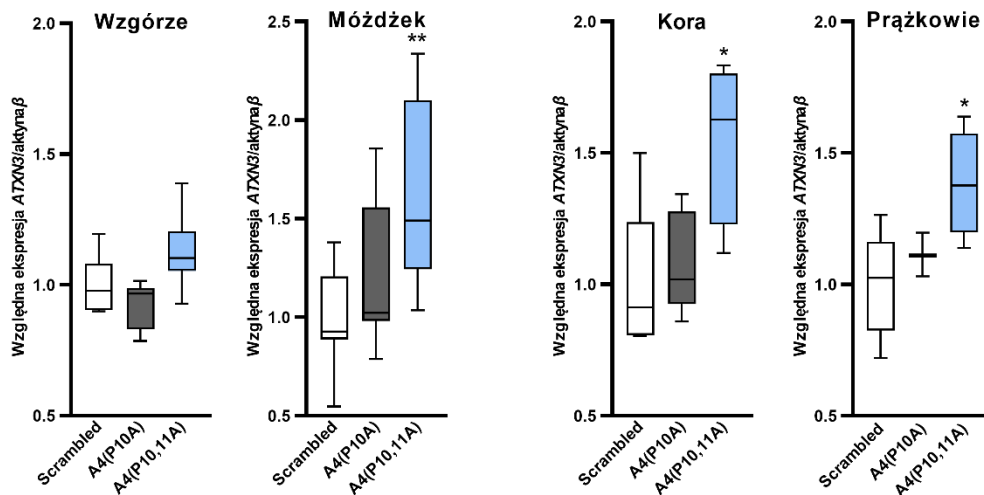
Rysunek 14. Transdukcja wątroby i ocena parametrów biochemicznych w modelu myszy HD.

(A) Sygnał eGFP w reprezentatywnym wycinku wątroby myszy $Hu^{128Q/21Q}$; (B) Zmiana parametrów AST i ALT; (C) poziom cholesterolu całkowitego i trójglicerydów; (D) stężenie magnezu (Mg) i wapnia (Ca) oraz (E) kinazy kreatynowej (CK-MB) w surowicy myszy $Hu^{128Q/21Q}$ 15 tygodni po wstrzyknięciu AAV-PHP.eB_shRNA. W parametrach biochemicznych wyniki porównano z myszami po iniekcjach A4(P10A), A4(P10,11A) i Scrambled. Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=3 lub 4.

7.2.7. Analiza zmiany poziomu ekspresji mRNA *ATXN3* w wybranych tkankach mózgowych po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A) mysiego modelu choroby SCA3

W mysim modelu SCA3 $Ki^{150Q/21Q}$ oceniono efekt działania reagentów na poziom mRNA genu *ATXN3*. Podobnie jak we wcześniejszej ocenie poziomów mRNA w HD, wybrano dwie struktury mózgu dobrze oraz dwie słabiej wyznakowane eGFP. W modelu SCA3 nie zaobserwowano istotnego obniżenia poziomu genu *ATXN3* po iniekcjach A4(P10A) oraz A4(P10,11A) w wybranych strukturach mózgu. We wszystkich badanych strukturach zaobserwowano zwiększenie ekspresji *ATXN3* po iniekcjach dwoma

reagentami w stosunku do reagenta kontrolnego Scrambled. Myszy z reagentem A4(P10,11A) wykazały większy wzrost ekspresji badanego genu niż myszy z A4(P10A).



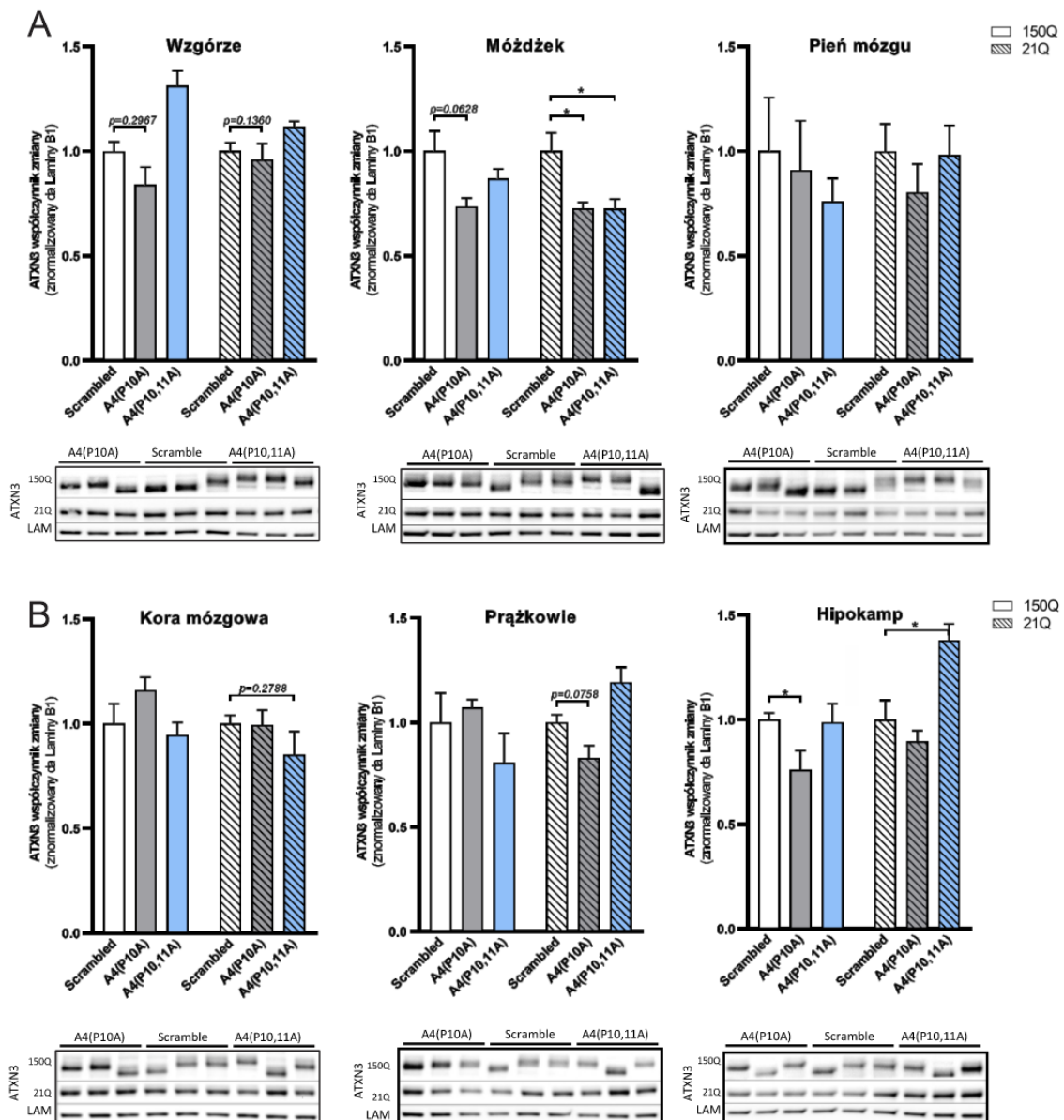
Rysunek 15. Względny poziom mRNA ATXN3 w różnych regionach mózgu modelu myszy SCA3 po wstrzyknięciu A4(P10A) i A4(P10,11A).

Poziomy transkryptu *ATXN3* (zmianę krotności) mierzono metodą qPCR i znormalizowano poziomem ekspresji genu *Aktyny β*. mRNA wyizolowano ze wzgórza, mózdzku, kory mózgowej i prążkowie myszy SCA3 $Ki^{150Q/21Q}$. Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=3.

7.2.8. Analiza zmiany poziomu białka ATXN3 w wybranych tkankach mózgowych po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A) mysiego modelu choroby SCA3

Metodą Western blottingu oceniono poziom białka ATXN3 w biallelicznym mysim modelu SCA3. Zmutowana ludzka ATXN3 zawierała około 150 glutamin jednak dokładna liczba glutamin w białku była zależna od osobnika (co można zaobserwować na obrazach western blot) w związku z ekspansją międzypokoleniową CAG. Prawidłowa ludzka ATXN3 zawierała ciąg 21 glutamin. Analizę poziomu białka przeprowadzono, jak we wcześniejszym doświadczeniu w tych samych strukturach mózgu. Zastosowano ten sam podział na struktury o dobrym (**Rys. 16 A**) i słabym wyznakowaniu białkiem eGFP (**Rys. 17 B**). W modelu SCA3 najlepsze efekty obniżenia poziomu białka ATXN3 zaobserwowano w mózdzku, który odgrywa kluczową rolę w patologii tego zaburzenia. Obydwa reagenty spowodowały spadek zmutowanego białka ATXN3 w mózdzku o 26% po wstrzyknięciu A4(P10A) i 17% po wstrzyknięciu A4(P10,11A) (**Rys. 16 A**). (**Rys. 16 A**). Podobnie jak w badaniach nad myszami HD, nie stwierdzono statystycznie istotnych wyników w obszarach mózgu myszy $Ki^{150Q/21Q}$ ze słabym wyznakowaniem eGFP (kory

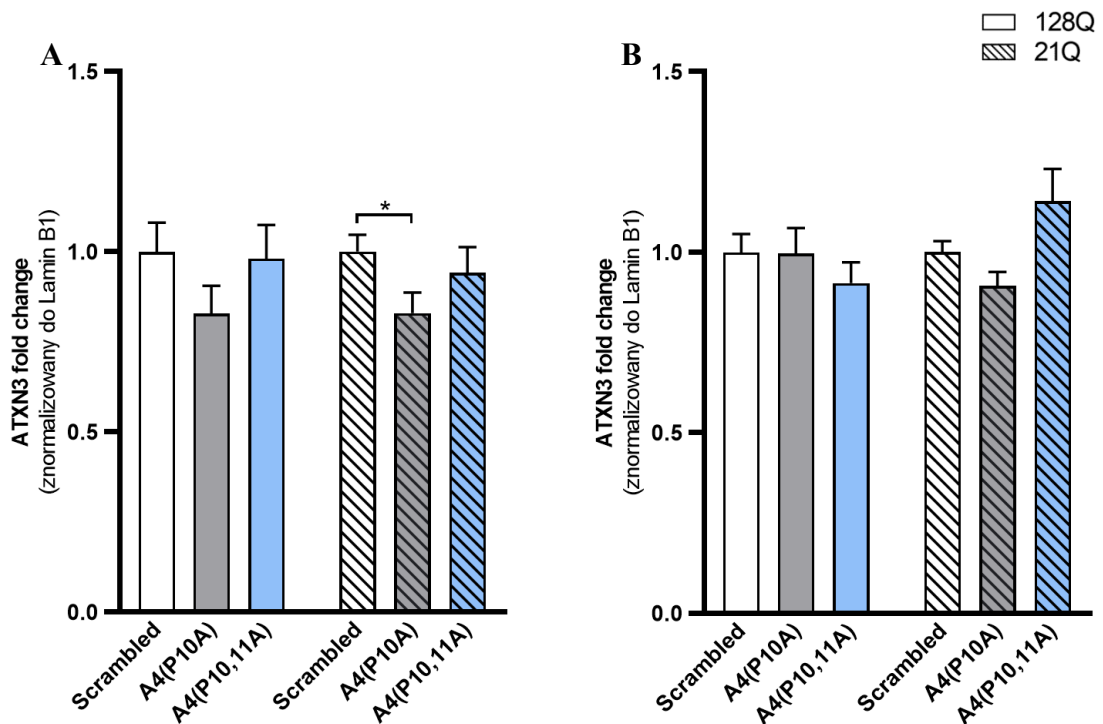
mózgu, prążkowiu), tylko w hipokampie A4(P10A) spowodował 24% spadek poziomu zmutowanej ataksyny-3 (Rys. 16 B). Nie zaobserwowano selektywnego efektu shRNA dla alleli. Zaobserwowane różnice w skuteczności obniżania poziomu białek w różnych strukturach wynikały przede wszystkim z różnych poziomów transdukcji w obszarach mózgu. Ponadto, słabo wyznakowane regiony wykazywały duże różnice między osobnikami.



Rysunek 16 . Zmiana poziomu białka ATXN3 we wzgórzu, mózdzku, pniu mózgu, korze mózgowej, prążkowi i hipokampie myszy $Ki^{150Q/21Q}$, którym wstrzyknięto AAV-PHP.eB z ekspresją A4(P10A) i A4(P10,11A) oraz Scrambled ($1,5 \times 10^{13}$ vg/kg).

(A) Górny panel przedstawia dobrze wyznakowane eGFP struktury mózgu (wzgórze, mózdzek i pień mózgu); (B) Przedstawia słabiej wyznakowane eGFP struktury mózgu (korę mózgową, prążkowie i hipokamp). Białko ATXN3 znormalizowano o białko referencyjne Laminę B1. Reprezentatywne obrazy western blottingu pokazano pod wykresami; 150Q reprezentuje zmutowane białko ATXN3, a 21Q prawidłowe białko ATXN3. Test one-way ANOVA i t-test jako posthoc $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, $N=3$.

Dane ze struktur mózgu zagregowane zgodnie z ich poziomem wyznakowane eGFP po iniekcjach A4(P10A) w mysim modelu SCA3 pokazują obniżenie poziomu zmutowanego ATXN3 o 17% ($p = 0,1437$) i brak obniżenia w strukturach słabiej wyznakowanych eGFP (Rys. 17).

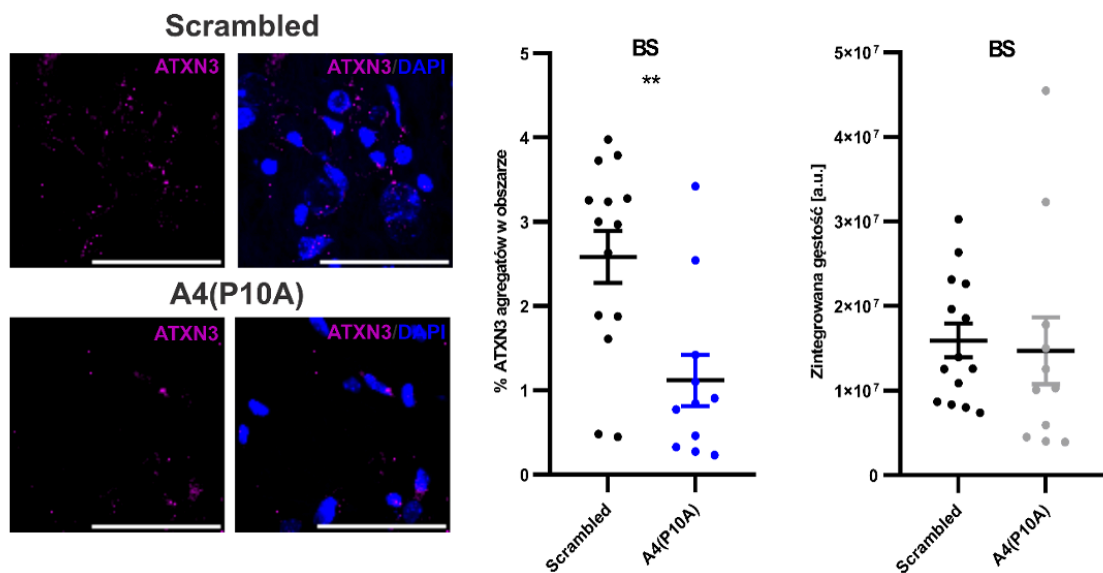


Rysunek 17. Wykresy uśrednionych zmian poziomu białka ATXN3 dla dobrze i słabiej wyznakowanych sygnałem eGFP regionów mózgu myszy $Ki^{150Q/21Q}$, którym wstrzyknięto AAV-PHP.eB z ekspresją A4(P10A) i A4(P10,11A) oraz Scrambled ($1,5 \times 10^{13}$ vg/kg).

(A) Wykres pokazujący uśrednione dane ze struktur mózgu o dobrym stopniu wyznakowania eGFP (wzgórze, mózdzek i pień mózgu); (B) Wykres pokazujący uśrednione dane ze struktur mózgu o słabym stopniu wyznakowania eGFP (korę mózgową, prążkowie i hipokamp). 150Q reprezentuje zmutowane białko ATXN3, a 21Q białko prawidłowej ATXN3. Białko ATXN3 znormalizowano o białko referencyjne Laminę B1. Test one-way ANOVA i t-test jako posthoc $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, $N=9$.

7.2.9. Wpływ cząsteczek A4(P10A) na obniżenie poziomu agregatów ATXN3 w wybranych strukturach mózgu mysiego modelu choroby SCA3

Przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne z pomocą przeciwciała 1H9 dla agregatów ATXN3. Ponieważ pień mózgu jest silnie dotknięty patogeneza SCA3, eksperyment przeprowadzono w tej strukturze. Zaobserwowano istotny statystycznie spadek % agregatów w pniu mózgu 57% ($p = 0,0031$) po iniekcji A4(P10A). Obliczono także zintegrowaną gęstość agregatów, jednak nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian, po porównaniu wyników grupy kontrolnej z myszami, którym wstrzyknięto reagent.



Rysunek 18. Agregaty ATXN3 pniu mózgu wybarwione przeciwciałem anti-ATXN3 1H9.

Wykres przedstawia % agregatów ATXN3 i zintegrowaną gęstość agregatów w pniu mózgu 15 tygodni po wstrzyknięciu A4(P10A) jako reagenta i kontroli Scrambled dostarczonej w wektorze AAV-PHP.eB. Zdjęcia pokazują ATXN3 (różowy) i DAPI (niebieski). Dawka $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg. Powiększenie 40x; skala 1000 μ m. Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=3.

