

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Identyfikacja komórkowych i molekularnych
zaburzeń wczesnego rozwoju mózgu w
chorobie Huntingtona**

mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska

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

Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań 2023

*Serdeczne podziękowania kieruję w stronę mojego Pana Promotora,
dr hab. Macieja Figla, prof. IChB PAN, za cenne wskazówki, wsparcie
i motywację, które były kluczem do realizacji tej pracy.*

*Moje serce pełne jest miłości i wdzięczności dla mojego cudownego
Męża Michała, dla moich ukochanych Rodziców i Rodzeństwa
oraz dla całej mojej Rodziny. Dziękuję Wam za nieustającą
miłość i cierpliwość, wsparcie w dążeniu do celu oraz to,
że zawsze mogę na Was liczyć.*

*Podziękowania kieruję również do całego zespołu z Zakładu
Neurobiologii Molekularnej oraz do wszystkich Kolegów
i Koleżanek z Instytutu Chemii Bioorganicznej
za niesamowicie wspierającą i inspirującą atmosferę,
ożywcze dyskusje przy kawie i budowanie
pozytywnego środowiska.*

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	6
ABSTRACT	9
1. WPROWADZENIE	14
1.1. Choroba Huntingtona (HD)	14
1.1.1. Epidemiologia	14
1.1.2. Młodzieńcza postać choroby Huntingtona (JOHD).....	15
1.1.3. Patogeneza molekularna i zmiany makroskopowe w mózgu HD	16
1.2. Choroba Huntingtona, a wczesny rozwój mózgu	18
1.2.1. Neurogeneza embrionalna człowieka	18
1.2.2. Komunikacja pomiędzy rozwijającą się korą mózgową, a prążkowiec.....	20
1.2.3. Układ komorowy mózgu i jego znaczenie w HD i w innych chorobach neurologicznych.....	22
1.2.3.1. Transtyretyna (TTR) i jej rola w neurodegeneracji	23
1.2.4. Neurorozwojowe fenotypy HD.....	24
1.3. Ludzkie modele badawcze HD.....	26
1.3.1. Komórki macierzyste oraz hodowle neuronalne 2D.....	26
1.3.2. Organoidy mózgowe.....	27
1.4. Inne choroby poliglutaminowe i ich komponenty neurorozwojowe	29
2. CEL PRACY.....	31
3. WYNIKI.....	32
3.1. Neurorozwojowe aspekty HD i innych chorób poliglutaminowych na podstawie badań molekularnych komórek HD iPSC i szeregu analiz bioinformatycznych (<i>streszczenie wyników opublikowanych</i>).....	33
3.1.1. Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC with 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling	36
3.1.2. Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data.....	40
3.2. Fuzyjne organoidy mózgowe odzwierciedlające populacje komórkowe rozwijającego się przodomózgowia, prezentują wczesne zaburzenia neurorozwojowe młodzieńczej postaci HD (<i>szczegółowy opis wyników nieopublikowanych</i>).....	45
3.2.1. Wyniki	46
3.2.1.1. Wygenerowanie 60-dniowych organoidów mózgowych z ludzkich linii komórek iPSC.....	46
3.2.1.2. Rosnące, fuzyjne organoidy mózgowie JOHD osiągają większe rozmiary od organoidów kontrolnych	49

3.2.1.3.	Mózgowe organoidy <i>dorsal</i> , <i>ventral</i> oraz fuzyjne, wykazują ekspresję markerów charakterystycznych dla wczesnego rozwoju przedomóżgowia.....	51
3.2.1.4.	Markery specyficznych populacji komórkowych mózgu wykazują zmienioną ekspresję w 60-dniowych fuzyjnych organoidach mózgowych JOHD w porównaniu do organoidów kontrolnych.....	55
3.2.1.5.	Wygenerowanie 60-dniowych organoidów mozaikowych, powstałych przez fuzję organoidów JOHD z organoidami kontrolnymi.....	59
3.2.1.6.	Fuzyjne organoidy JOHD charakteryzują się większą ilością rozet neuronalnych w porównaniu do organoidów kontrolnych oraz organoidów mozaikowych.....	60
3.2.1.7.	Fuzyjne organoidy 71Q wykazują zwiększoną ilość białka TTR w porównaniu do organoidów kontrolnych 21Q oraz organoidów mozaikowych.....	62
3.2.1.8.	Podwyższony poziom białka TTR w osoczu myszy YAC ^{128Q} wskazuje na istotną funkcję tego białka w patogenezie JOHD i jego potencjalną rolę jako biomarkera JOHD.....	63
3.2.2.	Materiały.....	65
3.2.2.1.	Ludzkie linie komórek iPSC.....	65
3.2.2.2.	Myszy HD.....	65
3.2.2.3.	Oligonukleotydy.....	65
3.2.2.4.	Bufory, pożywki i roztwory barwiące.....	66
3.2.2.5.	Przeciwciała.....	70
3.2.2.6.	Żele poliakrylamidowe (PAA).....	71
3.2.2.7.	Wzorce wielkości.....	71
3.2.2.8.	Ważniejsze odczynniki wykorzystywane do badań.....	71
3.2.2.9.	Komercyjnie dostępne zestawy (kity) wykorzystywane w badaniach.....	72
3.2.3.	Metody.....	72
3.2.3.1.	Hodowla indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC).....	72
3.2.3.2.	Hodowla neurosfer.....	73
3.2.3.3.	Hodowla organoidów mózgowych 3D.....	73
3.2.3.4.	Analiza Western Blot.....	74
3.2.3.5.	Przygotowywanie skrawków organoidów mózgowych oraz barwienie immunofluorescencyjne.....	75
3.2.3.6.	Reakcja odwrotnej transkrypcji oraz PCR w czasie rzeczywistym.....	76
3.2.3.7.	Pomiar pola powierzchni 60-dniowych fuzyjnych organoidów mózgowych.....	76
4.	PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY.....	77
5.	BIBLIOGRAFIA.....	79
6.	ZAŁĄCZNIKI.....	92

Wykaz artykułów zawartych w rozprawie doktorskiej:

1. **Świtońska K**, Szlachcic WJ, Handschuh L, Wojciechowski P, Marczak Ł, Stelmaszczuk M, Figlerowicz M, Figiel M. Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 528.
2. **Świtońska-Kurkowska K**, Krist B, Delimata J, Figiel M. Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data. *Front. Cell. Dev. Biol.* 9, 642773.

Niniejsza rozprawa doktorska zawiera również szczegółowy opis wyników jeszcze nieopublikowanych, zatytułowanych: „Fuzyjne organoidy mózgowe odzwierciedlające populacje komórkowe rozwijającego się przodomózgowia, prezentują wczesne zaburzenia neurorozwojowe młodzieńczej postaci HD”. Wyniki te są kontynuacją badań zawartych w powyższych publikacjach naukowych.

Artykuły nie wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Pekec T, Lewandowski J, Komur AA, Sobańska D, Guo Y, **Świtońska-Kurkowska K**, Małecki JM, Dubey AA, Pokrzywa W, Frankowski M, Figiel M, Ciosk R. Ferritin-mediated iron detoxification promotes hypothermia survival in *Caenorhabditis elegans* and murine neurons. *Nat. Comm.* 13, 4883.

STRESZCZENIE

Choroby neurodegeneracyjne są następstwem dysfunkcji różnych populacji neuronów i połączeń nerwowych w mózgu, prowadzącej do postępujących zaburzeń ruchowych i poznawczych. Wieloletnia progresja, zmiany wielkości mózgu oraz zaburzone uczenie u dzieci objętych ryzykiem choroby sugeruje, że patogenezą molekularną może być inicjowana nawet na etapie rozwoju embrionalnego. Dobrym modelem do badania neurorozwojowych aspektów patogenezы chorób neurodegeneracyjnych są choroby poliglutaminowe (polyQ). Ich zdefiniowana etiologia polega na ekspansji powtórzeń CAG w określonych genach i produkcji toksycznych białek zawierających nadmiernie wydłużony ciąg poliglutamin. Jednym z takich schorzeń jest choroba Huntingtona (HD), spowodowana mutacją w 1. egzonie genu *HTT*. Szczególną formą HD jest jej młodzieńcza postać (JOHD), charakteryzująca się bardzo długimi ciągami powtórzeń CAG w genie *HTT*. Liczba 60 powtórzeń CAG w genie *HTT* może wskazywać na występowanie zmian neurorozwojowych w HD.

Nadrzędnym celem prowadzonych przeze mnie badań w ramach pracy doktorskiej, była identyfikacja molekularnych i komórkowych zaburzeń rozwoju mózgu w JOHD. Aby zrealizować główny cel mojej pracy, sformułowałam cele szczegółowe. Pierwszym z nich była identyfikacja zaburzonych procesów neurorozwojowych w komórkach JOHD jeszcze przed etapem rozwoju, na poziomie linii komórek macierzystych iPSC. Cel ten realizowałam z udziałem metod wysokoprzepustowych oraz analiz bioinformatycznych. W kolejnym ważnym punkcie mojej pracy, zgromadziłam szereg dostępnych literaturowo danych eksperymentalnych uzyskanych w badaniach wysokoprzepustowych komórek HD i innych chorób polyQ. Wykorzystując te dane, wykonałam liczne analizy *in silico* identyfikujące potencjalne (neuro)rozwojowe procesy molekularne zaburzone w HD, zarówno na wielu etapach rozwoju jak i w dorosłym mózgu. Wykonane przeze mnie analizy *in silico* miały również na celu identyfikację wspólnego mianownika neurorozwojowego chorób polyQ. Kolejny etap moich badań obejmował wykorzystanie analizowanych wcześniej linii iPSC do wygenerowania fuzyjnych organoidów mózgowych, które odzwierciedlały wczesny etap rozwoju mózgu. Ostatnim celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie czy wybrane zaburzenia zidentyfikowane w fuzyjnych organoidach

mózgowych HD można zaobserwować w materiale biologicznym pochodzącym z mysiego modelu HD (Hu^{128Q/21Q}).

Moje analizy wyników RNA-seq komórek HD iPSC 71Q i 109Q wykazały, że zmienione poziomy białek i ekspresji wybranych genów w tych komórkach wpływają potencjalnie na neuropatologię HD. Zidentyfikowałam geny związane z odpowiedzią na uszkodzenia DNA, uczestniczące w ścieżce sygnałowej p53, regulujące nabywanie polarności przez komórki oraz regulujące kaskadę sygnałową TGFβ. Co istotne, w liniach 71Q, zidentyfikowałam szereg genów, o zmienionej ekspresji, kodujących czynniki transkrypcyjne i białka histonowe, których podwyższona ekspresja może prowadzić do przyspieszenia rozwoju zarodka i wcześniejszego rozwoju układu nerwowego. W liniach 109Q, wykryłam obniżoną ekspresję genów związanych z apoptozą, które są bezpośrednimi interaktorami TP53 w komórce. Może to sugerować, że mHTT wchodzi w interakcje z białkiem TP53 i zaburza ekspresję i poziom wielu innych genów i białek apoptotycznych. Prowadzi to do nadmiernej ilości progenitorów i potencjalnie zaburza różnicowanie do dojrzałych neuronów. W badaniu proteomicznym potwierdziłam zmieniony poziom białek TP53 oraz ZFP30 (Świtońska et al., 2019). Wcześniejsze badania naszej grupy potwierdziły obniżenie poziomu białka TP53 w komórkach 109Q iPSC (Szlachcic et al., 2015, 2017). Opisane deregulacje świadczą o tym, że dysfunkcje obserwowane u osób dorosłych z HD mogą być wynikiem wczesnych i skumulowanych nieprawidłowości rozwoju embrionalnego.

Wyniki późniejszych porównawczych analiz bioinformatycznych, podkreśliły stałe zaburzenie procesów (neuro)rozwojowych w komórkach JOHD, takich jak wieloetapowa morfogeneza zarodka, wzrost i wydłużanie neuronów oraz transmisja synaptyczna. Moje analizy wyodrębniły zmiany w genach zaangażowanych w procesy tworzenia neuronów, synaptogenezę oraz tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej, w modelach mysich niektórych chorób polyQ. Wskazuje to na neurorozwojowe podobieństwa tej grupy schorzeń (Świtońska-Kurkowska et al., 2021).

Kolejny etap embrionalnego rozwoju mózgu HD badałam na poziomie wczesnych komórek nerwowych. Utworzyłam organoidy kory mózgowej (tzw. *dorsal*) i prądkowia (tzw. *ventral*) i połączyłam je w organoidy fuzyjne, zawierające populacje komórkowe dwóch obszarów mózgu, najważniejszych w neuropatologii HD. Organoidy fuzyjne były znacząco większe od pojedynczych organoidów *dorsal* i *ventral*, co mogło świadczyć o wzajemnych i ważnych

interakcjach tych dwóch obszarów mózgu i pozwoliło na badanie populacji komórkowych dotychczas nieobserwowanych w klasycznych systemach organoidowych. Podobnie jak w czasie neurogenezy, organoidy fuzyjne zawierały markery neuronalnych komórek macierzystych oraz dojrzałych neuronów. Wykryłam również zmiany w poziomach mRNA markerów wybranych subpopulacji progenitorów, neuronów hamujących i pobudzających oraz komórek glejowych. Najbardziej deregulowanym genem, o podwyższonej ekspresji we wszystkich organoidach JOHD był gen *TTR*, marker splotu naczyniówkowego odpowiedzialnego za produkcję płynu mózgowo-rdzeniowego w mózgu. W kontekście neuropatogenezy HD był to wynik szczególnie ważny, ponieważ komory mózgu są obszarem istotnie powiększonym u osób chorych. We wcześniejszych badaniach, białko TTR zostało zidentyfikowane w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów objawowych, jak i u osób presymptomatycznych HD. W moich badaniach, podwyższony poziom białka TTR potwierdziłam zarówno w organoidach JOHD, jak i w osoczu krwi myszy YAC^{128Q}. Dlatego, uzyskane przeze mnie wyniki, świadczą o tym, że zarówno podwyższona ekspresja mRNA genu *TTR* w organoidach jak i zwiększony poziom białka TTR mogą być biomarkerami JOHD. Ponadto, wygenerowałam tzw. organoidy mozaikowe, powstałe na drodze fuzji organoidów *dorsal* lub *ventral* JOHD 71Q z organoidami *dorsal* lub *ventral* 21Q. Zidentyfikowałam zmniejszony poziom białka TTR w organoidach mozaikowych w porównaniu do organoidów JOHD 71Q. Świadczy to o tym, że model ten może potencjalnie służyć do badań wpływu zwiększonej ilości niezmutowanego białka HTT w określonych regionach rozwijającego się przodomózgowia na przebieg neuropatogenezy HD.

Podsumowując, wykryte przeze mnie zmiany w danych RNA-seq wskazują na konkretne procesy (neuro)rozwoju obecne już w komórkach niezróżnicowanych. Opracowałam system organoidowy do obserwacji patogenezy HD. Zidentyfikowałam zmiany molekularne i komórkowe na etapach pluripotencji i rozwoju mózgu HD. Wskazałam na szczególne populacje komórek nerwowych i ich markerów zmienionych w HD oraz zdefiniowałam marker TTR, którego podwyższony poziom zidentyfikowałam zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka. Świadczy to o tym, że może być on markerem występowania i ciężkości HD.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are the consequence of dysfunction of various populations of neurons and neural connections in the brain, leading to progressive motor and mental disorders. Long-term progression, changes in brain size and impaired learning in children at risk of the disease, suggest that molecular pathogenesis can be initiated even at the stage of embryonic development. A good model for studying the neurodevelopmental aspects of the pathogenesis of neurodegenerative diseases are polyglutamine diseases (polyQ). Their defined etiology is the expansion of CAG repeats in specific genes and the production of toxic proteins containing an excessively extended polyglutamine tract. One of these diseases is Huntington's disease (HD), caused by a mutation in the 1st exon of the *HTT* gene. A special form of HD is its juvenile form (JOHD), characterized by very long sequences of CAG repeats in the *HTT* gene. The number of 60 CAG repeats in the *HTT* gene may indicate the presence of neurodevelopmental changes in HD.

The primary goal of my research, as part of my doctoral thesis, was to identify molecular and cellular brain development disorders in JOHD. In order to achieve that, I formulated specific objectives. The first of them was the identification of disturbed neurodevelopmental processes in JOHD cells, even before the stage of differentiation and development, at the level of the iPSC lines. I pursued this goal with the use of high-throughput methods and bioinformatics analyses. In another important point of my work, I collected a number of available experimental data obtained in high-throughput studies of HD cells and other polyQ diseases. Using these data, I performed numerous *in silico* analyzes identifying potential (neuro)developmental molecular processes disrupted in HD, at multiple stages of development, and in the adult brain. In addition, *in silico* analyses aimed to identify the common neurodevelopmental components of polyQ diseases. The next stage of my research involved the use of previously analyzed iPSC lines to generate fused brain organoids that reflected the early stage of brain development. The final goal of my PhD thesis, was to investigate whether selected disorders identified in fused brain organoids of HD can be observed in the biological material obtained from HD mouse model (Hu^{128Q/21Q}).