7.2.10. Zmiany fenotypowe w mysim modelu SCA3 po iniekcji retro-orbitalnej po iniekcjach A4(P10A) i A4(P10,11A)

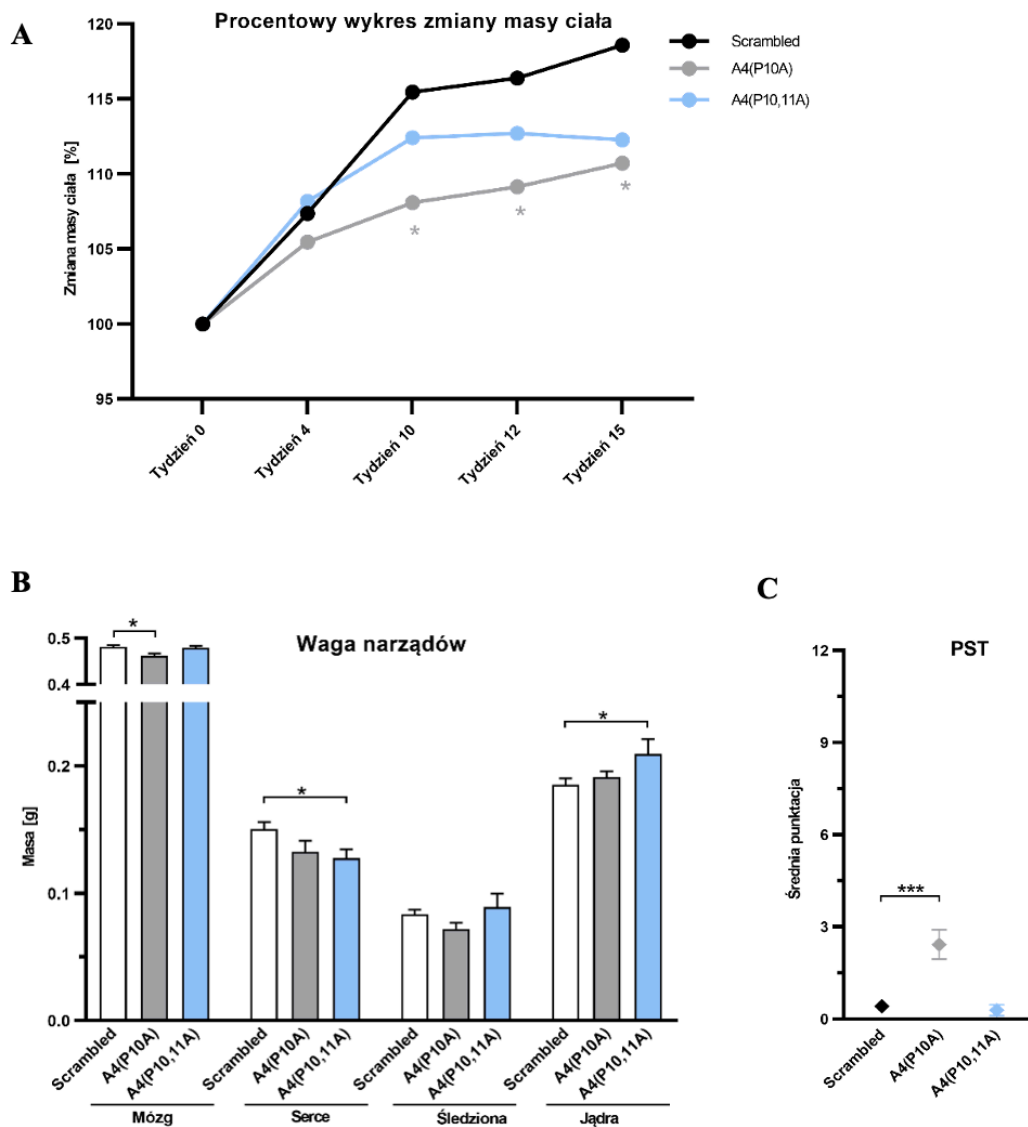
W mysim modelu choroby SCA3 przeprowadzono pomiary masy ciała w określonych punktach czasowych. Po 10 tygodniach od rozpoczęcia eksperymentu myszy $Ki^{150Q/21Q}$, którym podano reagent A4(P10A), miały istotnie niższy przyrost masy ciała niż grupa

kontrolna z Scrambled. Po zakończeniu eksperymentu ich waga była o 10% ($p = 0,0149$) niższa niż u myszy z grupy Scrambled (**Rys. 19 A**). Myszy nastrzyknięte A4(P10,11A) cechowały się mniejszym przyrostem wagi w porównaniu do myszy kontrolnych Scrambled, ale większym niż myszy z cząsteczką A4(P10A) (**Rys. 19 A**). Zwierzęta z A4(P10,11A) w 15 tygodniu trwania eksperymentu wykazały o 6% niższy przyrost masy niż myszy shScrambled.

Po uśmierceniu zwierząt oceniono masę wybranych narządów (mózgu, serca, śledziony, jąder, **Rys. 19 B**). Po iniekcjach A4(P10A) zauważono niewielki spadek masy mózgu myszy o 4% ($p = 0,0164$), natomiast po A4(P10,11A) masa mózgu się nie zmieniła (**Rys. 19 B**). W mysim modelu choroby SCA3 po iniekcjach A4(P10A) masa serca zmniejszyła się o 11%, a śledziony o 14%, natomiast masa jąder się nie zmieniła w stosunku do myszy nastrzykniętych Scrambled (**Rys. 19 B**). Po iniekcjach drugim reagentem A4(P10,11A) masa serca spadła o 15%, masa śledziony i jąder wzrosła w porównaniu do grupy kontrolnej.

Następnym przeprowadzonym badaniem była punktowa ocena fenotypu (PST) (patrz 6.2.5). Pierwszy test PST przeprowadzono dzień przed iniekcjami, a ostatni w dniu poświęcenia myszy. Wartości istotne statystycznie wykazały niewielkie pogorszenie fenotypu w stosunku do grup kontrolnych po iniekcjach A4(P10A) ($p = 0,0001$). Wynik ten jest zbliżony do wyników z grupy kontrolnej Scrambled, co sugeruje niewielkie pogorszenie się fenotypu u zwierząt (**Rys. 19 C**).

U zwierząt z grupy SCA3 nastrzykniętych reagentami A4(P10A) oraz A4(P10,11A) po upływie 4 tygodni po iniekcji pojawiło się lekkie drżenie podczas przenoszenia, które nie powodowało śmiertelności u myszy. Pozostaje wnioskować, że reagenty powodują lekkie zmiany zachowania fenotypowego w stosunku do myszy kontrolnych. Zastosowano subiektywną skalę (patrz 6.2.5) i zachowanie myszy po iniekcji oceniono jako (+) drżenie obserwowane podczas przenoszenia.



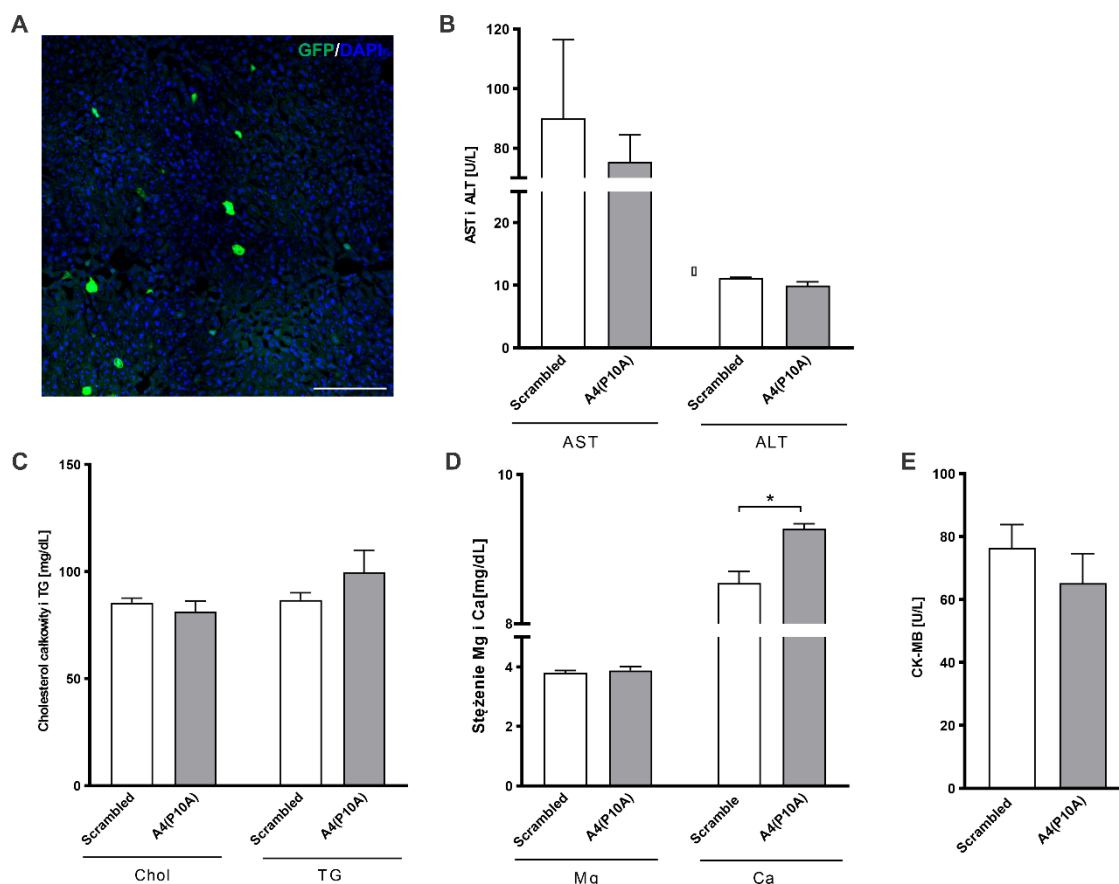
Rysunek 19. Zmiany fenotypowe (ocena zmiany masy ciała, masy poszczególnych narządów oraz punktowa ocena fenotypu po iniekcji A4(P10A) i A4(P10,11A).

(A) Procentowy wykres zmiany masy ciała myszy w ciągu 15 tygodni eksperymentu. Masę ciała mierzono przed iniekcją (0 tygodni) oraz w 4, 10, 12 i 15 tygodniu po iniekcji A4(P10A), A4(P10,11A). Aby pokazać różnice w przybieraniu na wadze w czasie, początkowa waga została wyrażona jako 100%; (B) Masa narządów ważona pośmiertnie: mózg, serce, śledzionę i jądro; (C) Podsumowanie wyników testu oceny fenotypu (PST) 15 tygodni po iniekcji mysiego modelu HD. Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, $N=3-6$.

7.2.11. Ocena wpływu iniekcji A4(P10A) na tkanki obwodowe w mysim modelu SCA3

Dla potwierdzenia bezpieczeństwa stosowanej terapii postanowiono ocenić ogólny stan zdrowia myszy w $Ki^{150Q/21Q}$. W pierwszej kolejności oceniono liczbę stransdukowanych komórek wątroby po iniekcji reagentem AAV-PHP.eB. Zbadano sygnał eGFP w wycinkach wątroby pobranych od grup zwierząt doświadczalnych. Liczba komórek wątroby wybarwionych eGFP, w porównaniu do komórek nie wybarwionych, była mniejsza niż 1,5%. (**Rys. 20 A**). W surowicy krwi oceniono poziomy enzymów ALT i AST (**Rys. 20 B**), które są związane ze stanem wątroby. Poziomy tych parametrów nie wykazywał istotnych zmian u grupy myszy $Ki^{150Q/21Q}$ po iniekcji A4(P10A).

Zbadano również parametry biochemiczne w surowicy krwi tj. poziom cholesterolu i trójglicerydów (**Rys. 20 C**), stężenie magnezu i wapnia (**Rys. 20 D**), oraz specyficzną dla serca izoformę kinazy kreatynowej (**Rys. 20 E**). U myszy $Ki^{150Q/21Q}$ nie zaobserwowano znaczących różnic w poziomie cholesterolu, trójglicerydów oraz magnezu. Pomiar stężeń wapnia w surowicy ujawniły niewielki wzrost poziomu wapnia po podaniu reagenta A4(P10A) do $Ki^{150Q/21Q}$ ($p = 0,0132$) o 9%. Pomiar parametru kinazy kreatynowej nie wykazał znacznej zmian po podaniu reagentów AAV-PHP.eB_A4(P10A) u myszy SCA3. Podsumowując reagenty AAV okazały się bezpieczne oraz nie wpływają na badane tkanki i parametry obwodowe.



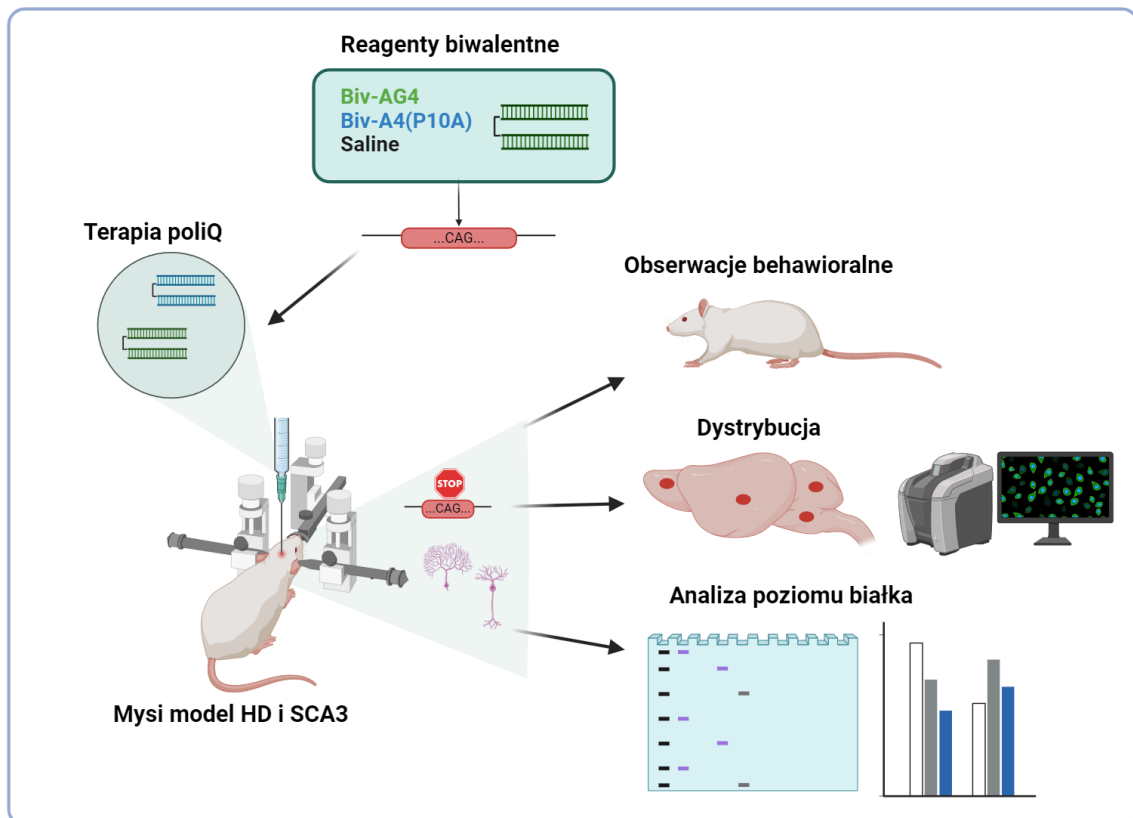
Rysunek 20. Transdukcja wątroby i ocena parametrów biochemicznych w mysim modelu SCA3.

(A) Sygnał eGFP w reprezentatywnym wycinku wątroby myszy $Ki^{150Q/21Q}$. (B) Zmiana parametrów AST i ALT; (C) poziom cholesterolu całkowitego i trójglicerydów; (D) stężenie magnezu (Mg) i wapnia (Ca) oraz (E) kinazy kreatynowej (CK-MB) w surowicy myszy $Ki^{150Q/21Q}$ 15 tygodni po wstrzyknięciu AAV-PHP.eB_shRNA. W parametrach biochemicznych wyniki porównano z myszami nastrzykniętymi reagentem A4(P10A) i Scrambled. Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=3 lub 4.

7.3. Efektywności siRNA w chemicznym, biwalentnym formacie po iniekcjach domózgowych

Sekwencje reagentów AG4 oraz A4(P10A) umieszczono w formacie chemicznie modyfikowanych krótkich RNA (biwalentny RNA). Wybrano sekwencje siRNA AG4, ze względu na obiecujące wyniki w eksperymencie krótkoterminowym. W wyniku iniekcji reagentem AAV.PHP.eB_AG4 zaobserwowano znaczne efekty uboczne, dlatego tej cząsteczki nie użyto do eksperymentów długoterminowych w formacie wektorowym. Ponieważ shRNA AG4 wykazała dużą efektywność wyciszania białka HTT, zdecydowano o sprawdzeniu jej efektywności terapeutycznej w formacie biwalentnym.

Drugim chemicznym reagentem siRNA w formie biwalentnym była cząsteczka A4(P10A). Reagent ten w formie wirusowym AAV-PHP.eB wykazywał potencjał dla wdrażania terapii genowych ukierunkowanych na ciąg CAG. Cechał się bezpieczeństwem stosowania w eksperymencie krótko i długoterminowych oraz jednocześnie obniżał białka HTT i ATXN3. Dlatego podjęto decyzję o sprawdzeniu efektywności reagenta w formie chemicznej.

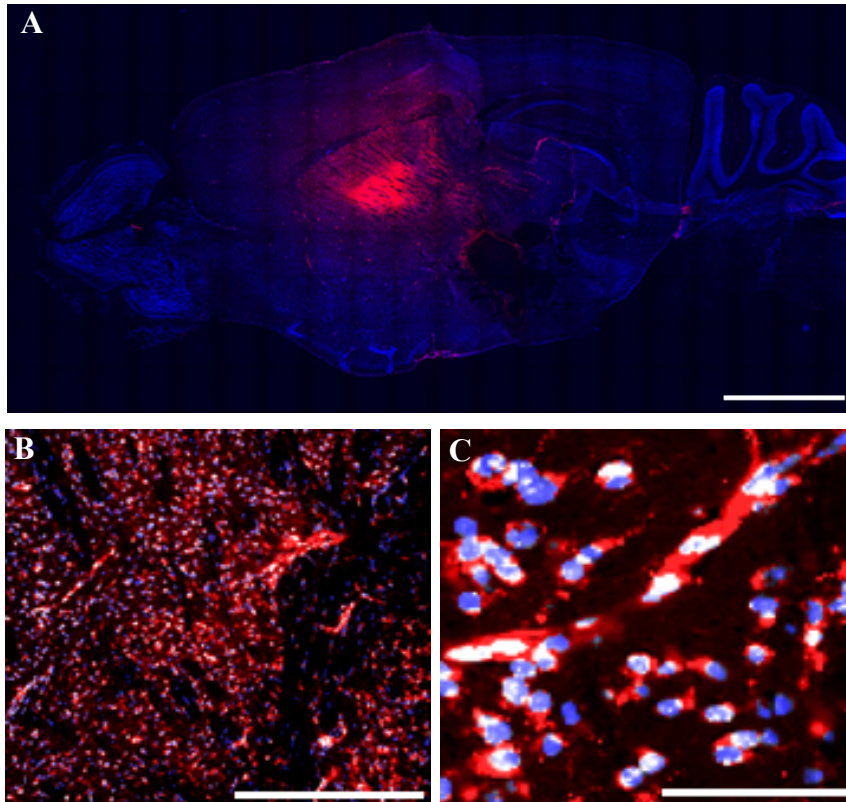


Rysunek 21. Schemat doświadczenia z zastosowaniem siRNA w formie chemicznej.

Iniekcje domózgowe 2 reagentami mysiego modelu HD oraz SCA3 na okres 2,5 i 4 tygodni oraz kierunki badań.

7.3.1. Ocena dystrybucji reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A) po iniekcjach domózgowych w prążkowie

Zwierzętom Hu^{128Q/21Q} i Ki^{150Q/21Q} wstrzyknięto domózgowo wyznakowane znacznikiem fluorescencyjnym Cy3 reagenty biv-AG4 i biv-A4(P10A) w dawce 25µg/mysz (12,5µg odczynnika do lewego i 12,5µg prawego prążkowie). Po 2,5 tygodnia od iniekcji zaobserwowano sygnał fluorescencji znacznika Cy3 w korze mózgowej oraz prążkowie.

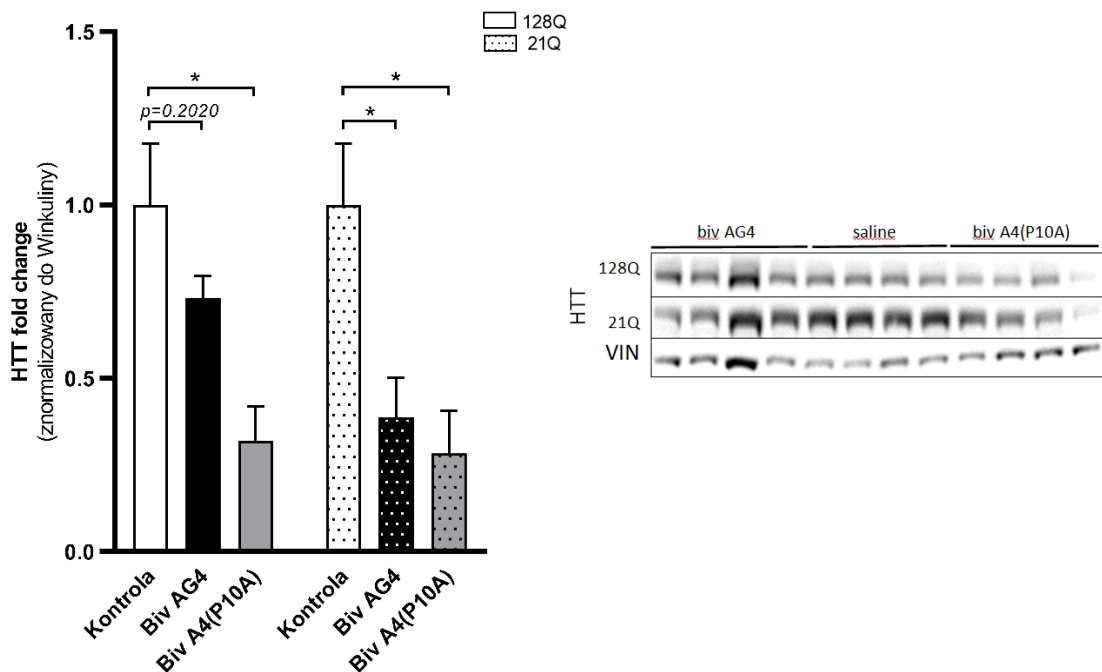


Rysunek 22. Jakościowa ocena intensywności sygnału czerwonej fluorescencji (Cy3) w mysim mózgu modelu SCA3 2,5 tygodnia od iniekcji reagenta biwalentnego do prążkowie.

(A) Reprezentatywne zdjęcia przekroju sagitalnego mózgu; (B) Zbliżenie na miejsce iniekcji reagenta biwalentnego siRNA w prążkowie; (C) Zbliżenie na komórki prążkowie w miejscu iniekcji. Zdjęcia pokazują znacznik Cy3 (czerwony) i DAPI (niebieski). Dawka 25 µg/mysz. Powiększenie (A) 20x, skala 100 µm (B) 40x, (C) 63x; skala 1000 µm, N=3.

7.3.2. Analiza zmiany poziomu białka HTT w prążkowie po iniekcji domózgowej do prążkowie reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A)

Pomiar białka HTT przeprowadzono za pomocą metody western blotting w miejscu iniekcji, czyli prążkowie. Wykorzystując myszy bialleliczny model choroby HD, przeanalizowano poziom zmutowanej huntingtyny (128Q) i prawidłowej huntingtyny (21Q). Po iniekcjach reagentem biv-AG4 obserwowano obniżenie poziomu zmutowanego białka HTT o 27% ($p = 0,2020$) oraz statystycznie znaczące obniżenia prawidłowego białka HTT o 61% ($p = 0,0267$). Natomiast reagent biv-A4(P10A) wykazał istotną redukcję zarówno zmutowanego, jak i prawidłowego białka (odpowiednio o 68%, $p = 0,0154$, i o 72%, $p = 0,0158$) w porównaniu do myszy kontrolnych nastrzykniętych solą fizjologiczną.

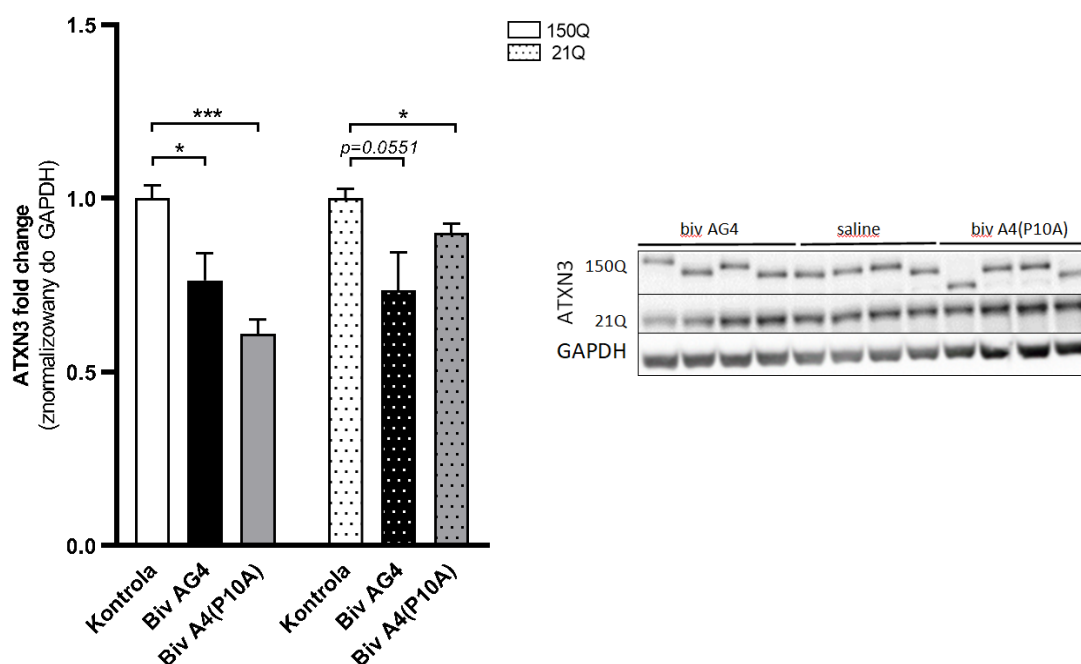


Rysunek 23. Zmiana poziomu białka HTT w miejscu iniekcji (prążkowi) u myszy, którym wstrzyknięto biv-AG4 i biv-A4(P10A) oraz sól fizjologiczną jako kontrolę (25 µg/mysz).

HTT znormalizowano o białko referencyjne winkuline. Reprezentatywne obrazy western blottingu pokazano obok wykresu; 128Q i 21Q oznacza odpowiednio zmutowane i prawidłowe białko. Test one-way ANOVA i t-test jako posthoc $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=4.

7.3.3. Analiza zmiany poziomu białka ATXN3 w prążkowi po iniekcji domózgowej do prążkowie reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A)

W mysim modelu choroby SCA3 przetestowano również dwa białka, ataksynę-3 zmutowaną (150Q) i prawidłową (21Q). Częsteczka biv-AG4 obniżyła poziom zmutowanego białka ATXN3 o 24% ($p = 0,0354$), natomiast biv-A4(P10A) o 39% ($p = 0,0004$) w porównaniu do myszy kontrolnych nastrzykniętych solą fizjologiczną

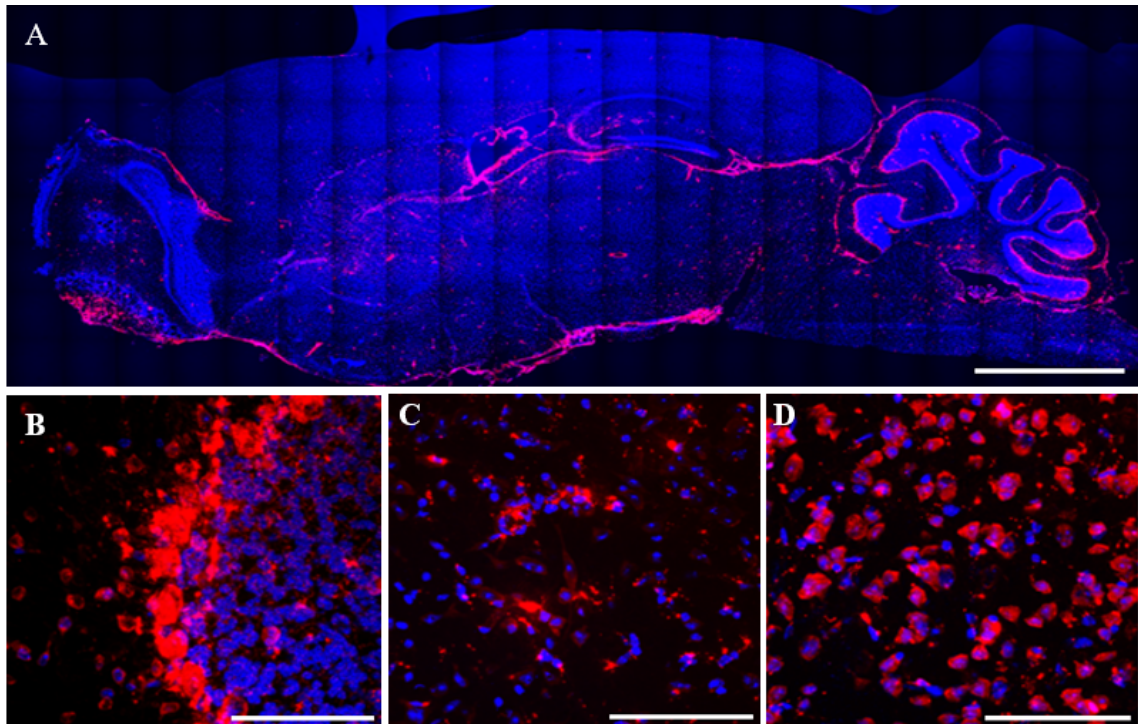


Rysunek 24. Zmiana poziomu białka ATXN3 w miejscu iniekcji (prążkowie) u myszy, którym wstrzyknięto biv-AG4 i biv-A4(P10A) oraz sól fizjologiczną jako kontrolę (25 µg/mysz).

Białko ATXN3 znormalizowano o białko referencyjne GAPDH. Reprezentatywne obrazy western blottingu pokazano obok wykresu; 128Q i 21Q oznacza odpowiednio zmutowane i prawidłowe białko. Test one-way ANOVA i t-test jako posthoc $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=4.

7.3.4. Ocena dystrybucji reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A) po iniekcjach do układu komór

Aby poszerzyć wiedzę na temat efektywności reagentów w innych regionach mózgu oraz poznać ich dystrybucję w płynie mózgowo rdzeniowym wykonano iniekcję domózgową do układu komorowego mózgu. Mysiom HD i SCA3 podano dwa reagenty biv-AG4 oraz biv-A4(P10A) w dawce 200 µg/mysz (2*100 µg/mysz) obustronnie do układu komorowego mózgu.



Rysunek 25. Ocena sygnałów Cy3 w mysim mózgu modelu SCA3 2,5 tygodnia od iniekcji do układu komorowego mózgu (ICV).

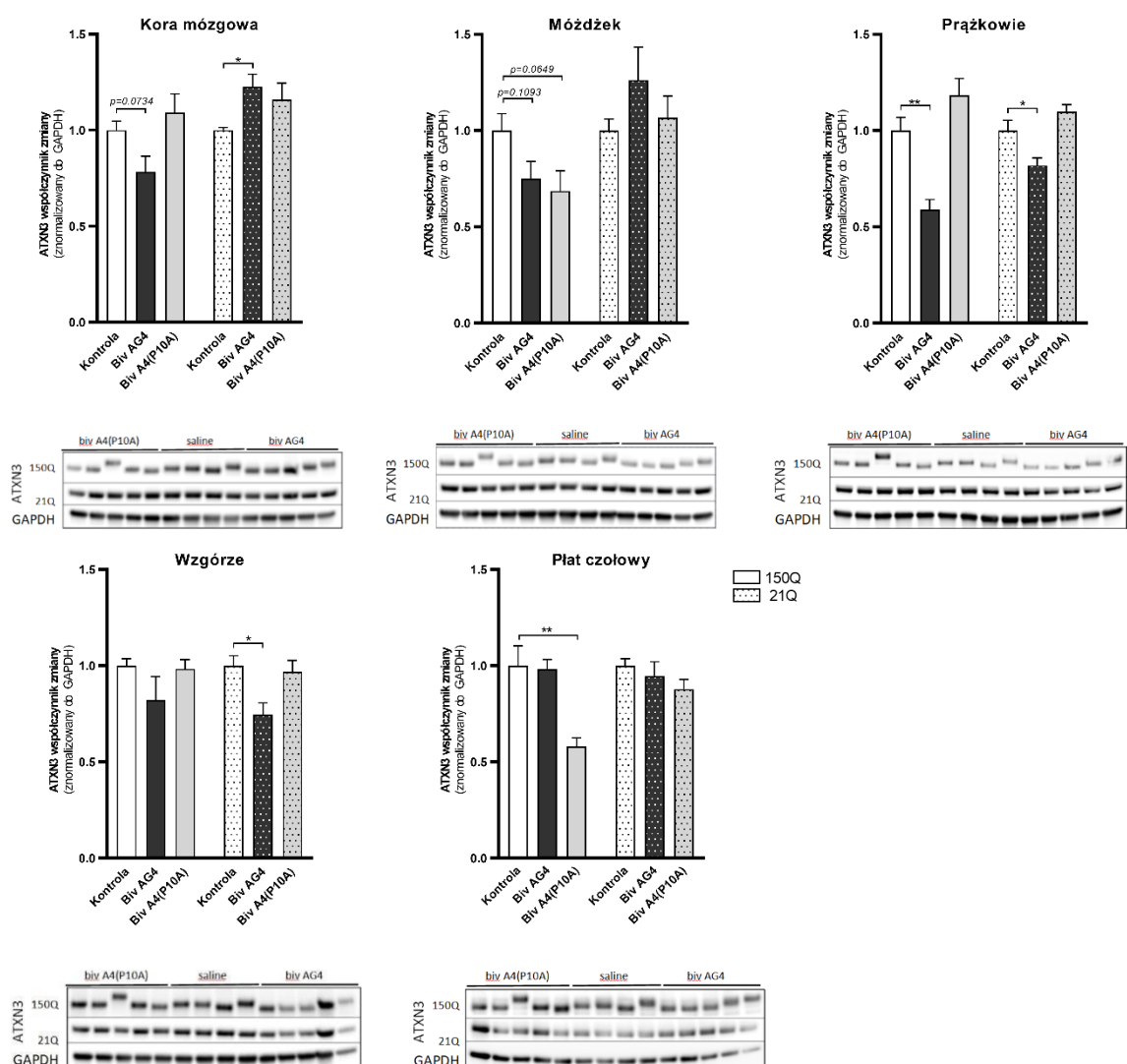
(A) Reprezentatywne zdjęcie całego mózgu w przekroju sagitalnym; (B) mózdzku, (C) prążkowiu, (D) opuszkach węchowych. Zdjęcia pokazują znacznik Cy3 (czerwony) i DAPI (niebieski). Dawka 200 µg/mysz. Powiększenie (A) 20x, pasek skali 100 µm (B-D) 40x, skali 1000 µm, N=3.