My analyzes of the RNA-seq results of the HD iPSC 71Q and 109Q cells showed that the altered genes and proteins in these cells potentially contribute to HD neuropathology. I identified genes related to the DNA damage response,

involved in the p53 signaling pathway, regulating the acquisition of polarity by cells and regulating the TGF β signaling cascade. Importantly, in the 71Q lines, I identified a number of genes encoding transcription factors and histones, the increased expression of which may lead to accelerated embryo development and earlier development of the nervous system. In the 109Q lines, I detected reduced expression of apoptosis-related genes that are direct interactors of TP53 in the cell. This may suggest that mHTT interacts with the TP53 protein and disrupts the expression and level of many other genes and apoptotic proteins. This leads to an excess of progenitors and potentially impairs differentiation into mature neurons. In the proteomics study, I confirmed the altered level of TP53 and ZFP30 proteins (Świtońska et al., 2019). Earlier studies of our group confirmed a decrease in the level of TP53 protein in 109Q iPSC cells (Szlachcic et al., 2015, 2017). The described deregulations indicate that the dysfunctions observed in adults with HD may be the result of early and cumulative abnormalities of embryonic development.

The results of subsequent comparative bioinformatics analyze highlighted the constant disruption of (neuro)developmental processes in JOHD cells, such as multi-stage embryo morphogenesis, neuronal growth and elongation, and synaptic transmission. My analyses have identified changes in genes involved in neuron formation, synaptogenesis and extracellular matrix formation in mouse models of some polyQ diseases. This indicates the neurodevelopmental similarities of this group of diseases (Świtońska-Kurkowska et al., 2021).

I examined the next embryonic stage of HD brain development at the level of early nerve cells. I created organoids of the cerebral cortex (*dorsal*) and striatum (*ventral*) and combined them into fused organoids containing the cell populations of the two brain regions most important in the neuropathology of HD. The fused organoids were significantly larger than the single *dorsal* and *ventral* organoids, suggesting important interactions between the two brain regions, and allowing the study of cell populations previously unobserved in classical organoid systems. As in neurogenesis, the fused organoids contained markers for neural stem cells and mature neurons. I also detected changes in mRNA levels of markers of selected subpopulations of progenitors, inhibitory and excitatory neurons, and glial cells. The most interesting of the deregulated genes, with increased expression in all JOHD organoids, was *TTR*, a marker of the choroid plexus in the brain responsible for the production of cerebrospinal

fluid. In the context of the neuropathogenesis of HD, this result was particularly important, because the ventricles of the brain are an area significantly enlarged in patients. Previously, the TTR protein had been identified in the cerebrospinal fluid of both symptomatic and presymptomatic HD patients. In my studies, increased levels of TTR protein were confirmed both in JOHD organoids and in the plasma of YAC^{128Q} mice. Therefore, my results indicate that both increased TTR gene mRNA expression in organoids and increased TTR protein levels may be biomarkers of JOHD. Moreover, I generated the so-called mosaic organoids, created by fusion of JOHD 71Q *dorsal* or *ventral* organoids with control 21Q *dorsal* or *ventral* organoids. I identified reduced levels of TTR protein in mosaic organoids compared to JOHD 71Q organoids. This indicates that this model can potentially be used to study the impact of increased amounts of non-mutated HTT protein in specific regions of the developing forebrain on the course of HD neuropathogenesis.

In summary, the changes I detected in the RNA-seq data point to specific (neuro)developmental processes already present in undifferentiated cells. I developed an organoid system to observe the early pathogenesis of HD. I identified molecular and cellular changes in the stages of pluripotency and HD brain development. I identified specific populations of nerve cells and their markers altered in HD. Among them, I defined the increased levels of TTR mRNA and protein as markers of the occurrence and severity of HD.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Skrót	Określenie
AD	(ang. <i>Alzheimer's disease</i>) choroba Alzheimera
AOHD	(ang. <i>adult-onset Huntington's disease</i>) postać dorosła choroby Huntingtona
ASD	(ang. <i>autism spectrum disorder</i>) zaburzenia ze spektrum autyzmu
BCSFB	(ang. <i>blood-cerebrospinal fluid barrier</i>) bariera krew-płyn mózgowo-rdzeniowy
bFGF	(ang. <i>basic fibroblast growth factor</i>) podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów
cDNA	(ang. <i>complementary DNA</i>) komplementarny DNA
CGE	(ang. <i>caudal ganglionic eminence</i>) doogonowe wyniosłości zwojowe
ChP	(ang. <i>choroid plexus</i>) spłot naczyńkowy
CPN	(ang. <i>cortical pyramidal neurons</i>) neurony piramidowe kory mózgowej
CSF	(ang. <i>cerebrospinal fluid</i>) płyn mózgowo-rdzeniowy
cycA	(ang. <i>cyclopamine A</i>) inhibitor ścieżki sygnałowej SHH
DA	(ang. <i>dopamine</i>) dopamina
DE	(ang. <i>differential expression</i>) różnicowa ekspresja
DRPLA	(ang. <i>dentatorubral-pallidoluysian atrophy</i>) zanik zębowo-pallidoluzijski
EGF	(ang. <i>epidermal growth factor</i>) naskórkowy czynnik wzrostu
ESC	(ang. <i>embryonic stem cells</i>) embrionalne komórki macierzyste
FAP	(ang. <i>familial amyloid polyneuropathy</i>) rodzinna polineuropatia amyloidowa
GABA	(ang. <i>gamma-aminobutyric acid</i>) kwas gamma-aminomasłowy
GE	(ang. <i>ganglionic eminences</i>) wyniosłości zwojowe
HD	(ang. <i>Huntington's disease</i>) choroba Huntingtona
HTT/ <i>HTT</i>	(ang. <i>huntingtin</i>) huntingtyna
iPSC	(ang. <i>induced-pluripotent stem cells</i>) indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
IWP2	(ang. <i>Wnt/beta-catenin inhibitor</i>) inhibitor ścieżki sygnałowej Wnt

JOHD	(ang. <i>juvenile-onset Huntington's disease</i>) postać młodzieńcza choroby Huntingtona
LGE	(ang. <i>lateral ganglionic eminence</i>) boczne wyniosłości zwojowe
MGE	(ang. <i>medial ganglionic eminence</i>) przyśrodkowe wyniosłości zwojowe
mHTT/ <i>mHtt</i>	(ang. <i>mutant huntingtin</i>) zmutowana huntingtyna
MRI	(ang. <i>Magnetic Resonance Imaging</i>) rezonans magnetyczny
mRNA	(ang. <i>messenger RNA</i>) matrycowy RNA
MS	(ang. <i>mass spectrometry</i>) spektrometria mas
MSN	(ang. <i>medium spiny neurons</i>) średnie neurony kolczaste
NEC	(ang. <i>neuroepithelial cells</i>) komórki nabłonka nerwowego (komórki neuroepitalialne)
NPC	(ang. <i>neural precursor cells</i>) neuronalne komórki prekursorowe
NSC	(ang. <i>neural stem cells</i>) neuronalne komórki macierzyste
PD	(ang. <i>Parkinson's disease</i>) choroba Parkinsona
qPCR	(ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>) ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy
RGC	(ang. <i>radial glial cells</i>) promieniste komórki glejowe
RNA	(ang. <i>ribonucleic acid</i>) kwas rybonukleinowy
RNA-seq	(ang. <i>RNA sequencing</i>) sekwencjonowanie RNA
SAG	(ang. <i>smoothed agonist</i>) aktywator ścieżki sygnałowej SHH
SBMA	(ang. <i>spino-bulbar muscular atrophy</i>) rdzeniowy zanik mięśni opuszkowych
SCA	(ang. <i>spinocerebellar ataxia</i>) ataksja rdzeniowo-mózdkowa
scRNA-seq	(ang. <i>single-cell RNA sequencing</i>) sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek
SVZ	(ang. <i>subventricular zone</i>) strefa podkomorowa
TTR	(ang. <i>transthyretin</i>) transtyretyna
VZ	(ang. <i>ventricular zone</i>) strefa komorowa

1. WPROWADZENIE

1.1. Choroba Huntingtona (HD)

Choroba Huntingtona (HD) jest rzadką, postępującą chorobą neurodegeneracyjną dziedziczną w sposób autosomalny dominujący. Spowodowana jest ekspansją powtórzeń cytozyna-adenina-guanina (CAG) w egzonie 1. genu huntingtyny (*HTT*), skutkującą wydłużeniem się ciągu poliglutaminowego w białku HTT (MacDonald et al., 1993). Jest to choroba nieuleczalna, której objawy charakteryzują się postępującą dysfunkcją ruchową, oraz pogorszeniem funkcji poznawczych i zaburzeniami psychicznymi, które prowadzą do demencji (Palaiogeorgou et al., 2023). Najczęściej, HD przyjmuje postać dorosłą i zaczyna się objawiać klinicznie pomiędzy trzecią a piątą dekadą życia (ang. *adult-onset HD*, AOHD). Jednak pierwsze, subtelne objawy u pacjentów mogą pojawić się lata, a nawet dekady przed postawieniem diagnozy. Objawy HD stopniowo ulegają pogorszeniu w ciągu 10-20 lat, prowadząc do śmierci. HD rozwija się u wszystkich osób, które mają ponad 39 powtórzeń CAG w genie *HTT*, natomiast ryzyko rozwoju choroby istnieje u osób posiadających już 36 takich powtórzeń (Capiluppi et al., 2020).

1.1.1. Epidemiologia

Choroba Huntingtona jest chorobą rzadką, jej częstość występowania to 10-14 przypadków na 100 tysięcy osób w populacjach zachodnich (McColgan and Tabrizi, 2018). Japonia, Tajwan i Hong Kong charakteryzują się znacznie niższą zachorowalnością, sięgającą 1-7 przypadków na milion osób. W Afryce Południowej niższą zachorowalność obserwuje się u osób czarnoskórych. Różnica w częstości występowania HD pomiędzy grupami etnicznymi związana jest z różnicami genetycznymi w samym genie *HTT*. Populacje obarczone wyższą zachorowalnością mają średnio dłuższy ciąg powtórzeń CAG. Przykładowo, Europejczycy mają średnio 18-19 powtórzeń, natomiast u ludzi pochodzenia azjatyckiego ilość powtórzeń CAG to przeważnie 16-17

(Bates et al., 2015). Badania wykazały również, że istnieją zmienności genetyczne w obrębie mutacji w genie *HTT*, wynikające z faktu, że kodon CAA koduje także aminokwas glutaminę (Wright et al., 2020). Badania te potwierdziły, że warianty sekwencji DNA dotyczące zmian w sekwencji kodującej glutaminę, lecz nie wpływającej na długość ciągu poliglutaminowego w białku, związane są z istotnymi zmianami wieku, w którym pojawiają się objawy HD. Jest to ściśle zależne od genów regulatorowych dla szlaków odpowiedzi na uszkodzenia DNA w komórkach HD, bezpośrednio oddziałujących z powtórzeniami CAG-CAA, wpływając tym samym na czas pojawienia się objawów choroby.

Nie ma szczegółowych danych dotyczących zachorowalności na HD w Polsce, natomiast szacuje się, że częstość występowania to około 6 przypadków na 100 tysięcy osób.

1.1.2. Młodzieńcza postać choroby Huntingtona (JOHD)

Objawy HD nasilają się w przypadku bardzo dużej liczby powtórzeń w genie *HTT*. 60 lub więcej powtórzeń CAG (Liu et al., 2023), może skutkować początkiem choroby występującym przed 21. rokiem życia (ok. 5% przypadków HD), co nazywamy młodzieńczym typem HD (ang. *juvenile-onset Huntington's disease*, JOHD) (Lesinskiene et al., 2020; Bakels et al., 2022). Chociaż pacjenci z JOHD mają tę samą podstawową triadę objawów poznawczych, behawioralnych i motorycznych, istnieją jednak unikalne cechy kliniczne, które wyróżniają tę postać choroby. Konkretnie, pacjenci z JOHD mierzą się z mniejszą ilością ruchów płaśawicznych, lecz charakteryzuje ich wyraźna sztywność i bradykinezja (Schultz et al., 2023). Do innych powszechnych symptomów należą ataksja, poważne zaburzenia psychiczne, padaczka, parkinsonizm, demencja, dysfagia i dystonia (Thakor et al., 2021). Napady padaczkowe są główną zauważalną różnicą w obrazie klinicznym między JOHD a AOHD, w której częstość ich występowania jest porównywalna z ryzykiem populacyjnym (Bakels et al., 2022). Ponadto, zaburzenia snu, ból i swędzenie ciała są wyraźnie częściej zauważalne w przypadkach postaci młodzieńczej (Moser et al., 2017). Inne doniesienia literaturowe opisują

częste trudności z mową jako wczesne objawy osób z JOHD, zanim pojawią się problemy motoryczne (Yoon et al., 2006; Sakazume et al., 2009). Zaburzenia behawioralne, takie jak agresja, drażliwość i nadpobudliwość, które są często zgłaszanymi objawami zaburzeń rozwoju mózgu, również odnotowano w przypadku osób z JOHD (Yoon et al., 2006). Postać młodzieńczą HD charakteryzuje również istotnie szybszy postęp choroby, prowadzący do wcześniejszej śmierci (Fusilli et al., 2018). Utratę masy ciała obserwuje się w obu postaciach choroby, jednak jej nasilenie koreluje ze wzrostem długości powtórzeń CAG, a zatem jest to cecha bardziej widoczna u pacjentów z JOHD (Tereshchenko et al., 2015). JOHD jest definiowana liczbą powtórzeń CAG powyżej 60 (Moeller et al., 2021), natomiast wyróżnia się w jej grupie również postać niemowlęcą (tzw. postać „*ultra-juvenile*”), która wiąże się z liczbą powtórzeń CAG powyżej 90 (Fusilli et al., 2018; Stout, 2018). W takich przypadkach, początek objawów występuje zazwyczaj już przed 10. rokiem życia. Jednym z najmłodszych i najcięższych dotychczas opisanych przypadków niemowlęcej postaci HD była dziewczynka, która jedynie do 18. miesiąca życia rozwijała się prawidłowo, natomiast, w wieku 3,5 lat, zidentyfikowano u niej wyraźny zanik mózdzku. U pacjentki zdiagnozowano 265 powtórzeń CAG na zmutowanym allelu genu *HTT* i 14 powtórzeń na drugim allelu (Milunsky et al., 2003).

1.1.3. Patogeneza molekularna i zmiany makroskopowe w mózgu HD

W HD, mutacja ekspansji CAG jest zlokalizowana w genie huntingtyny (*HTT*), który ma kluczowe znaczenie dla rozwoju neuronów (Saudou and Humbert, 2016; Wiatr et al., 2018). Zmutowana huntingtyna (mHTT) powoduje dysfunkcję i obumieranie neuronów poprzez szereg mechanizmów molekularnych. Obejmują one bezpośredni wpływ zmutowanego fragmentu egzonu 1 mHTT, skłonność zmutowanego białka mHTT do tworzenia nieprawidłowych agregatów oraz jego wpływ na proteostazę komórkową, transport aksonalny, transkrypcję, translację

oraz funkcję mitochondriów i synaps (Ross and Tabrizi, 2011; Bates et al., 2015).

Patologia makroskopowa wszystkich postaci HD dotyczy głównie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i obejmuje przede wszystkim śmierć komórek neuronów prążkowiec (Tereshchenko et al., 2019). Do najbardziej zmienionych obszarów prążkowiec należą jądro ogoniaste i skorupa. Średnie neurony kolczaste prążkowiec (ang. *medium spiny neurons*, MSN), będące neuronami GABA-ergicznymi i stanowiące około 95% komórek tego rejonu mózgu, są jedną z pierwszych populacji komórkowych ulegających degeneracji w HD (Monk et al., 2021). Na początku choroby następuje uszkodzenie komórek MSN drogi pośredniej, co skutkuje charakterystycznymi dla HD ruchami płasawicznymi (Barry et al., 2018). Kolejno, następuje atrofia kory mózgowej i podkorowej istoty białej (Jimenez-Sanchez et al., 2017). Badania wskazują, że już u pacjentów presymptomatycznych, neurony piramidowe leżące w korze mózgowej (ang. *cortical pyramidal neurons*, CPN) i przesyłające sygnały do prążkowiec, jak i neurony prążkowiec przesyłające sygnały do istoty czarnej, wykazują istotną degenerację (Schulte and Littleton, 2011). Następnie, dochodzi do utraty neuronów wzgórza i podwzgórza, a ostatecznie neuronów pozostałych obszarów mózgu (Tabrizi et al., 2022). Pacjentów z HD charakteryzuje uogólniony spadek objętości mózgu, występujący u części osób jeszcze przed pojawieniem się objawów (Kinnunen et al., 2021). Analiza pośmiertna tkanek mózgowych pochodzących od pacjentów, wykazała największy zanik neuronów w obrębie skorupy i jądra ogoniastego oraz dodatkowo zanik kory mózgowej i istoty białej kresomózgowia, w porównaniu do mózgow osób zdrowych w tym samym wieku (Roussakis et al., 2023). Ciało migdałowate, hipokamp i pień mózgu są nieco powiększone u pacjentów z HD (Hedjoudje et al., 2018). W przypadku postaci młodzieńczej, dane pochodzące z rezonansu magnetycznego (ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) pacjentów wskazują również na atrofię mózdzku. Znacząca różnica między dorosłymi, a dziećmi z HD jest widoczna również w korze

mózgowej. Wyniki badań histopatologicznych (Latimer et al., 2017) wykazały, łagodną do umiarkowanej, utratę neuronów tego obszaru w tkance mózgowej pacjentów z początkiem choroby w wieku dorosłym, podczas gdy u osób z JOHD kora często pozostaje niezmienną. W obu postaciach choroby, wewnątrzjądrowe i cytoplazmatyczne inkluzje neuronalne HTT-dodatnie można znaleźć zarówno w korze mózgowej jak i prążkowie.