7.3.5. Analiza zmiany poziomu białka ATXN3 w wybranych tkankach mózgowych po iniekcji reagentów biv-AG4 i biv-A4(P10A) do układu komorowego mózgu

Poziomy białka poliQ oceniano za pomocą Western blottingu w 5 obszarach mózgu myszy SCA3 nastrzykniętych reagentem biv AG4 oraz biv A4(P10A), w których wykryto sygnał Cy3 (**Rys. 25**). Stosowany bialleliczny myszy model choroby SCA3 pozwolił na ocenę zmutowanej ludzkiej ATXN3 (150Q) oraz normalnej ludzkiej ATXN3 (21Q). Najlepsze efekty terapeutyczne w wyciszeniu zmutowanego białka ATXN3 zaobserwowano po iniekcjach reagentem biv-AG4. Po terapii tym odczynnikiem zaobserwowano istotnie statystycznie wyciszenie zmutowanego białka w prążkowiu o 41% ($p = 0,0019$). Spadek poziomu patologicznego białka w korze wynosił 22% ($p = 0,734$), wzgórzu 18% ($p = 0,2161$) oraz mózdzku o 25% ($p = 0,1093$). Po iniekcji biwalentnym reagentem A4(P10A) zauważono spadek poziomu zmutowanej ataksyny-3 w płacie czołowym o 42% oraz w mózdzku o 32% ($p = 0,0048$; $p = 0,0649$) (**Rys. 26**).

Najsilniejszy spadek poziomu zmutowanego białka po terapii biwalentnymi reagentami zaobserwowano w prążkowie oraz mózdzku.

Myszy $Ki^{150Q/21Q}$ dobrze znosiły podanie reagenta i nie zaobserwowano u tych myszy efektów ubocznych lub były one niskie. U myszy HD nastrzykniętymi tymi samymi reagentami biwalentnymi zaobserwowano dużą śmiertelność po iniekcji lokalnej mogącą świadczyć o toksyczności u tych myszy. Nie jest łatwe do zinterpretowania biorąc pod uwagę dobrą kondycję myszy SCA3 po iniekcjach. Dlatego u wszystkich myszy HD z reagentami biwalentnymi zdecydowano się zakończyć eksperyment wcześniej.



Rysunek 26. Zmiana poziomu białka ATXN3 w korze mózgowej, mózdzku, prążkowie, wzgórzu i płacie czołowym myszy $Ki^{150Q/21Q}$, którym wstrzyknięto biv-AG4 i biv-A4(P10A) oraz sól fizjologiczną jako kontrolę (200 μ g/mysz/reagent).

Białko ATXN3 znormalizowano o białko referencyjne GAPDH. Reprezentatywne obrazy western blottingu pokazano pod wykresami; 150Q reprezentuje zmutowane białko ATXN3 i 21Q białko prawidłowe ATXN3. Test t-test $p < 0,05$; słupki błędów \pm SEM, N=3.

8. Dyskusja i perspektywy

Przyczyną rozwoju chorób poliQ jest obecność toksycznych białek z wydłużonym ciągiem glutamin. Dlatego zmniejszenie poziomu toksycznych białek poprzez celowanie w mRNA jest obecnie uznawane za najbardziej obiecującą strategię terapeutyczną (Borbolla-Jiménez i in., 2021; Costa i Maciel, 2022). Metody te wykorzystują niemodyfikowane lub chemicznie modyfikowane oligonukleotydy RNA oraz cząsteczki takie jak shRNA dostarczane z pomocą wektorów wirusowych. Obniżanie poziomu zmutowanych białek z wykorzystaniem tych krótkich RNA odbywa się na drodze aktywacji różnych mechanizmów m.in. związanych z RNazą H, kompleksu RISC i Ago2, co może skutkować degradacją mRNA lub zahamowaniem jego translacji (Ciesiółka i in., 2021; Minakawa i Nagai, 2021). Mimo testowania podobnych podejść w badaniach klinicznych, nie osiągnięto dotychczas dostatecznej skuteczności tych terapii.

Dlatego założeniem rozprawy doktorskiej jest testowanie strategii terapeutycznej mającej spełnić wymagania skutecznej terapii chorób poliQ. Co więcej celem rozprawy jest testowanie dostarczania leków RNA do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) drogą podania systemowego oraz testowanie shRNA celujących w CAG w mRNA jako środka o uniwersalnym potencjale terapeutycznym dla wielu chorób poliQ. Obniżenie poziomu białek może być ograniczone przez nieskuteczne dostarczanie leków do OUN i chorych populacji komórek, nawet w przypadku stosowania bezpośrednich wstrzyknięć. Co więcej, bezpośrednie dostarczanie może być inwazyjne i może powodować komplikacje medyczne. Potencjalnym rozwiązaniem tych problemów w terapii chorób neurodegeneracyjnych mogą być nośniki AAV oraz biwalentne chemicznie modyfikowane oligonukleotydy RNA. Te metody mogą być bardzo efektywnym narzędziem do dostarczenia cząsteczek do komórek nerwowych (Alterman i in., 2019; Bijlani i in., 2022; Issa i in., 2023).

Różne serotypy AAV zawierają zmodyfikowane białka powierzchniowe, które odpowiadają za tropizm tych wektorów do określonych typów komórek i organów.

Ważnym elementem tych nośników jest promotor zastosowany w konstrukcjach shRNA dobierany w zależności od komórek, które należy transdukować. Systemowe iniekcje AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA transdukują komórki w mózgu. W literaturze zaobserwowano silniejszy poziom transdukcji mózgu serotypem AAV-PHP.eB, w porównaniu do innym badanych serotypów przekraczających barierę krew-mózgu (Mathiesen i in., 2020). Jednak mogą również powodować pewien poziom transdukcji tkanek obwodowych. Taki proces może powodować niepożądane efekty tj. integrację konstruktów do genomu lub odpowiedź zapalną organizmu (Timmers i in. 2020). Podanie reagentów do płynu mózgowo-rdzeniowego stosowane u pacjentów niesie za sobą większe ryzyko w postaci powikłań pooperacyjnych. W związku z tym przetestowano reagenty ukierunkowane na CAG w nieinwazyjnym, systemowym dostarczaniu wektora serotypu AAV-PHP.eB (Chan i in., 2017). Serotyp ten może przekraczać BBB i wiązać się z populacjami neuronów i astrocytów dotkniętych patogenezą (Surdyka i in., 2022). Z kolei cząsteczkę biwalentną, która nie przechodzi przez BBB podano drogą iniekcji domózgowej.

Bezpieczne stosowanie terapii wymaga oceny potencjalnych skutków ubocznych dla stosowanej sekwencji RNA. Podanie reagentu A2 *in vitro* ludzkim fibroblastom cechowało się selektywnym wyciszeniem różnych białek poliQ i brakiem toksyczności komórkowej. Wcześniejsze analizy pokazały również brak lub małą liczbę genów, do których mógłby wiązać się reagent A2. Sugerowało to niskie prawdopodobieństwo niespecyficznego wiązania się reagenta A2, wyciszenia innych genów i pojawienia się skutków ubocznych (Ciesiolka i in., 2021; Fiszer i in., 2013). Mimo obiecujących wcześniejszych wyników, po przejściu do eksperymentów *in vivo*, nawet po zastosowaniu 3 razy niższych dawek A2 w porównaniu do innych shRNA, zaobserwowano niekorzystne skutki uboczne. Pojawiły się one w postaci drżenia całego ciała myszy i zostały wykryte przez krótkoterminowe obserwacje behawioralne (**Tab. 17**). W odpowiedzi na to, została wykonana przez nas analiza *in silico*, która pokazała dużą liczbę potencjalnych miejsc wiązania A2 z sekwencjami RNA innych genów zawierających sekwencję CAG (**Tab. 18**).

Aby zminimalizować nadmierne wykorzystanie zwierzęcych modeli badawczych oraz wykluczyć potencjalną toksyczność zaprojektowano nowe reagenty. Zakładając przy tym zmniejszenie bezpośredniej homologii tych reagentów do sekwencji zawierających CAG innych genów występujących w genomie, przy jednoczesnym zachowaniu znacznego

stopnia homologii do długich ciągów CAG w genach poliQ. Projektowanie i analiza *in silico* pokazała, że zwiększenie liczby substytucji A i G w sekwencji reagenta w porównaniu do reagenta A2 skutkuje obniżeniem liczby miejsc niespecyficznego wiązania się takich reagentów i zapobiega celowaniu w inne geny. Mimo zwiększenia liczby substytucji i obniżenia homologii reagenta do samego ciągu CAG założono, że nadal będzie występowało wiele dostępnych miejsc wiązania co prawdopodobnie wystarczy do osiągnięcia synergistycznego wyciszania przez mechanizm podobny do miRNA lub inny (Fischer i in., 2013; Matsui & Corey, 2012).

Zaprojektowane reagenty z podstawieniami tj. A2(P10,11A) w warunkach *in silico* wykazały mniej sekwencji typu *off-target* niż reagent A2, jednakże nieco więcej niż reagenty A4, A4(P10A) i A4(P10,11A). Zgodnie z liczbą sekwencji typu *off-target* oraz ze wstępnymi, krótkoterminowymi badaniami wykazano, że cząsteczki będące pochodnymi A2 mają mniej skutków ubocznych niż samo A2, mimo podania większej dawki. Jednakże więcej niż pochodne A4, które mają potencjalnie najmniej skutków ubocznych, nawet w wyższych dawkach reagentów. Substytucja w reencie AG4 wykazywała dużo potencjalnych miejsc wiązania z innym RNA poza docelowym oraz efekty uboczne we wstępnym eksperymencie (**Tab.** 17, 18), jednak jej potencjał terapeutyczny wydawał się obiecujący. Dlatego postanowiono, przetestować tę sekwencję w cząsteczce biwalentnej.

Opublikowane badania pokazują, że myszy o różnym tle genetycznym mogą wykazywać różną siłę transdukcji po wstrzyknięciu AAV-PHP.eB (Huang i in., 2019). Nośnik AAV-PHP.eB dla reagentów shRNA były znakowany eGFP pod promotorem CMV. Moje eksperymenty pokazują, że lokalizacja eGFP w mózgu jest podobna w dwóch modelach mysich, HD Hu^{128Q/21Q} i SCA3 Ki^{150Q/21Q}, które reprezentują różne tło genetyczne, odpowiednio FVB i C57 (**Rys.** 8). Ten podobny wzór transdukcji u obydwóch modeli pokazał również, że istnieją znaczące różnice w intensywności transdukcji pomiędzy różnymi strukturami mózgu (**Rys.** 8). Z tego powodu w obu badanych modelach można było stosować ten sam podział struktur oraz skorelować intensywność transdukcji danej struktury mózgu z efektywnością obniżenia HTT i ATXN3 przez reagenty.

Pierwsze przeprowadzone badanie w przypadku wektorów wirusowych polegało na obserwacji dystrybucji wstrzykiwanych reagentów w mózgu. Zaobserwowano silną transdukcję w opuszce węchowej, wzgórzu, mózdzku i pniu mózgu. Zaobserwowano

również, że kora mózgowa, prążkowie i hipokamp były słabiej transdukowane (**Rys. 4**). Należy wspomnieć, że różnice w intensywności transdukcji struktur mózgu, nie należy przypisywać różnej efektywności, selektywności promotora CMV lub stabilności białka eGFP. Nowoczesne hybrydowe promotory CMV są bardzo efektywne, promują ekspresję w wielu różnych typach komórek i nie są dotknięte problemem wyciszenia obecnym w pierwszej generacji tych promotorów CMV (Moritz i in., 2015; Surdyka i in., 2022). Hybrydowe promotory CMV są także używane do transgenezy, ekspresjonowane w komórkach macierzystych, a także są częścią zaawansowanych terapii z udziałem wirusów AAV w takich preparatach jak Zolgensma, Luxturna i Glybera (Arnold i in., 2015; Bansal i in., 2024; Ferreira i in., 2014). W moich eksperymentach transdukcja i sygnał eGFP były stabilne w czasie, zarówno po 3 tygodniach (**Rys. 5 A, C** jak i po 15 tygodniach (**Rys. 8**). Podobne wyniki uzyskano we wcześniejszych badaniach, w publikacji, której jestem współautorem, mających na celu ocenę skuteczności transdukcji komórek mózgowych po podaniu dwóch serotypów, tj. wektorów wirusowych AAVrh10 i AAV-PHP.eB trzema drogami: do jąder głębokich mózdzku, do lobul mózdzku i ogólnoustrojowo (Surdyka i in., 2022). Badania sugerują, że te same reagenty wstrzyknięte w różnych miejscach wykazują różny tropizm do komórek (Mathiesen i in., 2020; Surdyka i in., 2022).

Reagenty biwalentne również zdecydowano się podać dwóm mysim modelom chorobowym HD i SCA3. Z uwagi na kluczową rolę prążkowie w rozwoju choroby Huntingtona oraz na zakładaną wysoką transdukcję cząsteczek biwalentnych po 48h w prążkowie (Alterman i in., 2019) zdecydowano się wykonać operacje stereotaktyczne do prążkowie. Nie osiągnięto poziomu wyznaczenia Cy3 w mysim mózgu raportowanego w publikacji opisującej reagenty biwalentne (Alterman i in., 2019). Sygnał znacznika Cy3 zaobserwowano tylko w okolicy miejsca wstrzyknięcia. Po 2,5 tygodniach od iniekcji zaobserwowano sygnał fluorescencji znacznika Cy3 w korze mózgowej oraz prążkowie, czyli w obrębie miejsca iniekcji (**Rys. 22**). Może to być związane z budową anatomiczną prążkowie. Prążkowie składa się głównie ze średnich neuronów kolczastych (MSN) oraz licznych włókien zawierających lipidowe błony mielinowe, przez co jest tkanką gęstszą niż otaczające struktury mózgu. Może to powodować gromadzenie się reagenta w tej tkance i słabszą transdukcję struktur oddalonych od miejsca podania/iniekcji (Witzig i in., 2020; Zhang i in., 2012). Po obiecujących rezultatach terapeutycznych uzyskanych poprzez iniekcje biwalentnych reagentów do prążkowie w mysich modelach,

postanowiono poszerzyć zakres eksperymentu, kierując uwagę na inną lokalizację iniekcji. Wybrano iniekcje reagentów bezpośrednio do układu komorowego mózgu (ICV) w nadziei na szerszą bio-dystrybucję do innych struktur mózgu. Iniekcje bezpośrednio do komór mózgu są wybierane w celu pominięcia bariery krew-mózg, co pozwala na przeniknięcie substancji bezpośrednio do płynu mózgowo-rdzeniowego, a tym samym jej dotarcie do wielu obszarów mózgu (Cohen-Pfeffer i in., 2017). Iniekcje reagentami biwalentnymi do ICV pokazały szeroką dystrybucję w mysim mózgu. Transdukują wszystkie obszary mózgu, przede wszystkim korę przedczołową, środkową i tylną, prążkowie, hipokamp, wzgórze, podwzgórze, mózdzek, pień mózgu oraz odcinki szynne (**Rys. 25**). Wykazują akumulację w zdecydowanej większości neuronów (Alterman i in., 2019).

W przypadku systemowej dystrybucji za pośrednictwem AAV należy sprawdzić czy wektory AAV-PHP.eB. nie transdukują tkanek obwodowych niebędących celem terapii. Wcześniejsze badania pokazują, że serotyp AAV-PHP.eB powoduje niewielki procent transdukcji komórek wątroby (Konno & Hirai, 2020; Mathiesen i in., 2020; Seo i in., 2022). Analizy mikroskopowe przeprowadzone w tej pracy pokazują 1,5% transdukowanych komórek wątroby co jest wartością bardzo nieznaczną nie wywołującą istotnych zmian w fizjologii (**Rys. 14 A, 21 A**). Dodatkowo oceniono, dwa parametry biochemiczne występujące w wątrobie, które odpowiadają za ogólny stan wątroby. Nie zaobserwowano zwiększonego poziomu ALT i ASP u myszy HD i SCA3 po iniekcjach. W celu oceny stanu zwierzęcia i bezpieczeństwa stosowanej terapii postanowiono sprawdzić podstawowe parametry biochemiczne krwi. Ocenie poddano poziom cholesterolu, trójglicerydów, magnezu, wapnia oraz CK-MB, zaobserwowano tylko nieznaczne zmiany w niewielu biochemicznych parametrach krwi u myszy nastrzykniętych reagentami (**Rys. 14 B - E, 21 B - E**).