1.2. Choroba Huntingtona, a wczesny rozwój mózgu

1.2.1. Neurogeneza embrionalna człowieka

Rozwój mózgu obejmuje wszystkie podstawowe procesy komórkowe, takie jak podział, różnicowanie, migracja i apoptoza oraz dojrzewanie neuronów i ich połączeń w procesach wzrostu aksonów i tworzenia synaps. Dzięki tym procesom, następuje kształtowanie się warstw neuronalnych i złożonych połączeń neuronalnych między strukturami mózgu. Regulacja tych procesów odbywa się na drodze wewnątrz i zewnątrzkomórkowych, molekularnych szlaków sygnałowych.

Podczas tworzenia się cewy nerwowej w zarodku (tzw. neurulacji), komórki nabłonka nerwowego (ang. *neuroepithelial cells*, NEC) wykonują symetryczne podziały komórkowe. Ten etap podstawowej proliferacji prowadzi do powstania komórek progenitorowych różnych regionów mózgu (Casas Gimeno and Paridaen, 2022). Kluczową rolę w procesie neurogenezy odgrywają dwie strefy proliferacyjne: strefa komorowa (ang. *ventricular zone*, VZ), okalająca komory boczne mózgu oraz strefa podkomorowa (ang. *subventricular zone*, SVZ), leżąca nad strefą VZ. Obie tworzą cewę nerwową i dają początek komórkom neuronalnym kory mózgowej oraz komórkom glejowym (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019). Neuralne komórki macierzyste (ang. *neural stem cells*, NSC), zlokalizowane w VZ, dają początek wszystkim typom komórek OUN (Nian and Hou, 2022). Komórki NSC w warstwie VZ dzielą się symetrycznie i asymetrycznie. Z podziałów symetrycznych powstają kolejne komórki

NSC, natomiast z podziałów asymetrycznych powstają komórki progenitorowe konkretnych typów neuronów, tworzące warstwę SVZ i ulegające dalszej proliferacji lub różnicowaniu (Nian and Hou, 2022). SVZ funkcjonuje jako strefa realizująca złożony program molekularny sterujący proliferacją, migracją i dojrzewaniem neuronów, co prowadzi do formowania kolejnych, górnych warstw kory mózgowej. Pewne subpopulacje komórek NEC w strefie VZ przekształcają się w promieniste komórki glijowe (ang. *radial glial cells*, RGC). Różne subpopulacje komórek RGC prezentują pewne właściwości embrionalnych komórek NSC i dają początek zarówno neuronom, jak i populacjom komórek glijowych. Z podziału asymetrycznego, RGCs potrafią stworzyć jeden neuron lub progenitor neuronalny. Ciała tych komórek zlokalizowane są w strefie VZ, a ich długie neuryty wydłużają się w kierunku wewnętrznej i zewnętrznej warstwy SVZ (Nelles and Hazrati, 2022). Wykazano, że ciała komórek RGC posiadają szczególną właściwość przemieszczania się wzdłuż swoich neurytów, które niejako stanowią rusztowanie w tym procesie. Owo przemieszczanie się umożliwia migrację neuronów i podziały komórkowe w ściśle określonych miejscach kory mózgowej oraz tworzenie się kolejnych populacji komórek (Nadarajah et al., 2001). W kolejnych etapach rozwoju embrionalnego mózgu, tworzą się kolejne warstwy kory mózgowej, a komórki progenitorowe stają się coraz bardziej ograniczone pod względem typów komórek, do których mogą różnicować. W tym procesie dojrzewania komórkowego, komórki nerwowe zaczynają wydłużać dendryty i aksony, tworząc połączenia z innymi komórkami i stając się integralną częścią sieci komunikacyjnej mózgu (Gibb and Kolb, 2018). W prenatalnej fazie życia, dalszy rozwój mózgu zaczyna być również zależny od procesów degeneracyjnych, takich jak programowana śmierć komórki, czyli apoptoza (Chan et al., 2002). Bardzo ważną rolę w neurogenezie odgrywają kaskady sygnałowe, dzięki którym możliwa jest organizacja pozostałych struktur mózgu. Geny *PAX6* i *EMX2*, ulegają ekspresji w komórkach NEC cewy nerwowej w zarodku. Ekspresja tych genów ma charakter gradientu: *PAX6* ulega silniejszej ekspresji w przednich obszarach mózgowia, natomiast *EMX2* dominuje w regionach

tylnych mózgu. Taki gradient ekspresji pełni rolę pierwotnego wzorca dla komórek NEC, z których powstają progenitory neuronów kolejnych regionów mózgu. W zależności od poziomu ekspresji *PAX6* i *EMX2*, dzielące się komórki NEC dają początek różnym struktutom: przodomózgowiu, śródmózgowiu i tyłomózgowiu (Stiles and Jernigan, 2010; Ypsilanti et al., 2021). Ten skomplikowany proces morfogenezy, kluczowy dla prawidłowej regionalizacji i specjalizacji określonych struktur mózgu, regulowany jest przez różne mechanizmy sygnałowe szlaków TGF β , BMP4, Wnt i FGF (Haremakei et al., 2019).

Na późniejszym etapie embriogenezy, po zakończeniu tworzenia się neuronów, komórki RGC proliferują, aby wytworzyć oligodendrocyty i astrocyty (Yang et al., 2022). Pod koniec rozwoju embrionalnego, komórki RGC zaczynają produkować NSCs wykorzystywane do neurogenezy dorosłego już organizmu. Wczesne etapy neurulacji u człowieka, można odtworzyć w warunkach *in vitro* za pomocą samoorganizujących się struktur zwanych neuruloidami. Zawierają one populacje komórek obecne na etapie zamykania się cewy nerwowej w rozwoju embrionalnym człowieka (dni 21–25 po zapłodnieniu) (Haremakei et al., 2019).

1.2.2. Komunikacja pomiędzy rozwijającą się korą mózgową, a prążkowiem

Złożona i uporządkowana sieć neuronowa ludzkiego mózgu składa się głównie z pobudzających neuronów glutaminergicznych i hamujących interneuronów GABA-ergicznych (Zhang et al., 2017; Assous and Tepper, 2019). Interneurony, to grupa wysoce zróżnicowanych neuronów o różnych funkcjach biologicznych. Zaburzenie równowagi pomiędzy sygnałami pobudzającymi i hamującymi w mózgu, jest związane z wieloma zaburzeniami neurorozwojowymi i neuropsychiatrycznymi, takimi jak zaburzenia ze spektrum autyzmu, czy schizofrenia (Dienel and Lewis, 2019; Nomura, 2021). Podczas rozwoju mózgu niewiele interneuronów powstaje i działa w lokalnych regionach, podczas gdy prawie cała reszta pochodzi z wyniosłości zwojowych (ang. *ganglionic*

eminences, GE), przejściowych struktur w fazie embrionalnej (Hansen et al., 2013). GE, zlokalizowane między wzgórzem, a jądrem ogoniastym, dają początek interneuronom. GE można podzielić na trzy podregiony, w tym boczne (ang. *lateral ganglionic eminence*, LGE), przyśrodkowe (ang. *medial ganglionic eminence*, MGE) i doogonowe wyniosłości zwojowe (ang. *caudal ganglionic eminence*, CGE) (Mi et al., 2018). Każdy podregion generuje czasowo i przestrzennie różne interneurony, skierowane do całego mózgu. MGE generuje głównie komórki GABA-ergiczne migrujące do kory mózgowej, prążkowiec i gałki bladej, natomiast interneurony pochodzące z LGE są prekursorami neuronów MSN i interneuronów opuszki węchowej (Zhao et al., 2022). CGE wytwarza głównie interneurony korowe (Peyre et al., 2015). Ekspresja genów, takich jak np. *NKX2.1*, *GSX2* i *DLX2*, oraz sieci regulacyjnych podczas rozwoju GE przyczynia się do regionalnej różnorodności komórek oraz migracji prekursorów neuronalnych.

Zmiany w przepływie informacji z kory mózgowej do prążkowiec odgrywają kluczową rolę w powstawaniu i progresji HD. W dorosłym mózgu praktycznie wszystkie warstwy kory mózgowej mają zdolność aktywowania neuronów prążkowiec poprzez zorganizowany system projekcji napędzany przez glutaminian. Układ korowo-prążkowiec jest ściśle regulowany przez dopaminę (DA) oraz kwas gamma-aminomasłowy (GABA) (Rangel-Barajas and Rebec, 2016). Razem, DA i GABA zapewniają krytyczną przeciwwagę dla wzbudzenia neuronów prążkowiec indukowanych glutaminianem, co z kolei reguluje aktywność dalszych szlaków biologicznych w jądrach podstawy. Co za tym idzie, regulacja aktywacji neuronów prążkowiec przez glutaminian, w której pośredniczą DA i GABA, pozwala na odpowiednie reakcje motoryczne i poznawcze, definiujące zdrową funkcję jąder podstawy. HD zaburza działanie wszystkich trzech systemów transmisyjnych, tworząc wolno postępujący fenotyp motoryczny i poznawczy, który kończy się śmiercią.

1.2.3. Układ komorowy mózgu i jego znaczenie w HD i w innych chorobach neurologicznych

Układ komorowy to zestaw czterech przestrzeni zlokalizowanych wewnątrz mózgowia, który obejmuje 2 komory boczne (po 1 w każdej półkuli mózgowej), trzecią komorę w międzymózgowiu i czwartą komorę w tyłomózgowiu (Shenoy and Lui, 2023). Wszystkie z nich wypełnione są płynem mózgowo-rdzeniowym (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF). Płyn ten uwalniany jest do przestrzeni podpajęczynówkowej, skąd otacza cały ośrodkowy układ nerwowy (Marques et al., 2017). Układ komorowy wyścielony jest wyspecjalizowanym rodzajem komórek glejowych, zwanych komórkami ependymalnymi. Tkanką znajdującą się wewnątrz komór, w której produkowany jest CSF, jest splot naczyniówkowy (ang. *choroid plexus*, ChP). Tworzy on barierę krew - płyn mózgowo-rdzeniowy w mózgu (ang. *blood-cerebrospinal fluid barrier*, BCSFB). ChP wspomaga utrzymanie homeostazy środowiska zewnątrzkomórkowego w mózgu, usuwając niepożądane substancje z płynu CSF i pompując wymagane związki, w tym niektóre witaminy, hormony i peptydy, z krwi, do CSF i następnie do mózgu (MacAulay et al., 2022). Ponadto, splot naczyniówkowy bierze udział w regulacji procesu neurogenezy (Silva-Vargas et al., 2016) oraz związanych z nią nieprawidłowości (Fame and Lehtinen, 2020).

Jednym z fenotypów HD, zarówno postaci dorosłej jak i młodzieńczej, który pojawia się znacznie szybciej niż objawy kliniczne, jest powiększona objętość komór bocznych w mózgu (Jahanshahi et al., 2022). Jest to również fenotyp charakterystyczny dla innych chorób neurologicznych, w tym neurorozwojowych. Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorder*, ASD) często wykazują powiększenie komór wraz z charakterystycznymi nieprawidłowościami splotu naczyniówkowego, a także powstawanie torbieli pochodzenia ependymalnego we wczesnym rozwoju mózgu (Movsas et al., 2013). Jedno z badań klinicznych wykazało, że objętość ChP jest znacząco większa u pacjentów zmagających się z psychozą (Lizano et al., 2019). Co więcej,

szereg badań udowodnił, że choroba Alzheimerera (AD) powiązana jest z licznymi zmianami zarówno w morfologii jak i funkcji ChP, takimi jak zaburzona aktywność metaboliczna oraz ograniczone usuwanie toksyn (Krzyzanowska and Carro, 2012; Marques et al., 2013).

1.2.3.1. Transtyretyna (TTR) i jej rola w neurodegeneracji

Komórki nabłonkowe spłotu naczyńkowego syntetyzują białko transtyretynę (TTR), które pełni wiele funkcji biologicznych (Bezerra et al., 2020). Podstawową rolą białka TTR, którego obecność stwierdza się również w wątrobie, siatkówce oka oraz osoczu, jest transport tyroksyny i retinolu we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym (Alshehri et al., 2015; Ueda, 2022). Ponadto, białko TTR ma zdolność do pobudzania wzrostu neurytów w warunkach *in vitro*, odgrywa kluczową rolę w procesie regeneracji nerwów oraz zapewnia działanie neuroprotekcyjne w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym (Fleming et al., 2009; Alshehri et al., 2015). Badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, że brak białka TTR skutkuje spowolnieniem wzrostu neurytów w hipokampie (Gomes et al., 2016). Odgrywa on również istotną rolę w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimerera oraz rodzinna polineuropatia amyloidowa (ang. *familial amyloid polyneuropathy*, FAP) (Iqbal, 2018; I Oliveira da Silva et al., 2020). W AD, białko TTR bierze udział w sekwestracji kluczowego dla neuropatologii tej choroby peptydu β -amyloidu ($A\beta$) w mózgu, chroniąc mózg przed neurotoksycznymi blaszkami amyloidowymi (Iqbal, 2018). W polineuropatii FAP, dochodzi do odkładania się w całym organizmie złogów transtyretyny (I Oliveira da Silva et al., 2020). Jedną z dostępnych metod leczenia FAP jest przeszczep wątroby, ponieważ hamuje to produkcję TTR. Ostatnio, białko TTR zostało również powiązane z HD (Caron et al., 2022). Wykazano istotny związek wybranych białek obecnych w płynie CSF, w tym białka TTR, z kliniczną oceną ciężkości HD zarówno u pacjentów objawowych, jak i u osób presymptomatycznych. Ponadto, białko TTR znalazło się w wielomarkerowym panelu białek CSF, dzięki któremu można rozróżnić

osoby we wczesnym stadium choroby, od presymptomatycznych nosicieli mutacji w genie *HTT* (Caron et al., 2022).

1.2.4. Neurorozwojowe fenotypy HD

Białko huntingtyna (HTT) obecne jest w całym organizmie, a jego najwyższy poziom obserwuje się w mózgu i w jądrach. Obecne jest we wszystkich komórkach neuronalnych oraz glejowych mózgu (Schulte and Littleton, 2011; Jansen et al., 2017). HTT kolokalizuje z wieloma organellami komórkowymi, takimi jak jądro komórkowe, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego i endosomy. Brak białka HTT w zarodku jest śmiertelny, prawdopodobnie z powodu istotnej funkcji HTT w gastrulacji (Saudou and Humbert, 2016) i rozwoju układu nerwowego, w tym szlaków korowo-prążkowiowych w mózgu (Reiner and Deng, 2018). Ponadto, gen *HTT* bierze udział w regulacji różnych procesów biologicznych i szlaków molekularnych zaburzonych w komórkach HD, takich jak apoptoza, transkrypcja, transdukcja sygnału, transport za pośrednictwem pęcherzyków, tworzenie cytoszkieletu i centrosomów oraz aktywność mitochondriów (Saudou i Humberta, 2016). Podczas gdy prawidłowa HTT zlokalizowana jest w całym organizmie i pełni funkcje plejotropowe w dorosłym mózgu, mHTT wydaje się mieć bardziej działanie selektywne, ponieważ jej patogenność dotyczy głównie neuronów prążkowiego i kory mózgowej (Reiner and Deng, 2018). Nieprawidłowy rozwój mózgu został już powiązany z utratą białka HTT i coraz więcej dowodów, uzyskanych na modelach iPSC, kulturach neuronalnych 2D, jak i organoidach mózgowych, wskazuje na neurorozwojowy charakter HD (HD iPSC Consortium, 2017; Wiatr et al., 2018). To co pozostaje nadal słabo poznane to fakt, czy zwiększona podatność neuronów prążkowiego i kory mózgowej na działanie mHTT jest spowodowana konkretnymi procesami zachodzącymi w dorosłym mózgu, czy też jest wynikiem nieprawidłowej neurogenezy, która prowadzi do neurodegeneracji w późniejszych latach życia. Doniesienia wskazujące na komponent neurorozwojowy HD dotyczą głównie trzech aspektów. Po pierwsze, HTT oddziałuje z szeregiem czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w