W oparciu o niewielkie skutki uboczne podczas wstępnej selekcji i skuteczność redukcji zmutowanego białka huntingtyny, oceniono efekt terapeutyczny dwóch reagentów A4(P10A) i A4(P10,11A) w długoterminowym eksperymencie 15 tygodni po podaniu odpowiedniego reagenta. Wykonano testy oceniające kondycję myszy przed i po iniekcjach. Test punktowej oceny fenotypu myszy HD (**Rys. 13 C**) i SCA3 (**Rys. 19 C**) wykazały niewielkie nieprawidłowości behawioralne. W PST po 15 tygodniach po podaniu A4(P10A) i A4(P10,11A) myszy $Hu^{128Q/21Q}$ i $Ki^{150Q/21Q}$ otrzymały średnio po 4 punkty z całkowitej skali punktacji fenotypowej, której maksymalny sumaryczny wynik

to 12 punktów, który oznacza najcięższy fenotyp myszy. Regularne pomiary masy ciała dla obu modeli wykazały spadek masy ciała po wstrzyknięciu A4(P10A) i A4(P10,11A) (**Rys. 13 A, 19 A**). Przypuszcza się, że zmiany fenotypowe prawdopodobnie wynikały z objawów łagodnego drżenia obserwowanego od 3 tygodnia eksperymentu. Masa narządów nie zmieniła się w grupie shRNA w porównaniu z grupą kontrolną (**Rys. 13 B, 19 B**). Ważną obserwacją z terapeutycznego punktu widzenia jest fakt, że masa mózgow modeli HD i SCA3 była podobna, mimo że masa ciała myszy Hu^{128Q/21Q} była o około 27% większa niż myszy Ki^{150Q/21Q}. Biorąc również pod uwagę brak transdukcji tkanek obwodowych i silną transdukcję ośrodkowego układu nerwowego, można założyć, że przy obliczaniu dawki reagenta na podstawie masy ciała myszy (vg/kg), model myszy HD otrzymał wyższą dawkę terapeutyczną niż myszy SCA3, dla mózgu o podobnej masie. Obserwacje te są zgodne z wynikami analiz molekularnych, które wskazują na słabszy efekt terapeutyczny w modelu SCA3. Takie obserwacje z pewnością powinny być brane pod uwagę przy określaniu metod obliczania dawek terapeutycznych. Jednak nie zaobserwowano znacznego pogorszenia stanu zdrowia oraz śmiertelność grupy zwierząt HD z reagentem shRNA A4(P10A) oraz A4(P10,11A) mimo większych dawek w przeliczeniu na wagę mózgu.

Eksperyment krótkoterminowy pozwolił ocenić wstępne efekty terapeutyczne po iniekcjach 8 wybranych reagentów w formie wirusowej. Przeanalizowano 3 struktury mózgu: wzgórze, korę oraz prążkowie (**Rys. 6**). Ze wszystkich reagentów, reagenty A4(P10A) i A4(P10,11A) wykazywały najbardziej obiecujący efekt terapeutyczny i potwierdziły słuszność wybrania ich do dalszych badań. Po 15 tygodniach od iniekcji tymi reagentami z shRNA oceniono poziom ekspresji białek HTT i ATXN3 oraz mRNA myszy HD i SCA3, odpowiednio w kilku wybranych strukturach mózgu. Statystycznie istotną redukcję ekspresji mRNA genu *HTT* odnotowano w 4 z 5 analizowanych struktur mózgu, tj. w korze, mózdzku, wzgórzu i prążkowie, po wstrzyknięciu A4(P10,11A). Drugi reagent, A4(P10A), wykazywał tendencję do obniżania ekspresji genu *HTT* we wszystkich strukturach (**Rys. 9**). Wyniki dla mRNA genu *ATXN3* pokazały nadekspresję genu *ATXN3*, w porównaniu do iniekcji reagentem kontrolnym, jednak nie wykazano istotności statystycznej. Sam poziom ekspresji mRNA różnił się znacznie między osobnikami (**Rys. 15**). Wyniki uzyskane dla poziomów mRNA tylko w małym stopniu korelowały z wynikami uzyskanymi w badaniu poziomów białek HTT i ATXN3.

W przypadku HD reagenty wyraźnie obniżały poziom białka w obszarach mózgu, w których transdukcja była stosunkowo wysoka (**Rys. 10**). Największe wyciszenie zmutowanego białka zaobserwowano we wzgórzu oraz w pniu mózgu dla dwóch stosowanych reagentów. Zagregowane obniżenie dla A4(P10A) osiągnęło 47% redukcji zmutowanego białka i dla A4(P10,11A) wynosiło 29% (**Rys. 11**) dla struktur dobrze wyznakowanych eGFP. Natomiast struktury mózgu słabiej wyznakowane nie wykazywały znaczącego obniżenia białka (**Rys. 11**), tylko hipokamp wykazywał spadek białka HTT. W przypadku białka ATXN3 uzyskano obniżenie w mózdzku, który jest jedną ze struktur najsilniej dotkniętą patogenezą SCA3 (**Rys. 16**). W analizie agregatów po wstrzyknięciu A4(P10A) zaobserwowano zarówno obniżenie zintegrowanej gęstości optycznej, jak i procentowej ilości agregatów [%] białka HTT w czterech badanych strukturach (**Rys. 12**). W przypadku białka ATXN3 zaobserwowano obniżenie procentowej ilości agregatów [%] w obszarze, ale nie gęstości (**Rys. 18**). Obniżenie agregatów jako głównej cechy charakterystycznej choroby wskazuje na jej obiecujący potencjał terapeutyczny w chorobach poliQ.

W eksperymencie z reagentami biwalentnymi oceniono efekt terapeutyczny w postaci obniżenia białka poliQ po iniekcjach lokalnych reagentami AG4 oraz A4(P10A). Po iniekcji reagentów do prążkowiec zaobserwowano znaczną redukcję zmutowanego poziomu białka HTT o 27% (dla AG4) oraz o 68% (dla A4(P10A)) w strukturze będącej miejscem iniekcji (**Rys. 23**). W mysim modelu SCA3 zaobserwowano statycznie istotne obniżenie białka ATXN3 w prążkowiec (**Rys. 24**). Natomiast po iniekcjach do układu komórek mózgu, najlepsze działanie biwalentnych reagentów zaobserwowano w prążkowiec oraz mózdzku. W prążkowiec zaobserwowano obniżenie poziomu zmutowanego białka ATXN3 o 41% ($p = 0,0019$), a w mózdzku o 25% ($p = 0,1093$) (**Rys. 26**). Są to struktury pełniące kluczowe role w HD oraz w SCA3. Myszom HD również wstrzyknięto biwalentne reagenty AG4 oraz A4(P10A) do układu komórek mózgu, jednak dla tego modelu iniekcje spowodowały skutki uboczne. W przyszłych badaniach należy dalej badać potencjał cząsteczek biwalentnych, modyfikując miejsce iniekcji oraz dawki.

Zarówno po podaniu reagentów wirusowych, jak i biwalentnych zaobserwowano większą wrażliwość w mysim modelu Hu^{128Q/21Q}, myszy te wykazywały większe objawy niepożądane prawdopodobnie spowodowane toksycznością reagenta. Jednakże te same reagenty dostarczone do myszy Ki^{150Q/21Q} nie wywołały u nich skutków ubocznych lub skutki uboczne były znacznie słabsze. Taka różnica we wpływie reagentów może być

spowodowana różnicami związanymi z tłem genetycznym, które dla obu modeli jest różne, odpowiednio FVB i C57 oraz masą ciała zwierząt. Mysi model HD cechuje się wyższą masą ciała, zauważalną większą ilością tkanki tłuszczowej oraz niewiele wyższą masą mózgu (**Rys. 13 B, 19 B**). Nie bez znaczenia może być również brak normalnej mysiej huntingtyny w modelu HD, natomiast są obecne formy ludzkie które są obniżane przez reagenty CAG. Być może, znaczne obniżenie całkowitego poziomu HTT może okazać się niebezpieczne dla pacjentów.

Podsumowując, wykazano obniżenie poziomu zmutowanych białek za pomocą reagentów ukierunkowanych na ciąg CAG w warunkach *in vivo*, podawanych zarówno systemowo, jak i lokalnie. Pożądaną i mniej inwazyjną metodą jest dostarczenia reagentów za pomocą iniekcji systemowej. Po pierwsze, wykazano, że reagenty w formie wirusowej, jak i biwalentnej są w stanie osiągnąć odpowiedni poziom transdukcji tkanki mózgowej. Wykazano, że wybrane reagenty w formacie AAV-PHP.eB oraz cząsteczki biwalentne są w stanie obniżyć poziom białek poliQ w wielu regionach mózgu, co daje nadzieję na zredukowanie zmutowanego białka. Zaobserwowano zależność, w której wysoki poziom wyznakowania eGFP, korelował z większą efektywnością reagentów w obniżaniu poziomu HTT i ATXN3. Wskazuje to na zależność efektywności reagentów od poziomu transdukcji struktur mózgu i na ich różną podatność na reagenty w formacie AAV, co może mieć ogromny wpływ na i efekt terapeutyczny w klinice. Co więcej, pokazano, że poziom transdukcji pewnych regionów mózgu może być znaczący, ale niewystarczający do obniżenia poziomu białka, co może również zależeć od rodzaju komórek zawierających huntingtynę oraz ataksynę (transdukowane populacje komórek) i od zastosowanego serotypu AAV.

Dodatkowo, w eksperymencie z wektorami wirusowymi sprawdzano efekty terapii na poziomie mRNA. W przypadku *HTT*, A4(P10,11A) znacząco obniżył poziom mRNA w większości badanych struktur mózgu, podczas gdy nie odnotowano statystycznego obniżenia dla A4(P10A); zaobserwowano jednak pewną tendencję (**Rys. 9**). Wpływ obu reagentów na poziom mRNA *ATXN3* nie był jednolity między strukturami mózgu, a także między wstrzykniętymi zwierzętami (**Rys. 15**).

W badaniach u Kotowska-Zimmer i in. oraz Niewiadomska-Cimicka i in. zaobserwowano preferencyjne obniżanie zmutowanej ludzkiej HTT w porównaniu do mysiej HTT. Przeprowadzono je na mysich modelach zawierających wydłużony trakt

poliQ w ludzkiej huntingtynie i z 5 powtórzeniami CAG w mysiej huntingtynie. Taka konfiguracja eksperymentalna jest metodą z wyboru, ponieważ 5 CAG w takim mysim mRNA HTT może być zbyt krótkie, aby przetestować jakiegokolwiek preferencyjne obniżenie w stosunku do ludzkiej zmutowanej HTT przez reagenty celujące w CAG (Kotowska-Zimmer i in. 2022, 2020). W moich badaniach przeprowadzono eksperymenty na biallelicznych myszach posiadających dwa ludzkie allele: z prawidłową i zwiększoną liczbą ludzkich powtórzeń CAG. Obserwując uśredniony poziom HTT w dobrze strandsukowanych strukturach w mysim modelu HD, zauważono, że reagenty bardziej obniżają poziom zmutowanej huntingtyny niż prawidłowej (**Rys. 11**). Natomiast w mysim modelu SCA3 w strukturach dobrze strandukowanych, zaobserwowano działanie reagentów tylko na zmutowaną ataksynę (**Rys. 17**). Mimo że w konkretnych strukturach reagenty działały na zmutowane i prawidłowe białka, jednak uśrednione obniżenie wskazuje na potencjał reagentów i ich dalsze modyfikacje w kierunku większej preferencji dla allelu zmutowanego. W pracach opublikowanych wcześniej, reagenty ukierunkowane na CAG osiągnęły redukcję białka ATXN3 i wykazały pewien stopień alleloselektywności w precyzyjnie zoptymalizowanych warunkach hodowli komórkowej *in vitro*. Jednak nawet w tych zoptymalizowanych warunkach reagenty CAG były mniej skuteczne na ATXN3 niż w przypadku obniżenia białka HTT *in vitro* (Fischer i in., 2011). Różnica w skuteczności obniżania dla huntingtyny i białka ataksyny-3 może zależeć od lokalizacji szlaku CAG w eksonach odpowiednich genów (Ciesiolka i in., 2021).

Zaproponowane podejście wskazuje, że reagenty celujące w CAG dostarczane w wektorze wirusowym AAV-PHP.eB przez BBB oraz cząsteczki biwalentne są obiecującym podejściem terapeutycznym w chorobach poliQ. Moje wyniki wskazują, że dostarczenie AAV-PHP.eB poprzez iniekcję retro-orbitalną ma duży potencjał w leczeniu chorób poliQ, ze względu na niższą inwazyjność, selektywność do tkanki mózgowej za sprawą przekraczania bariery krew-mózg i ogólnym profilem bezpieczeństwa za sprawą niewielkiego wpływu na tkanki obwodowe i fizjologię organizmu. Jednym z możliwych kierunków dalszego rozwoju tych terapeutyków jest zbadanie ich potencjalnego wpływu na obniżanie poziomu zmutowanych białek powstających jako rezultat ekspansji somatycznych w chorobach poliQ.

9. Wnioski

- Reagenty AAV-PHP.eB_shRNA dostarczone poprzez iniekcje retro-orbitalne przechodzą przez barierę krew-mózg i są w stanie osiągnąć bardzo dobrą biodystrybucję w mysim mózgu już po 3 tygodniach od iniekcji. Wysoki poziom transdukcji tkanek mózgowych utrzymywał się niezmiennie, aż do zakończenia eksperymentu w 15 tygodniu po iniekcji.
- Iniekcje lokalne z zastosowaniem cząsteczek biwalentnych również wykazują transdukcję tkanek w mózgu, zarówno po iniekcji do prążkowie, jak i do układu komór mózgu.
- Wykazano, że wybrane reagenty w formie AAV-PHP.eB oraz cząsteczki biwalentne z RNA są w stanie obniżyć poziom białek poliQ w wielu regionach mózgu oraz poziom ich agregatów.
- Wykazano zależność pomiędzy transdukcją wybranych regionów mózgu, a obniżeniem poziomu zmutowanego białka poliQ.
- Reagenty AAV-PHP.eB_shRNA są bezpieczne, nie transdukuje tkanek obwodowych i nie zmieniają parametrów biochemicznych organizmu. Nie zaobserwowano zmian w masie badanych narządów. Test punktowej oceny fenotypu nie wykazał istotnych zmian świadczących o postępujących objawach fenotypowych związanych z badanymi chorobami HD i SCA3.
- Największy potencjał reagentów zaobserwowano na mysim modelu choroby Huntingtona.

10. Bibliografia

- Ajitkumar, A., & De Jesus, O. (2023). Huntington Disease. W *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559166/>
- Alothman, D., Marshall, C. R., Tyrrell, E., Lewis, S., Card, T., & Fogarty, A. (2022). Risk of mortality from suicide in patients with Huntington's disease is increased compared to the general population in England. *Journal of Neurology*, 269(8), 4436.
<https://doi.org/10.1007/s00415-022-11085-z>
- Alterman, J. F., Godinho, B. M. D. C., Hassler, M. R., Ferguson, C. M., Echeverria, D., Sapp, E., Haraszti, R. A., Coles, A. H., Conroy, F., Miller, R., Roux, L., Yan, P., Knox, E. G., Turanov, A. A., King, R. M., Gernoux, G., Mueller, C., Gray-Edwards, H. L., Moser, R. P., ... Khvorova, A. (2019). A divalent siRNA chemical scaffold for potent and sustained modulation of gene expression throughout the central nervous system. *Nature Biotechnology*, 37(8), 884–894. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0205-0>
- André, V. M., Cepeda, C., & Levine, M. S. (2010). Dopamine and Glutamate in Huntington's Disease: A Balancing Act. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 16(3), 163–178.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00134.x>
- Antony, P. M. A., Mäntele, S., Mollenkopf, P., Boy, J., Kehlenbach, R. H., Riess, O., & Schmidt, T. (2009). Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiology of Disease*, 36(2), 280–292.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.020>
- Arnold, W. D., Kassar, D., & Kissel, J. T. (2015). Spinal Muscular Atrophy: Diagnosis and Management in a New Therapeutic Era. *Muscle & nerve*, 51(2), 157–167.
<https://doi.org/10.1002/mus.24497>
- Ayala, I. N., Aziz, S., Argudo, J. M., Yopez, M., Camacho, M., Ojeda, D., Aguirre, A. S., Oña, S., Andrade, A. F., Vasudhar, A., Moncayo, J. A., Hassen, G., Ortiz, J. F., & Tambo, W. (2022). Use of Riluzole for the Treatment of Hereditary Ataxias: A Systematic Review. *Brain Sciences*, 12(8), 1040. <https://doi.org/10.3390/brainsci12081040>
- Bakels, H. S., Roos, R. A. C., van Roon-Mom, W. M. C., & de Bot, S. T. (2022). Juvenile-Onset Huntington Disease Pathophysiology and Neurodevelopment: A Review. *Movement Disorders*, 37(1), 16–24. <https://doi.org/10.1002/mds.28823>
- Bansal, A., Sharma, S., Kethamreddy, M., & Pandey, M. (2024). Radiosynthesis and biodistribution analysis of [89Zr]Zr-AAV9-CMV-fLuc and [89Zr]Zr-AAVBR1-CMV-fLuc in BALB/c mice. *Journal of Nuclear Medicine*, 65(supplement 2), 242366–242366. https://jnm.snmjournals.org/content/65/supplement_2/242366

- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, *1*, 15005. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
- Bauer, P. O., & Nukina, N. (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *Journal of Neurochemistry*, *110*(6), 1737–1765. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06302.x>
- Bennett, C. F., & Swayze, E. E. (2010). RNA targeting therapeutics: Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *50*, 259–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654>
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, *409*(6818), 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Bettencourt, C., & Lima, M. (2011). Machado-Joseph Disease: From first descriptions to new perspectives. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *6*, 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-35>
- Bettencourt, C., Santos, C., Montiel, R., Costa, M. do C., Cruz-Morales, P., Santos, L. R., Simões, N., Kay, T., Vasconcelos, J., Maciel, P., & Lima, M. (2010). Increased transcript diversity: Novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3). *Neurogenetics*, *11*(2), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s10048-009-0216-y>
- Bijlani, S., Pang, K. M., Sivanandam, V., Singh, A., & Chatterjee, S. (2022). The Role of Recombinant AAV in Precise Genome Editing. *Frontiers in Genome Editing*, *3*, 799722. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.799722>
- Borrell-Pagès, M., Zala, D., Humbert, S., & Saudou, F. (2006). Huntington's disease: From huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *63*(22), 2642–2660. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6242-0>
- Bowman, A. B., Yoo, S.-Y., Dantuma, N. P., & Zoghbi, H. Y. (2005). Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Human Molecular Genetics*, *14*(5), 679–691. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi064>
- Bramsen, J. B., Laursen, M. B., Nielsen, A. F., Hansen, T. B., Bus, C., Langkjaer, N., Babu, B. R., Højland, T., Abramov, M., Van Aerschot, A., Odadzic, D., Smicius, R., Haas, J., Andree, C., Barman, J., Wenska, M., Srivastava, P., Zhou, C., Honcharenko, D., ... Kjems, J. (2009). A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. *Nucleic Acids Research*, *37*(9), 2867–2881. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp106>

- Buijsen, R. A. M., Toonen, L. J. A., Gardiner, S. L., & van Roon-Mom, W. M. C. (2019). Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, *16*(2), 263–286. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00696-y>
- Butler, M., Hayes, C. S., Chappell, A., Murray, S. F., Yaksh, T. L., & Hua, X.-Y. (2005). Spinal distribution and metabolism of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotides after intrathecal administration in rats. *Neuroscience*, *131*(3), 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.038>
- Caron, N. S., Wright, G. E., & Hayden, M. R. (1993). Huntington Disease. W M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Red.), *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1305/>
- Carvalho, D. R., La Rocque-Ferreira, A., Rizzo, I. M., Imamura, E. U., & Speck-Martins, C. E. (2008). Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatric Neurology*, *38*(4), 296–299. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.006>
- Casaca-Carreira, J., Temel, Y., Larrakoetxea, I., & Jahansahi, A. (2017). Distribution and Penetration of Intracerebroventricularly Administered 2'OMePS Oligonucleotide in the Mouse Brain. *Nucleic Acid Therapeutics*, *27*(1), 4–10. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0642>
- Cattaneo, E., Zuccato, C., & Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: An alternative approach to Huntington's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrn1806>
- Caviston, J. P., Ross, J. L., Antony, S. M., Tokito, M., & Holzbaur, E. L. F. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(24), 10045–10050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610628104>
- Chai, Y., Shao, J., Miller, V. M., Williams, A., & Paulson, H. L. (2002). Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(14), 9310–9315. <https://doi.org/10.1073/pnas.152101299>
- Chai, Y., Wu, L., Griffin, J. D., & Paulson, H. L. (2001). The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(48), 44889–44897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106575200>
- Chan, K. Y., Jang, M. J., Yoo, B. B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.-L., Sánchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S. K., Deverman, B. E., & Gradinaru, V. (2017). Engineered

- AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nature Neuroscience*, 20(8), 1172–1179. <https://doi.org/10.1038/nn.4593>
- Charvin, D., Vanhoutte, P., Pagès, C., Borrelli, E., & Caboche, J. (2005). Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: The dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), 12218–12223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502698102>
- Chauhan, N. B. (2002). Trafficking of intracerebroventricularly injected antisense oligonucleotides in the mouse brain. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 12(5), 353–357. <https://doi.org/10.1089/108729002761381320>
- Chen, J., Huang, L., Yang, Y., Xu, W., Qin, Q., Qin, R., Liang, X., Lai, X., Huang, X., Xie, M., & Chen, L. (2023). Somatic Cell Reprogramming for Nervous System Diseases: Techniques, Mechanisms, Potential Applications, and Challenges. *Brain Sciences*, 13(3), 524. <https://doi.org/10.3390/brainsci13030524>
- Chen, J. Y., Wang, E. A., Cepeda, C., & Levine, M. S. (2013). Dopamine imbalance in Huntington's disease: A mechanism for the lack of behavioral flexibility. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 114. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00114>
- Choung, S., Kim, Y. J., Kim, S., Park, H.-O., & Choi, Y.-C. (2006). Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(3), 919–927. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.049>
- Ciesiolka, A., Stroynowska-Czerwinska, A., Joachimiak, P., Ciolak, A., Kozłowska, E., Michalak, M., Dabrowska, M., Olejniczak, M., Raczynska, K. D., Zielinska, D., Wozna-Wysocka, M., Krzyzosiak, W. J., & Fiszer, A. (2021). Artificial miRNAs targeting CAG repeat expansion in ORFs cause rapid deadenylation and translation inhibition of mutant transcripts. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 78(4), 1577–1596. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03596-7>
- Ciosi, M., Maxwell, A., Cumming, S. A., Hensman Moss, D. J., Alshammari, A. M., Flower, M. D., Durr, A., Leavitt, B. R., Roos, R. A. C., TRACK-HD team, Enroll-HD team, Holmans, P., Jones, L., Langbehn, D. R., Kwak, S., Tabrizi, S. J., & Monckton, D. G. (2019). A genetic association study of glutamine-encoding DNA sequence structures, somatic CAG expansion, and DNA repair gene variants, with Huntington disease clinical outcomes. *EBioMedicine*, 48, 568–580. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.09.020>
- Cohen-Pfeffer, J. L., Gururangan, S., Lester, T., Lim, D. A., Shaywitz, A. J., Westphal, M., & Slave, I. (2017). Intracerebroventricular Delivery as a Safe, Long-Term Route of Drug Administration. *Pediatric Neurology*, 67, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2016.10.022>

- Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pagès, M., Li, X.-J., Saudou, F., & Humbert, S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *The EMBO Journal*, *27*(15), 2124–2134. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.133>
- Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Höhfeld, J., & Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nature Cell Biology*, *3*(1), 93–96. <https://doi.org/10.1038/35050618>
- Costa, M. do C., & Paulson, H. L. (2012). Toward understanding Machado-Joseph Disease. *Progress in Neurobiology*, *97*(2), 239–257. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.006>
- Deverman, B. E., Pravdo, P. L., Simpson, B. P., Kumar, S. R., Chan, K. Y., Banerjee, A., Wu, W.-L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S. P., & Gradinaru, V. (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nature Biotechnology*, *34*(2), 204–209. <https://doi.org/10.1038/nbt.3440>
- Donaldson, K. M., Li, W., Ching, K. A., Batalov, S., Tsai, C.-C., & Joazeiro, C. A. P. (2003). Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(15), 8892–8897. <https://doi.org/10.1073/pnas.1530212100>
- Ehrlich, M. E. (2012). Huntington's disease and the striatal medium spiny neuron: Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *9*(2), 270–284. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0112-2>
- Ellisdon, A. M., Thomas, B., & Bottomley, S. P. (2006). The two-stage pathway of ataxin-3 fibrillogenesis involves a polyglutamine-independent step. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(25), 16888–16896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601470200>
- Etchebehere, E. C., Cendes, F., Lopes-Cendes, I., Pereira, J. A., Lima, M. C., Sansana, C. R., Silva, C. A., Camargo, M. F., Santos, A. O., Ramos, C. D., & Camargo, E. E. (2001). Brain single-photon emission computed tomography and magnetic resonance imaging in Machado-Joseph disease. *Archives of Neurology*, *58*(8), 1257–1263. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.8.1257>
- Evers, M. M., Toonen, L. J. A., & van Roon-Mom, W. M. C. (2014). Ataxin-3 Protein and RNA Toxicity in Spinocerebellar Ataxia Type 3: Current Insights and Emerging Therapeutic Strategies. *Molecular Neurobiology*, *49*(3), 1513–1531. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8596-2>
- Evers, M. M., Tran, H.-D., Zalachoras, I., Pepers, B. A., Meijer, O. C., den Dunnen, J. T., van Ommen, G.-J. B., Aartsma-Rus, A., & van Roon-Mom, W. M. C. (2013). Ataxin-3 protein modification as a treatment strategy for spinocerebellar ataxia type 3: Removal

- of the CAG containing exon. *Neurobiology of Disease*, 58, 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.04.019>
- Evert, B. O., Schelhaas, J., Fleischer, H., de Vos, R. a. I., Brunt, E. R., Stenzel, W., Klockgether, T., & Wüllner, U. (2006). Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clinical Neuropathology*, 25(6), 272–281.
- Evert, B. O., Vogt, I. R., Kindermann, C., Ozimek, L., de Vos, R. A., Brunt, E. R., Schmitt, I., Klockgether, T., & Wüllner, U. (2001). Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(15), 5389–5396. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-15-05389.2001>
- Fan, H.-C., Ho, L.-I., Chi, C.-S., Chen, S.-J., Peng, G.-S., Chan, T.-M., Lin, S.-Z., & Harn, H.-J. (2014). Polyglutamine (PolyQ) Diseases: Genetics to Treatments. *Cell Transplantation*, 23(4–5), 441–458. <https://doi.org/10.3727/096368914X678454>
- Ferreira, V., Petry, H., & Salmon, F. (2014). Immune Responses to AAV-Vectors, the Glybera Example from Bench to Bedside. *Frontiers in Immunology*, 5, 82.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00082>
- Figiel, M., Szlachcic, W. J., Switonski, P. M., Gabka, A., & Krzyzosiak, W. J. (2012). Mouse Models of Polyglutamine Diseases: Review and Data Table. Part I. *Molecular Neurobiology*, 46(2), 393–429. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8315-4>
- Fiszer, A., Mykowska, A., & Krzyzosiak, W. J. (2011). Inhibition of mutant huntingtin expression by RNA duplex targeting expanded CAG repeats. *Nucleic Acids Research*, 39(13), 5578–5585. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr156>
- Fiszer, A., Olejniczak, M., Galka-Marciniak, P., Mykowska, A., & Krzyzosiak, W. J. (2013). Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression. *Nucleic Acids Research*, 41(22), 10426–10437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt825>
- Fukutake, T., Shinotoh, H., Nishino, H., Ichikawa, Y., Goto, J., Kanazawa, I., & Hattori, T. (2002). Homozygous Machado-Joseph disease presenting as REM sleep behaviour disorder and prominent psychiatric symptoms. *European Journal of Neurology*, 9(1), 97–100. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2002.00335.x>
- Galts, C. P. C., Bettio, L. E. B., Jewett, D. C., Yang, C. C., Brocardo, P. S., Rodrigues, A. L. S., Thacker, J. S., & Gil-Mohapel, J. (2019). Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 102, 56–84. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.002>
- Garrett, M. C., & Soares-da-Silva, P. (1992). Increased cerebrospinal fluid dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid levels in Huntington's disease: Evidence for an overactive

- dopaminergic brain transmission. *Journal of Neurochemistry*, 58(1), 101–106.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09283.x>
- Gatto, E. M., Rojas, N. G., Persi, G., Etcheverry, J. L., Cesarini, M. E., & Perandones, C. (2020). Huntington disease: Advances in the understanding of its mechanisms. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders*, 3, 100056.
<https://doi.org/10.1016/j.prdoa.2020.100056>
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., & Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681), 464–471. <https://doi.org/10.1038/nature24644>
- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelières, F. P., De Mey, J., MacDonald, M. E., Lessmann, V., Humbert, S., & Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 118(1), 127–138.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.018>
- Gil, J. M., & Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2803–2820. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06310.x>
- Goodman, A. O. G., Murgatroyd, Peter. R., Medina-Gomez, G., Wood, N. I., Finan, N., Vidal-Puig, A. J., Morton, A. J., & Barker, R. A. (2008). The metabolic profile of early Huntington's disease- a combined human and transgenic mouse study. *Experimental Neurology*, 210(2), 691–698. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.026>
- Gómez-Virgilio, L., Silva-Lucero, M.-C., Flores-Morelos, D.-S., Gallardo-Nieto, J., Lopez-Toledo, G., Abarca-Fernandez, A.-M., Zacapala-Gómez, A.-E., Luna-Muñoz, J., Montiel-Sosa, F., Soto-Rojas, L. O., Pacheco-Herrero, M., & Cardenas-Aguayo, M.-C. (2022). Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells*, 11(15), 2262.
<https://doi.org/10.3390/cells11152262>
- Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., Watkins, P. C., Ottina, K., Wallace, M. R., Sakaguchi, A. Y., Young, A. B., Shoulson, I., Bonilla, E., & Martin, J. B. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234–238. <https://doi.org/10.1038/306234a0>
- Guyenet, S. J., Furrer, S. A., Damian, V. M., Baughan, T. D., La Spada, A. R., & Garden, G. A. (2010). A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 39, 1787.
<https://doi.org/10.3791/1787>

- Hofmann, K., & Falquet, L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 347–350. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01835-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01835-7)
- Hong, E. P., MacDonald, M. E., Wheeler, V. C., Jones, L., Holmans, P., Orth, M., Monckton, D. G., Long, J. D., Kwak, S., Gusella, J. F., & Lee, J.-M. (2021). Huntington's Disease Pathogenesis: Two Sequential Components. *Journal of Huntington's Disease*, 10(1), 35–51. <https://doi.org/10.3233/JHD-200427>
- Horimoto, Y., Matsumoto, M., Yuasa, H., Kojima, A., Nokura, K., Katada, E., Yamamoto, T., Yamamoto, H., & Mitake, S. (2008). Brainstem in Machado-Joseph disease: Atrophy or small size? *European Journal of Neurology*, 15(1), 102–105. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2007.02008.x>
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Liang, X.-J. (2020). Therapeutic siRNA: State of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
- Hu, J., Liu, J., & Corey, D. R. (2010). Allele-selective inhibition of huntingtin expression by switching to an miRNA-like RNAi mechanism. *Chemistry & Biology*, 17(11), 1183–1188. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.10.013>
- Hübener, J., Casadei, N., Teismann, P., Seeliger, M. W., Björkqvist, M., von Hörsten, S., Riess, O., & Nguyen, H. P. (2012). Automated behavioral phenotyping reveals presymptomatic alterations in a SCA3 genetrapped mouse model. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 39(6), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.009>
- Ichikawa, Y., Goto, J., Hattori, M., Toyoda, A., Ishii, K., Jeong, S. Y., Hashida, H., Masuda, N., Ogata, K., Kasai, F., Hirai, M., Maciel, P., Rouleau, G. A., Sakaki, Y., & Kanazawa, I. (2001). The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *Journal of Human Genetics*, 46(7), 413–422. <https://doi.org/10.1007/s100380170060>
- Issa, S. S., Shaimardanova, A. A., Solovyeva, V. V., & Rizvanov, A. A. (2023). Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. *Cells*, 12(5), 785. <https://doi.org/10.3390/cells12050785>
- Jacobi, H., Schaprian, T., Schmitz-Hübsch, T., Schmid, M., & Klockgether, T. (2023). Disease progression of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3 and 6 before and after ataxia onset. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 10(10), 1833–1843. <https://doi.org/10.1002/acn3.51875>
- Kim, D.-H., Behlke, M. A., Rose, S. D., Chang, M.-S., Choi, S., & Rossi, J. J. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology*, 23(2), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nbt1051>

- Koehler, P. J., & Jennekens, F. G. I. (2008). Vinken and Bruyn's Handbook of Clinical Neurology. *Journal of the History of the Neurosciences*, 17(1), 46–55.
<https://doi.org/10.1080/09647040600820050>
- Konno, A., & Hirai, H. (2020). Efficient whole brain transduction by systemic infusion of minimally purified AAV-PHP.eB. *Journal of Neuroscience Methods*, 346, 108914.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108914>
- Kotowska-Zimmer, A., Przybyl, L., Pewinska, M., Suszynska-Zajczyk, J., Wronka, D., Figiel, M., & Olejniczak, M. (2022). A CAG repeat-targeting artificial miRNA lowers the mutant huntingtin level in the YAC128 model of Huntington's disease. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 28, 702–715. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.04.031>
- Krobitsch, S., & Lindquist, S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), 1589–1594.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1589>
- Landwehrmeyer, G. B., Standaert, D. G., Testa, C. M., Penney, J. B., & Young, A. B. (1995). NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(7 Pt 2), 5297–5307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-07-05297.1995>
- Leotti, V. B., de Vries, J. J., Oliveira, C. M., de Mattos, E. P., Te Meerman, G. J., Brunt, E. R., Kampinga, H. H., Jardim, L. B., & Verbeek, D. S. (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>
- Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R. N., & Chakravarti, D. (2002). Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45004–45012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205259200>
- Lieberman, A. P., Shakkottai, V. G., & Albin, R. L. (2019). Polyglutamine Repeats in Neurodegenerative Diseases. *Annual review of pathology*, 14, 1–27.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012857>
- Liu, X., Wang, C.-E., Hong, Y., Zhao, T., Wang, G., Gaertig, M. A., Sun, M., Li, S., & Li, X.-J. (2016). N-terminal Huntingtin Knock-In Mice: Implications of Removing the N-terminal Region of Huntingtin for Therapy. *PLoS Genetics*, 12(5), e1006083.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006083>
- MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S. A., James, M., Groot, N., MacFarlane, H., Jenkins, B., Anderson, M. A., Wexler, N. S., Gusella, J. F., Bates, G. P., Baxendale, S., Hummerich, H., Kirby, S., ... Harper, P. S. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded

- and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971–983.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-E)
- Macedo-Ribeiro, S., Cortes, L., Maciel, P., & Carvalho, A. L. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3. *PLoS One*, 4(6), e5834.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005834>
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S. W., & Bates, G. P. (1996). Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. *Cell*, 87(3), 493–506. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81369-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81369-0)
- Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P. P., Polo, S., Hodsdon, M. E., & De Camilli, P. (2005). Deubiquitinating function of ataxin-3: Insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12700–12705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506344102>
- Martinez-Horta, S., Sampedro, F., Horta-Barba, A., Perez-Perez, J., Pagonabarraga, J., Gomez-Anson, B., & Kulisevsky, J. (2020). Structural brain correlates of dementia in Huntington's disease. *NeuroImage: Clinical*, 28, 102415.
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102415>
- Martinez-Vicente, M. (2015). Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2015.03.005>
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., & Cuervo, A. M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature Neuroscience*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nn.2528>
- Mathiesen, S. N., Lock, J. L., Schoderboeck, L., Abraham, W. C., & Hughes, S. M. (2020). CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 19, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.10.011>
- Matos, C. A., de Macedo-Ribeiro, S., & Carvalho, A. L. (2011). Polyglutamine diseases: The special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Progress in Neurobiology*, 95(1), 26–48. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.007>
- Matsui, M., & Corey, D. R. (2012). Allele-selective inhibition of trinucleotide repeat genes. *Drug Discovery Today*, 17(9–10), 443–450.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.01.006>
- Matz, O. C., & Spocter, M. (b.d.). The Effect of Huntington's Disease on the Basal Nuclei: A Review. *Cureus*, 14(4), e24473. <https://doi.org/10.7759/cureus.24473>

- McCartan, R., Khorkova, O., Volmar, C.-H., & Wahlestedt, C. (2023). Nucleic acid-based therapeutics for the treatment of central nervous system disorders. *Frontiers in Genetics, 14*, 1250276. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1250276>
- McLoughlin, H. S., Moore, L. R., & Paulson, H. L. (2020). Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiology of Disease, 134*, 104635. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104635>
- McNamara, J. O., Andrechek, E. R., Wang, Y., Viles, K. D., Rempel, R. E., Gilboa, E., Sullenger, B. A., & Giangrande, P. H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nature Biotechnology, 24*(8), 1005–1015. <https://doi.org/10.1038/nbt1223>
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell, 15*(2), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>
- Mezzina, M., & Merten, O.-W. (2011). Adeno-associated viruses. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 737*, 211–234. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9_9
- Miyazaki, I., & Asanuma, M. (2009). Approaches to Prevent Dopamine Quinone-Induced Neurotoxicity. *Neurochemical Research, 34*(4), 698–706. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9843-1>
- Moritz, B., Becker, P. B., & Göpfert, U. (2015). CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells. *Scientific Reports, 5*, 16952. <https://doi.org/10.1038/srep16952>
- Mouro Pinto, R., Arning, L., Giordano, J. V., Razghandi, P., Andrew, M. A., Gillis, T., Correia, K., Mysore, J. S., Grote Urtubey, D.-M., Parwez, C. R., von Hein, S. M., Clark, H. B., Nguyen, H. P., Förster, E., Beller, A., Jayadaev, S., Keene, C. D., Bird, T. D., Lucente, D., ... Wheeler, V. C. (2020). Patterns of CAG repeat instability in the central nervous system and periphery in Huntington's disease and in spinocerebellar ataxia type 1. *Human Molecular Genetics, 29*(15), 2551–2567. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa139>
- Nance, M. A. (1998). Huntington Disease: Clinical, Genetic, and Social Aspects. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology, 11*(2), 61–70. <https://doi.org/10.1177/089198879801100204>
- Nicastro, G., Habeck, M., Masino, L., Svergun, D. I., & Pastore, A. (2006). Structure validation of the Josephin domain of ataxin-3: Conclusive evidence for an open conformation. *Journal of Biomolecular NMR, 36*(4), 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10858-006-9092-z>
- Nicastro, G., Menon, R. P., Masino, L., Knowles, P. P., McDonald, N. Q., & Pastore, A. (2005). The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: Structural determinants for

- molecular recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(30), 10493–10498. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501732102>
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K. Y., Shimatani, Z., & Kondo, A. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science (New York, N.Y.)*, *353*(6305), aaf8729. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8729>
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2013). Dysregulation of synaptic proteins, dendritic spine abnormalities and pathological plasticity of synapses as experience-dependent mediators of cognitive and psychiatric symptoms in Huntington’s disease. *Neuroscience*, *251*, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.043>
- Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., & Kwakowsky, A. (2019). The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington’s Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00258>
- Paulson, H. (2018). Repeat expansion diseases. *Handbook of Clinical Neurology*, *147*, 105–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9>
- Petersén, Å., & Björkqvist, M. (2006). Hypothalamic–endocrine aspects in Huntington’s disease. *European Journal of Neuroscience*, *24*(4), 961–967. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04985.x>
- Petersén, Å., Gil, J., Maat-Schieman, M. L. C., Björkqvist, M., Tanila, H., Araújo, I. M., Smith, R., Popovic, N., Wierup, N., Norlén, P., Li, J.-Y., Roos, R. A. C., Sundler, F., Mulder, H., & Brundin, P. (2005). Orexin loss in Huntington’s disease. *Human Molecular Genetics*, *14*(1), 39–47. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi004>
- Piasecki, P., Wiatr, K., Ruszkowski, M., Marczak, Ł., Trottier, Y., & Figiel, M. (2023). Impaired interactions of ataxin-3 with protein complexes reveals their specific structure and functions in SCA3 Ki150 model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *16*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2023.1122308>
- Quarrell, O. W. J., Nance, M. A., Nopoulos, P., Paulsen, J. S., Smith, J. A., & Squitieri, F. (2013). Managing juvenile Huntington’s disease. *Neurodegenerative Disease Management*, *3*(3). <https://doi.org/10.2217/nmt.13.18>
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O’Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics*, *36*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/ng1362>
- Reina, C. P., Zhong, X., & Pittman, R. N. (2010). Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Human Molecular Genetics*, *19*(2), 235–249. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp482>

- Reiner, A., Dragatsis, I., & Dietrich, P. (2011). GENETICS AND NEUROPATHOLOGY OF HUNTINGTON'S DISEASE. *International review of neurobiology*, 98, 325–372. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381328-2.00014-6>
- Roos, R. A. (2010). Huntington's disease: A clinical review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-40>
- Rüb, U., Hoche, F., Brunt, E. R., Heinsen, H., Seidel, K., Del Turco, D., Paulson, H. L., Bohl, J., von Gall, C., Vonsattel, J., Korf, H., & den Dunnen, W. F. (2012). Degeneration of the Cerebellum in Huntington's Disease (HD): Possible Relevance for the Clinical Picture and Potential Gateway to Pathological Mechanisms of the Disease Process. *Brain Pathology*, 23(2), 165–177. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00629.x>
- Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J. C., Seidel, K., Korf, H.-W., & Deller, T. (2013). Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Progress in Neurobiology*, 104, 38–66. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.01.001>
- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron*, 89(5), 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>
- Savitt, D., & Jankovic, J. (2019). Clinical phenotype in carriers of intermediate alleles in the huntingtin gene. *Journal of the Neurological Sciences*, 402, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.05.010>
- Sayed, N., Allawadhi, P., Khurana, A., Singh, V., Navik, U., Pasumarthi, S. K., Khurana, I., Banothu, A. K., Weiskirchen, R., & Bharani, K. K. (2022). Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sciences*, 294, 120375. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120375>
- Scaglione, K. M., Zavodszky, E., Todi, S. V., Patury, S., Xu, P., Rodríguez-Lebrón, E., Fischer, S., Konen, J., Djarmati, A., Peng, J., Gestwicki, J. E., & Paulson, H. L. (2011). Ube2w and ataxin-3 coordinately regulate the ubiquitin ligase CHIP. *Molecular Cell*, 43(4), 599–612. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.036>
- Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G. P., Lehrach, H., & Wanker, E. E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: Implications for Huntington's disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4604–4609. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4604>
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G. B., Schmitt, I., Trottier, Y., Auburger, G., Laccone, F., Klockgether, T., Völpel, M., Epplen, J. T., Schöls, L., & Riess, O. (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), 669–679. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x>

- Schmitt, I., Linden, M., Khazneh, H., Evert, B. O., Breuer, P., Klockgether, T., & Wuellner, U. (2007). Inactivation of the mouse *Atnx3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *362*(3), 734–739. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.062>
- Schöls, L., Amoiridis, G., Langkafel, M., Büttner, T., Przuntek, H., Riess, O., Vieira-Saecker, A. M., & Epplen, J. T. (1995). Machado-Joseph disease mutations as the genetic basis of most spinocerebellar ataxias in Germany. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *59*(4), 449–450. <https://doi.org/10.1136/jnnp.59.4.449>
- Schulte, J., & Littleton, J. T. (2011). The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Current trends in neurology*, *5*, 65–78. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237673/>
- Schwarcz, R., Guidetti, P., Sathyasaikumar, K. V., & Muchowski, P. J. (2010). Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, *90*(2), 230–245. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.005>
- Semaka, A., Creighton, S., Warby, S., & Hayden, M. R. (2006). Predictive testing for Huntington disease: Interpretation and significance of intermediate alleles. *Clinical Genetics*, *70*(4), 283–294. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00668.x>
- Seo, J. W., Ajenjo, J., Wu, B., Robinson, E., Raie, M. N., Wang, J., Tumbale, S. K., Buccino, P., Anders, D. A., Shen, B., Habte, F. G., Beinat, C., James, M. L., Reyes, S. T., Ravindra Kumar, S., Miles, T. F., Lee, J. T., Gradinaru, V., & Ferrara, K. W. (2022). Multimodal imaging of capsid and cargo reveals differential brain targeting and liver detargeting of systemically-administered AAVs. *Biomaterials*, *288*, 121701. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121701>
- Shelbourne, P. F., Keller-McGandy, C., Bi, W. L., Yoon, S.-R., Dubeau, L., Veitch, N. J., Vonsattel, J. P., Wexler, N. S., US-Venezuela Collaborative Research Group, Arnheim, N., & Augood, S. J. (2007). Triplet repeat mutation length gains correlate with cell-type specific vulnerability in Huntington disease brain. *Human Molecular Genetics*, *16*(10), 1133–1142. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm054>
- Silveira, I., Lopes-Cendes, I., Kish, S., Maciel, P., Gaspar, C., Coutinho, P., Botez, M. I., Teive, H., Arruda, W., Steiner, C. E., Pinto-Júnior, W., Maciel, J. A., Jerin, S., Sack, G., Andermann, E., Sudarsky, L., Rosenberg, R., MacLeod, P., Chitayat, D., ... Rouleau, G. A. (1996). Frequency of spinocerebellar ataxia type 1, dentatorubropallidoluysian atrophy, and Machado-Joseph disease mutations in a large group of spinocerebellar ataxia patients. *Neurology*, *46*(1), 214–218. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.1.214>
- Sliva, K., & Schnierle, B. S. (2010). Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology Journal*, *7*, 248. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-248>

- Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5689), 1434–1437. <https://doi.org/10.1126/science.1102514>
- Southwell, A. L., Skotte, N. H., Villanueva, E. B., Østergaard, M. E., Gu, X., Kordasiewicz, H. B., Kay, C., Cheung, D., Xie, Y., Waltl, S., Dal Cengio, L., Findlay-Black, H., Doty, C. N., Petoukhov, E., Iworima, D., Slama, R., Ooi, J., Pouladi, M. A., Yang, X. W., ... Hayden, M. R. (2017). A novel humanized mouse model of Huntington disease for preclinical development of therapeutics targeting mutant huntingtin alleles. *Human Molecular Genetics*, *26*(6), 1115–1132. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx021>
- Stoker, T. B., Holden, S. T., & Barker, R. A. (2021). Late-onset Huntington's disease associated with CAG repeat lengths of 30 and 31. *Journal of Neurology*, *268*(10), 3916–3919. <https://doi.org/10.1007/s00415-021-10633-3>
- Sturrock, A., & Leavitt, B. R. (2010). The Clinical and Genetic Features of Huntington Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, *23*(4), 243–259. <https://doi.org/10.1177/0891988710383573>
- Surdyka, M., Jesion, E., Niewiadomska-Cimicka, A., Trottier, Y., Kalinowska-Poška, Ż., & Figiel, M. (2022). Selective transduction of cerebellar Purkinje and granule neurons using delivery of AAV-PHP.eB and AAVrh10 vectors at axonal terminal locations. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*, 947490. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.947490>
- Swami, M., Hendricks, A. E., Gillis, T., Massood, T., Mysore, J., Myers, R. H., & Wheeler, V. C. (2009). Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. *Human Molecular Genetics*, *18*(16), 3039–3047. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp242>
- Switonski, P. M., Szlachcic, W. J., Krzyzosiak, W. J., & Figiel, M. (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*, 174–188. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.020>
- Taylor, J. P., Hardy, J., & Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5575), 1991–1995. <https://doi.org/10.1126/science.1067122>
- Telenius, H., Kremer, B., Goldberg, Y. P., Theilmann, J., Andrew, S. E., Zeisler, J., Adam, S., Greenberg, C., Ives, E. J., & Clarke, L. A. (1994). Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nature Genetics*, *6*(4), 409–414. <https://doi.org/10.1038/ng0494-409>

- Trottier, Y., Cancel, G., An-Gourfinkel, I., Lutz, Y., Weber, C., Brice, A., Hirsch, E., & Mandel, J. L. (1998). Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiology of Disease*, 5(5), 335–347. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0208>
- Vidoni, C., Castiglioni, A., Seca, C., Secomandi, E., Melone, M. A. B., & Isidoro, C. (2016). Dopamine exacerbates mutant Huntingtin toxicity via oxidative-mediated inhibition of autophagy in SH-SY5Y neuroblastoma cells: Beneficial effects of anti-oxidant therapeutics. *Neurochemistry International*, 101, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.11.003>
- Vonsattel, J. P., & DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(5), 369–384. <https://doi.org/10.1097/00005072-199805000-00001>
- Vonsattel, J. P. G., Keller, C., & Cortes Ramirez, E. P. (2011). Chapter 4—Huntington’s disease – neuropathology. W W. J. Weiner & E. Tolosa (Red.), *Handbook of Clinical Neurology* (T. 100, s. 83–100). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52014-2.00004-5>
- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H., & Wanker, E. E. (2001). Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Molecular Biology of the Cell*, 12(5), 1393–1407. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1393>
- Warby, S. C., Montpetit, A., Hayden, A. R., Carroll, J. B., Butland, S. L., Visscher, H., Collins, J. A., Semaka, A., Hudson, T. J., & Hayden, M. R. (2009). CAG Expansion in the Huntington Disease Gene Is Associated with a Specific and Targetable Predisposing Haplogroup. *American Journal of Human Genetics*, 84(3), 351–366. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.02.003>
- Warrick, J. M., Morabito, L. M., Bilen, J., Gordesky-Gold, B., Faust, L. Z., Paulson, H. L., & Bonini, N. M. (2005). Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in Drosophila by a ubiquitin-associated mechanism. *Molecular Cell*, 18(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.030>
- Weeks, R. A., Piccini, P., Harding, A. E., & Brooks, D. J. (1996). Striatal D1 and D2 dopamine receptor loss in asymptomatic mutation carriers of Huntington’s disease. *Annals of Neurology*, 40(1), 49–54. <https://doi.org/10.1002/ana.410400110>
- Witzig, V. S., Komnig, D., & Falkenburger, B. H. (2020). Changes in Striatal Medium Spiny Neuron Morphology Resulting from Dopamine Depletion Are Reversible. *Cells*, 9(11), 2441. <https://doi.org/10.3390/cells9112441>
- Wu, L. L., & Zhou, X.-F. (2009). Huntingtin associated protein 1 and its functions. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1), 71–76. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675152/>

- Yohrling, G. J., Jiang, G. C.-T., DeJohn, M. M., Miller, D. W., Young, A. B., Vrana, K. E., & Cha, J.-H. J. (2003). Analysis of cellular, transgenic and human models of Huntington's disease reveals tyrosine hydroxylase alterations and substantia nigra neuropathology. *Molecular Brain Research, 119*(1), 28–36.
<https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.08.009>
- Yoshizawa, T., Watanabe, M., Frusho, K., & Shoji, S. (2003). Magnetic resonance imaging demonstrates differential atrophy of pontine base and tegmentum in Machado-Joseph disease. *Journal of the Neurological Sciences, 215*(1–2), 45–50.
[https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(03\)00185-0](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(03)00185-0)
- Zamecnik, P. C., & Stephenson, M. L. (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), 280–284.
<https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.280>
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell, 101*(1), 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)
- Zeng, C., Zhao, C., Ge, F., Li, Y., Cao, J., Ying, M., Lu, J., He, Q., Yang, B., Dai, X., & Zhu, H. (2020). Machado-Joseph Deubiquitinases: From Cellular Functions to Potential Therapy Targets. *Frontiers in Pharmacology, 11*.
<https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2020.01311>
- Zhang, H. S., Kim, E., Lee, S., Ahn, I.-S., & Jang, J.-H. (2012). Transduction of striatum and cortex tissues by adeno-associated viral vectors produced by herpes simplex virus- and baculovirus-based methods. *Journal of Virological Methods, 179*(1), 276–280.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.10.004>
- Zoghbi, H. Y., & Orr, H. T. (1999). Polyglutamine diseases: Protein cleavage and aggregation. *Current Opinion in Neurobiology, 9*(5), 566–570. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)00013-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)00013-6)

11. Spis skrótów

3HK - 3-hydroksykinureniny

AAV - wektory wirusowych związanych z adenowirusami

ABE – edytory zasad adeninowych

ATXN3 - białko ataksyny-3

BBB - bariera krew-mózg

CAA - cytozyna – adenina – adenina

CAG - cytozyna – adenina – guanina

CBE – edytory zasad cytozynowych

DCN - jądra głębokie mózdzku

DOPEC - kwas 3,4-dihydrofenylooctowy

DRPLA - zanik czerwienno-zębaty i rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni

EAAT1 - astrocytowy transporter glutaminianu

EF3 - współczynnik wydłużania 3

GABA - organiczny związek chemiczny z grupy aminokwasów

GLT1 - transporter glutaminianu 1

H2O2 - nadtlenek wodoru

HAP1 - białko związane z huntingtyną 1

HD - choroba Huntingtona

HEAT - Huntingtyna, Współczynnik wydłużania 3

ICV - iniekcje do komór mózgowych

iPSCs - komórki indukowane pluripotencjalne

miRNA - mikro RNA

MSN - średnie neurony kolczaste

MT- mikrotubule

NES - sygnał eksportu jądrowego

NLS - sygnał lokalizacji jądrowej

NMDA - receptor N-metylo-D-asparaginowy

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

poliQ - choroba poliglutaminowa

PP2A - fosfataza białkowa 2A

QA - kwas chinolinowy

ROS - reaktywne formy tlenu

SBMA - choroba Kennedy'ego

SCA - ataksje rdzeniowo-mózdkowe

SCA3/MJD - ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3/choroba Machado-Josepha

shRNA - krótkie RNA o strukturze pętli

siRNA - małe interferujące RNA

TOR1- kinaza drożdżowa

UIM1 – motywów interakcji z ubikwityną

UPS - system ubikwityna – proteasom

12. Załączniki

Tabela 18. Miejsca poza celem terapeutycznym (ang. *off-targets*) u człowieka (łac. *Homo Sapiens*) i myszy (łac. *Mus Musculus*)

Reagent	Nazwa genu	Opis	Długość (nt)	Ekspresja mózgu	Ekspresja innych tkanek	Wyniki bitowy
<i>Off-targets Homo Sapiens</i> zakres od 21nt do 18nt; granica: 17 i mniej						
A4(P10A)	ELN	Elastyna	19	niska	szeroka & średnia	32,210
	KMT2D	Metylotransfera za lizyny 2D	19	niska	szeroka & niska	32,210
	LINC01209	Długi międzygenowy niebiałkowy RNA 1209	19	b.d.	b.d.	32,210
	MLLT6	MLLT6, palec zawierający PHD	19	wysoka	szeroka & wysoka	32,210
	WDR97	Domena powtórzeń WD 97	19	bardzo niska	bardzo niska	32,210
	BCAR1	BCAR1 białko rusztowania, członek rodziny Cas	18	niska	szeroka & średnia	30,228
	CHD8	Helikaza chromodomainowa białko wiążące DNA 8	18	średnia	szeroka & średnia	30,228
	RIMBP2	Białko wiążące RIMS 2	18	średnia	niska	30,228
A4(P10,11A)	PPP2R5E	Podjednostka regulatorowa B'epsilon fosfatazy białkowej 2	17*	średnia	szeroka & średnia	34,192
A4	ELN	Elastyna	20	niska	szeroka & średnia	40,14
	KMT2D	Metylotransfera za lizyny 2D	20	niska	szeroka & niska	40,14
	MLLT6	MLLT6, palec zawierający PHD	20	wysoka	szeroka & wysoka	40,14
	CCDC177	Domena zwojowa	20	very low	very low	34,192

		zawierająca 177				
	ISL2	ISL LIM homeobox 2	20	bardzo niska	niska	34,192 9=
	MINK1	Kinaza 1 podobna do misshapen	20	bardzo wysoka	szeroka & wysoka	34,192
	MYT1	Czynnik transkrypcji mieliny 1	20	niska	niska	34,192
	PEG3	Ekspresja ojcowska 3	20	wysoka	wysoka	34,192
	PIP4P2	4-fosfataza fosfatydiloinoz ytolo-4,5- bisfosforanu 2	20	średnia	szeroka & średnia	34,192
	RIMBP3	Białko wiążące RIMS 3	20	b.d.	b.d.	34,192
	SLC16A2	Nośnik substancji rozpuszczonych rodzina 16 członek 2	20	średnia	szeroka & średnia	34,192
	TFAP4	Czynnik transkrypcyjny AP-4	20	bardzo niska	szeroka & niska	34,192
	TRERF1	Transkrypcyjny czynnik regulujący 1	20	bardzo niska	szeroka & niska	34,192
	KMT2D	Metylotransfera za lizyny 2D	19	niska	szeroka & niska	30,228
A2	CCDC177	Domena zwojowa zawierająca 177	21	bardzo niska	bardzo niska	42,122
	MINK1	Kinaza 1 podobna do misshapen	21	bardzo wysoka	szeroka & wysoka	42,122
	MYT1	Czynnik transkrypcyjny mieliny 1	21	niska	niska	42,122
	PEG3	Ojcowska ekspresja 3	21	wysoka	wysoka	42,122
	SLC16A2	Nośnik substancji rozpuszczonych rodzina 16 członek 2	21	średnia	szeroka & średnia	42,122
	BRD4	Bromodomena zawierająca 4	20	średnia	szeroka & średnia	40,14
	BSN	Presynaptyczne białko cytomatrix fagotu	20	wysoka	bardzo niska	40,14

	SOGA3	Członek rodziny SOGA 3	20	średnia	niska	40,14
	TOX3	Członek rodziny skrzynek grupowych o dużej mobilności TOX 3	20	niska	szeroka	40,14
	SLFNL1	Schlafen jak 1	19	bardzo niska	bardzo niska	38,157
A2(P10,1 1A)	ADD3-AS1	ADD3 antysensowny RNA 1	20	niska	szeroka & niska	34,192
	CIZ1	CDKN1A oddziałujące białko palca cynkowego 1	20	wysoka	szeroka & wysoka	34,192
	TOX3	TOX członek rodziny o wysokiej mobilności 3	19	niska	szeroka	26,263
AG4	CCDC177	Domena zwojowa zawierająca 177	20	bardzo niska	bardzo niska	34,192
	MINK1	Misshapen jak kinaza 1	20	bardzo wysoka	szeroka & wysoka	34,192
	MYT1	Czynnik transkrypcyjny mieliny 1	20	niska	niska	34,192
	PEG3	Ekspresja ojcowska 3	20	wysoka	wysoka	34,192
	RIMBP3	RIMS binding protein 3	20	b.d.	b.d.	34,192
	SLC16A2	Członek rodziny nośników substancji rozpuszczonych 16 2	20	średnia	szeroka & średnia	34,192
	TNRC6A	Powtórzenie trinukleotydowe zawierające adaptor 6A	20	średnia	szeroka & średnia	34,192
	CCAR1	Regulator cyklu podziału komórki i apoptozy 1	18	średnia	szeroka & średnia	36,175 3
AA4	ACSS1	Członek rodziny krótkołańcuchowych syntetaz acylo-CoA 1.	18	wysoka	szeroka & wysoka	24,281

A15	PPARD	Receptor delta aktywowany proliferatorami peroksysomów	15	średnia	szeroka & średnia	30,228
Off-targets Mus Musculus zakres między 21nt a 18nt; odcięcie: 17 i mniej						
A4(P10A)	-	-	-	-	-	-
A4(P10,11A)	-	-	-	-	-	-
A4	STC1	Stanniokalcyna 1	21	bardzo niska	średnia	42,1223
	A230006K03Rik	RIKEN cDNA A230006K03	20	-	-	40,14
	PUM1	Pumilio członek rodziny wiążącej RNA 1	20	wysoka	szeroka & wysoka	40,14
	D6Erd527e	-	20	-	-	34,1929
	MAD1L1	Niedobór zatrzymania mitotycznego 1 jak 1	20	niska	szeroka & niska	34,1929
	TBL1X	Transducyna beta podobna do 1 sprzężona z chromosomem X	20	niska	szeroka & średnia	34,1929
	Zfp853	Białko palca cynkowego 853	20	niska	szeroka & niska	34,1929
	BSN	Białko presynaptyczne j cytomatrycy fagota	18	wysoka	bardzo niska	36,1753
	Zfp804a	Białko palca cynkowego 804A	18	niska	b.d.	36,1753
A2	CCDC177	Domena zwiniętej cewki zawierająca 177	21	bardzo niska	bardzo niska	42,1223
	MAML1	Koaktywator transkrypcyjny mastermind 1	21	niska	szeroka & średnia	42,1223
	PPP1R3F	Podjednostka regulatorowa fosfatazy białkowej 1 3F	21	niska	bardzo niska	42,1223
	GOLGA4	Golgin A4	20	średnia	szeroka & średnia	40,14

	SOGA3	Członek rodziny SOGA 3	20	średnia	niska	40,14
	TH	Hydroksylaza tyrozynowa	20	b.d.	b.d.	40,14
	MINK1	Misshapen jak kinaza 1	20	bardzo wysoka	szeroka & wysoka	38,1576
A2(P10,11A)	-	-	-	-	-	-
AG4	CCDC177	Zawierająca domenę zwiniętej cewki 177	20	bardzo niska	bardzo niska	34,1929
	LRCH3	Powtórzenia bogate w leucynę i domena homologii kalponiny zawierająca 3	20	niska	szeroka & niska	34,1929
	MAML1	mastermind like transcriptional coactivator 1	20	średnia	szeroka & średnia	34,1929
	PPP1R3F	Mastermind jak koaktywator transkrypcyjny 1	20	niska	bardzo niska	34,1929
	STC1	Stanniokalcyna 1	20	bardzo niska	szeroka & niska	34,1929
	A230006K03Rik	RIKEN cDNA A230006K03	19	-	-	32,2105
	GOLGA4	Golgin A4	19	średnia	szeroka & średnia	32,2105
	ZFHX3	Palec cynkowy homeobox 3	19	niska	szeroka & niska	26,2635
AA4	KMT2D	Metylotransfera za lizyny 2D	19	niska	szeroka & niska	26,2635
	LOC115489118	-	19	-	-	26,2635
A15	LOC105245978	-	17	-	-	28,245

Dane opracowane na podstawie publikacji: „CAG-targeted brain-permeable therapy tested in biallelic humanized polyQ mouse models” (w trakcie publikacji)

13. Spis tabel i rysunków

Rysunek 1 Schemat szlaku wirusowego shRNA i biwalentego siRNA.	27
Rysunek 2. Schemat konstruktów genetycznych.....	36
Rysunek 3. Schemat konstruktów genetycznych A4(P10A) i AG4	37
Rysunek 4. Schemat eksperymentów krótkoterminowych. Iniekcje reagentami AAV- PHP.eB_eGFP_shRNA mysiego modelu HD na okres 3 tygodni oraz kierunki badań. 61	
Rysunek 5. Ocena dystrybucji wektora AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA w mózgu mysiego modelu HD 3 tygodnie po iniekcji.	62
Rysunek 6. Ocena skuteczności obniżania poziomu białka HTT 3 tygodnie po iniekcji retro-orbitalnej 8 reagentów AAV-PHP.eB_eGFP_shRNA.....	65
Rysunek 7. Schemat eksperymentów długoterminowych.	66
Rysunek 8. Ocena sygnału eGFP w strukturach mózgu Hu ^{128Q/21Q} i Ki ^{150Q/21Q} 15 tygodni po wstrzyknięciu.	67
Rysunek 9. Względny poziom mRNA genu HTT w różnych regionach mózgu modelu myszy HD po 15 tygodniach od iniekcji reagentami A4(P10A) i A4(P10,11A).	68
Rysunek 10. Zmiana poziomu białka HTT we wzgórzu, mózdzku, pniu mózgu, korze mózgowej, prążkowie i hipokampie myszy Hu ^{128Q/21Q} , którym wstrzyknięto AAV- PHP.eB z ekspresją A4(P10A) i A4(P10,11A) oraz Scrambled ($1,5 \times 10^{13}$ vg/kg).....	70
Rysunek 11. Wykresy uśrednionych zmian poziomu białka HTT dla dobrze i słabiej wyznakowanych sygnałem eGFP regionów mózgu myszy Hu ^{128Q/21Q} , którym wstrzyknięto AAV-PHP.eB z ekspresją A4(P10A) i A4(P10,11A) oraz Scrambled ($1,5$ $\times 10^{13}$ vg/kg).....	71
Rysunek 12. Agregaty HTT w pniu mózgu, prążkowie, wzgórzu oraz mózdzku wybarwione przeciwciałem anti-HTT EM48.	72
Rysunek 13. Zmiany fenotypowe (ocena zmiany masy ciała, masy poszczególnych narządów oraz punktowa ocena fenotypu po iniekcji A4(P10A) i A4(P10,11A)	74
Rysunek 14. Transdukcja wątroby i ocena parametrów biochemicznych w modelu myszy HD.	76
Rysunek 15. Względny poziom mRNA ATXN3 w różnych regionach mózgu modelu myszy SCA3 po wstrzyknięciu A4(P10A) i A4(P10,11A).	77

Rysunek 16 . Zmiana poziomu białka ATXN3 we wzgórzu, mózdzku, pniu mózgu, korze mózgowej, prążkowi i hipokampie myszy $Ki^{150Q/21Q}$, którym wstrzyknięto AAV-PHP.eB z ekspresją A4(P10A) i A4(P10,11A) oraz Scrambled ($1,5 \times 10^{13}$ vg/kg).....	78
Rysunek 17. Wykresy uśrednionych zmian poziomu białka ATXN3 dla dobrze i słabiej wyznakowanych sygnałem eGFP regionów mózgu myszy $Ki^{150Q/21Q}$, którym wstrzyknięto AAV-PHP.eB z ekspresją A4(P10A) i A4(P10,11A) oraz Scrambled ($1,5 \times 10^{13}$ vg/kg).....	79
Rysunek 18. Agregaty ATXN3 pniu mózgu wybarwione przeciwciałem anty-ATXN3 1H9.	80
Rysunek 19	81
Rysunek 20. Transdukcja wątroby i ocena parametrów biochemicznych w mysim modelu SCA3.....	84
Rysunek 21. Schemat doświadczenia z zastosowaniem siRNA w formacie chemicznym.	85
Rysunek 22. Jakościowa ocena intensywności sygnału czerwonej fluorescencji (Cy3) w mysim mózgu modelu SCA3 2,5 tygodnia od iniekcji reagenta biwalentnego do prążkowie.	86
Rysunek 23. Zmiana poziomu białka HTT w miejscu iniekcji (prążkowie) u myszy, którym wstrzyknięto biv-AG4 i biv-A4(P10A) oraz sól fizjologiczną jako kontrolę (25 μ g/mysz).	87
Rysunek 24. Zmiana poziomu białka ATXN3 w miejscu iniekcji (prążkowie) u myszy, którym wstrzyknięto biv-AG4 i biv-A4(P10A) oraz sól fizjologiczną jako kontrolę (25 μ g/mysz).	88
Rysunek 25. Ocena sygnałów Cy3 w mysim mózgu modelu SCA3 2,5 tygodnia od iniekcji do układu komorowego mózgu (ICV).	89
Rysunek 26. Zmiana poziomu białka ATXN3 w korze mózgowej, mózdzku, prążkowie, wzgórzu i płacie czołowym myszy $Ki^{150Q/21Q}$, którym wstrzyknięto biv-AG4 i biv-A4(P10A) oraz sól fizjologiczną jako kontrolę (200 μ g/mysz/reagent).	90
Tabela 1 Choroby poliQ, ich lokalizacja w genie i białka sprawcze	13
Tabela 2. Nazwy konstruktów wirusowych z shRNA, ich miano oraz dawki zastosowane do iniekcji	35
Tabela 3. Sekwencja konstruktów shRNA celujące w ciąg CAG	36

Tabela 4. Nazwa reagentów, ich stężenie oraz dawki zastosowane do iniekcji	36
Tabela 5. Sekwencje starterów	38
Tabela 6. Odczynniki wykorzystywane w eksperymentach	39
Tabela 7. Odczynniki do sporządzenie buforów wykorzystywane w metodzie western blottingu.....	40
Tabela 8. Odczynnik do sporządzenie buforów wykorzystywanych w elektroforezie agarozowej.....	41
Tabela 9. Odczynnik do sporządzenie buforu wykorzystywanego w barwieniu immunofluorescencyjnym	42
Tabela 10. Przeciwciała wykorzystywane w eksperymentach	43
Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR Bac21 (na 1 reakcje).....	49
Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR Triplex (na 1 reakcje)	50
Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR ATXN3 (na 1 reakcje).....	51
Tabela 14. Koordynaty do iniekcji lokalnych.....	53
Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej syntezy cDNA (na 1 reakcje).....	56
Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR (na 1 reakcje)	56
Tabela 17. Wynik drżenia u myszy Hu ^{128Q/21Q} po 3 tygodniach od iniekcji 9 reagentów shRNA	63
Tabela 18. Miejsca poza celem terapeutycznym (ang. <i>off-targets</i>) u człowieka (łac. <i>Homo Sapiens</i>) i myszy (łac. <i>Mus Musculus</i>).....	120