neurogenezę (Ahmed et al., 2015; Fields et al., 2021). Bierze udział w tworzeniu epiblastu, a następnie rozet nerwowych i cewy nerwowej (Lo Sardo et al., 2012; Iennaco et al., 2022), a także reguluje przeżywalność neuronów, dojrzewanie kory mózgowej i migrację interneuronów (Tong et al., 2011; Nguyen et al., 2013). Po drugie, sugeruje się, że patologia HD postępuje liniowo w czasie już od urodzenia, a pomiar objętości wewnątrzczaszkowej reprezentującej maksymalny wzrost mózgu uzyskany podczas rozwoju wykazał zmiany u osób z HD jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych (Aylward et al., 2013; Estevez-Fraga et al., 2023). Po trzecie, myszy typu *knock-in mHtt* wykazują opóźnioną organizację cytoarchitektury prążkowania w rozwijającym się mózgu i charakteryzują się obecnością dużej liczby niedojrzałych komórek (Molero et al., 2016). Ponadto, ekspresja *mHtt* obecna tylko w okresie od poczęcia do 21. dnia życia, tworzy takie same profile neurodegeneracji, jakie obserwuje się u myszy z ekspresją *mHtt* trwającą przez całe dorosłe życie (Molero et al., 2016). Co więcej, wysokoprzepustowe analizy transkryptomyczne przeprowadzone na kulturach neuronów, uzyskanych dzięki różnicowaniu komórek iPSC pochodzących od osób z HD, wykryły zmiany ekspresji genów zaangażowanych w rozwój organizmu, podkreślając m.in. obniżenie ekspresji kluczowego czynnika neurogenego *NeuroD1* (Ring et al., 2015; HD iPSC Consortium, 2017). Co więcej, neuruloidy wytworzone z komórek ESC pochodzących od pacjentów HD, wykazały zaburzoną neurogenezę, w tym nieprawidłowe tworzenie się rozet neuronalnych. Neuruloidy HD zawierające 56 powtórzeń CAG, wykazały obniżoną ekspresję genów szlaku Wnt/PCP (na przykład *WNT5B* i *RSPO3*, specyficznych dla nabłonka nerwowego) oraz genów *RHOB* i *RAB5C* w komórkach grzebienia nerwowego. Co więcej, zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genów (*EVL*, *MID1*, *RHOQ* i *TMEM47*) związanych z architekturą cytoszkieletu i procesem skurczu aktyny-miozyny, co sugeruje zaburzenia mechanizmu zależnej od aktyny organizacji tkankowej podczas neurulacji (Haremakei et al., 2019).

1.3. Ludzkie modele badawcze HD

1.3.1. Komórki macierzyste oraz hodowle neuronalne 2D

Zmiany molekularne w HD rozpoczynają się już w komórkach, które nie są jeszcze zaangażowane w żadną linię rozwoju, takich jak komórki macierzyste (Kaye and Finkbeiner, 2013). Rozwój technologii opartej na indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (ang. *induced-pluripotent stem cells*, iPSC), zapewnił szereg nowych możliwości modelowania HD w warunkach *in vitro*. Programowanie fibroblastów do komórek iPSC zależy od ekspresji określonych czynników transkrypcyjnych, które wyciszają geny biorące udział w różnicowaniu komórek, jednocześnie promując pluripotencję (Takahashi et al., 2007). Podobnie jak ludzkie embrionalne komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*, ESC), iPSC mogą samoodnawiać się przez długi czas oraz różnicować do prawie wszystkich linii komórkowych, w tym do określonych typów komórek neuronalnych, tworząc kolejne ważne modele HD. Komórki iPSC mogą być generowane bezpośrednio od pacjentów HD, dzięki czemu tworzą najbardziej precyzyjny genetycznie model tej choroby (Kaye and Finkbeiner, 2013). Dotychczas, wiele grup badawczych, w tym również nasza, udokumentowało szereg zmian molekularnych w komórkach iPSC pochodzących od pacjentów z chorobą Huntingtona oraz w komórkach neuronalnych uzyskanych na drodze różnicowania komórek HD iPSC. Zmiany molekularne w liniach HD iPSC obejmują sygnalizację MAPK, wzrost ekspresji *SOD1* i spadek ekspresji *TP53* (Szlachcic et al., 2015) oraz liczne zmiany w ścieżkach neurorozwojowych (Ring et al., 2015). W liniach komórek iPSC pochodzących od pacjentów z JOHD, obserwuje się ekspresję genów cząsteczek sygnałowych, *PAX6* i *EMX2*, jak wcześniej wspomniano kluczowych dla prawidłowej neurogenezy, a komórki te wykazują szereg fenotypów molekularnych związanych z aktywnością szlaków MAPK, WNT i TP53 (Szlachcic et al., 2015, 2017; Świtońska et al., 2019). Wysokoprzepustowe analizy transkryptomyczne neuronalnych komórek macierzystych wygenerowanych z HD iPSC, wykazały zaburzenie szlaków

komórkowych związanych z sygnalizacją w neuronach GABA-ergicznym, przewodnictwem w aksonach oraz transportem wapnia (HD iPSC Consortium, 2012, 2017). Co więcej, w jednym z badań stwierdzono, że około 30% genów o zmienionej ekspresji, wykrytych w analizie sekwencji RNA w liniach HD iPSC, wpływa na szlaki regulujące rozwój i dojrzewanie neuronów (HD iPSC Consortium, 2017). Zidentyfikowane geny związane są głównie z wczesnymi etapami różnicowania neuronów w embrionalnym rozwoju prądkowia. W hodowlach neuronów 2D potwierdzono również zaburzenia w tworzeniu rozet neuronalnych, specyfikacji neuronów, migracji i cytoarchitekturze (Mehta et al., 2018).

1.3.2. Organoidy mózgowe

Postęp inżynierii tkankowej w ostatnich latach, znacząco wspomógł modelowanie chorób neurodegeneracyjnych poprzez generowanie trójwymiarowych kompleksów komórkowych przypominających ludzką tkankę mózgową, zwanych organoidami mózgowymi. Organoidy mózgowie uzyskiwane na drodze różnicowania ludzkich komórek iPSC mogą skutecznie modelować rozwój wybranych regionów mózgu człowieka (Benito-Kwiecinski and Lancaster, 2020). Ze względu na to, że organoidy te skutecznie odzwierciedlają cytoarchitekturę 3D tkanki mózgowej, mogą one ujawniać określone fenotypy chorobowe, które nie są obserwowane w kulturach komórkowych 2D.

Po raz pierwszy, koncepcja tworzenia organoidów mózgowych została opublikowana w 2014 roku (Lancaster and Knoblich, 2014). Zastosowano w niej prostą pożywkę wspierającą hodowlę neuronalną, bez dodawania do niej jakichkolwiek cząsteczek sygnałowych, co poskutkowało samoorganizowaniem się zróżnicowanych komórek w różne regiony mózgu w obrębie tego samego organoidu. Tego rodzaju protokół opiera się na zdolności komórek macierzystych do spontanicznego różnicowania. Endogenna sygnalizacja w ciałach zarodkowych hodowanych w macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwia hodowlę 3D i samoorganizację w odrębne regiony mózgu, takie jak przedmózgowie, śródmózgowie, tyłomózgowie, czy splot naczyniówkowy

(Lancaster et al., 2013; Lancaster and Knoblich, 2014; Qian et al., 2019). Mimo, że samoorganizujące się organoidy mózgowe tworzą wiele różnych populacji komórkowych, to brak ukierunkowanego różnicowania prowadzi do wysokiej heterogenności populacyjnej w obrębie nawet tych samych organoidów, co może powodować błędne modelowanie niektórych chorób. Kilka lat później, celem zwiększenia homogenności w różnicowaniu organoidów oraz wzbogacenia analiz fenotypowych o czynniki migracji interneuronów, wygenerowano pierwsze grzbietowo-brzusze fuzyjne organoidy mózgowe zawierające populacje komórkowe rozwijającego się przodomózgowia: kory mózgowej i prążkowie (Bagley et al., 2017). Różnicowanie do strony grzbietowej przodomózgowia, czyli do kory mózgowej, uzyskano na drodze zahamowania aktywności ścieżki SHH w komórce dzięki użyciu związku niskocząsteczkowego, cyklopaminy A (cycA), będącego inhibitorem receptora białka SMO w komórce. Efekt różnicowania analizowano poprzez badanie ekspresji markerów kory nowej, czyli genów *TBR1* oraz *PAX6*. Różnicowanie do strony brzusznej przodomózgowia, czyli do populacji GE rozwijających późniejsze prążkowie, uzyskano dzięki jednoczesnej inhibicji ścieżki sygnałowej WNT oraz aktywacji ścieżki SHH w komórce. W tym celu, wykorzystano dwa związki niskocząsteczkowe, IWP2 oraz SAG. Efekt różnicowania analizowano poprzez badanie ekspresji markerów komórek GE, czyli genów *DLX2*, *NKX2.1* oraz *GSX2* (Bagley et al., 2017).

W 2018 roku, pierwszy raz użyto organoidów mózgowych jako modelu choroby Huntingtona (Conforti et al., 2018). Badanie to dostarczyło dowodów na bezpośredni związek między wczesnymi zaburzeniami neurorozwojowymi HD, a fenotypem neurodegeneracyjnym u osób dorosłych. Uzyskane dane sugerują, że organoidy HD pozostają „uwięzione” na wczesnym etapie rozwoju, nie wykazując zdolności do prawidłowego różnicowania w kierunku dojrzałych neuronów. Dodatkowo, przeprowadzona analiza transkryptomyczna wykazała, że geny o istotnie zmienionej ekspresji powiązane są z wydłużaniem się aksonów neuronów projekcyjnych oraz z białkami synaptycznymi. Stwierdzono, że mHTT ma znacząco negatywny wpływ na rozwój

prążkowiec i kory mózgowej, prowadząc do nieprawidłowego dojrzwania neuronów i zaburzonej organizacji komórek. W innym badaniu, wykazano mniejszą liczbę struktur neuroepitelialnych i znaczącą dezorganizację komórek progenitorowych neuronów w organoidach mózgowych HD, co również podkreśliło neurorozwojowy charakter choroby Huntingtona (Zhang et al., 2019).

1.4. Inne choroby poliglutaminowe i ich komponenty neurorozwojowe

Do tej pory zidentyfikowano osiem, oprócz HD, chorób poliglutaminowych (tzw. chorób polyQ), takich jak ataksje rdzeniowo-mózdzkowe (ang. *spinocerebellar ataxia*, SCA) typu 1, 2, 3, 6, 7 i 17, zanik zębowo-pallidoluzijski (ang. *dentatorubral-pallidoluysian atrophy*, DRPLA) oraz rdzeniowy zanik mięśni opuszkowych (ang. *spinal-bulbar muscular atrophy*, SBMA) (Huang et al., 2019). Choroby polyQ są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący, z wyjątkiem SBMA, które jest sprzężone z chromosomem X. Podobnie jak w przypadku HD, niektóre z tych chorób mogą wystąpić u młodszych pacjentów i w takich przypadkach objawy choroby zwykle różnią się od postaci dorosłych. Chociaż formy młodzieńcze i niemowlęce stanowią mniejszość przypadków, to wskazują one na rozwojowy charakter całej grupy tych schorzeń.

Poza HD, najcięższe w swym przebiegu przypadki młodzieńcze chorób polyQ, o bardzo wczesnym, dziecięcym wystąpieniu objawów, zostały opisane dla SCA2, SCA7, SCA17 oraz DRPLA. W przypadku SCA1, SCA3 oraz SCA6, przypadki juwenilne opisano dla pacjentów nieco starszych, u których objawy pojawiły się tuż przed osiągnięciem 18 r.ż. Jedną z przyczyn występowania bardzo poważnych zaburzeń rozwojowych u tych pacjentów, jest funkcja wymienionych genów oraz kodowanych przez nie białek, którą jest regulacja transkrypcji szeregu procesów komórkowych (Yang et al., 2016; Lee et al., 2018;

Niewiadomska-Cimicka and Trottier, 2019). Przykładem może być gen *ATXN1*, którego mutacja wywołuje SCA1. Na pewnych etapach rozwoju mózgu, transkrypcyjny kompleks represorowy Ataxin1 i Capicua (ATXN1-CIC) reguluje specyfikację linii komórkowej i bierze udział w regulacji proliferacji komórek (Ahmad et al., 2019). Utrata kompleksu ATXN1-CIC może mieć poważne konsekwencje neurorozwojowe. *Knock-out* *Atxn1*-*Atxn1l* lub *Cic* u myszy prowadzi do zmniejszenia grubości kory mózgowej, nadpobudliwości i deficytów pamięci (Lu et al., 2017). Utratę lub zmniejszenie ilości funkcjonalnego białka ATXN1 zaobserwowano u pacjentów z zaburzeniami ze spektrum autyzmu i zespołem nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (Celestino-Soper et al., 2012; Di Benedetto et al., 2013), co sugeruje, że utrata kompleksu ATXN1-CIC powoduje spektrum fenotypów neurobehawioralnych (Lu et al., 2017). Wykazano, że wydłużony ciąg powtórzeń CAG w genie *Atxn1* u myszy SCA1, stymuluje proliferację komórek macierzystych mózdzku, które nabierają tendencję do różnicowania się w hamujące interneurony GABAergiczne, a nie w astrocyty (Edamakanti et al., 2018). Te hiperproliferyjące komórki prowadzą do znacznego zwiększenia liczby GABA-ergicznych połączeń synaptycznych interneuronów, co z kolei zaburza prawidłową funkcję komórek Purkinjego mózdzku (Edamakanti et al., 2018). Kolejnym przykładem może być gen *ATN1*, którego mutacja powoduje DRPLA. Normalna funkcja białka ATN1 związana jest z rozwojem i regulacją polarności komórek oraz z kontrolą transkrypcji różnych populacji komórek progenitorowych (Shen and Peterson, 2008; Mannervik, 2014). *Knock-out* genu *Atn1* w komórkach NPC szczura, doprowadził do poważnych zaburzeń w rozwoju mózgu. Podkreśla się również rolę *Atn1* jako bezpośredniego celu specyficznej dla lizyny demetylazy histonowej 1A (LSD1), pełniącego kluczowe role w rozwoju, takie jak regulacja migracji neuronów korowych lub proliferacja dojrzałych komórek NPCs (Zhang et al., 2014). Co więcej, badania potwierdziły, że zmutowany gen *TBP*, który odpowiedzialna jest za rozwój SCA17, zaburza wiele istotnych szlaków sygnałowych w komórce, takich jak sygnalizacja Notch, sygnalizacja TrkA, system opiekuńczy, reakcja na

stres ER i funkcja mięśni (Yang et al., 2016). Biorąc pod uwagę rolę wymienionych genów odpowiedzialnych za rozwój chorób polyQ, można przypuszczać, że choroby neurodegeneracyjne o późnym początku mogą również mieć swoje podłoże w subtelnych defektach rozwojowych. Zaburzenia w regulacji genów zaangażowanych w migrację i różnicowanie komórek, dojrzewanie i powstawanie synaps oraz apoptozę mogą prowadzić do poważnych zaburzeń rozwoju układu nerwowego oraz przyczyniać się do patologii związanych z chorobami polyQ.

2. CEL PRACY

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było zdefiniowanie wczesnych zaburzeń neurorozwojowych, molekularnych i komórkowych, prowadzących do rozwoju młodzieńczej postaci choroby Huntingtona. Opisane zaburzenia świadczyłyby o tym, że dysfunkcje obserwowane u osób dorosłych z HD, mogą być wynikiem wczesnych i skumulowanych nieprawidłowości rozwoju embrionalnego. Aby zrealizować główny cel mojej pracy, sformułowałam cztery cele szczegółowe.

Cele szczegółowe pracy doktorskiej:

Cel 1. Identyfikacja zaburzonych procesów neurorozwojowych w młodzieńczej postaci choroby Huntingtona, jeszcze przed etapem rozwoju mózgu, na poziomie linii komórek macierzystych iPSC. Cel ten zrealizowałam poprzez analizę wyników sekwencjonowania RNA (RNA-seq), wykonanie wysokoprzepustowej analizy proteomicznej (MS) oraz liczne analizy bioinformatyczne genów i białek wspólnie i różnicująco zmienionych w liniach komórek iPSC 71Q i 109Q, w porównaniu do linii kontrolnych.

Cel 2. Identyfikacja potencjalnych, neurorozwojowych procesów molekularnych zaburzonych w HD na wielu etapach rozwoju i w dorosłym mózgu oraz identyfikacja wspólnego mianownika neurorozwojowego chorób polyQ. Cel ten zrealizowałam dzięki zgromadzeniu szeregu

dostępnych literaturowo danych eksperymentalnych i przeprowadzeniu licznych bioinformatycznych analiz porównawczych.

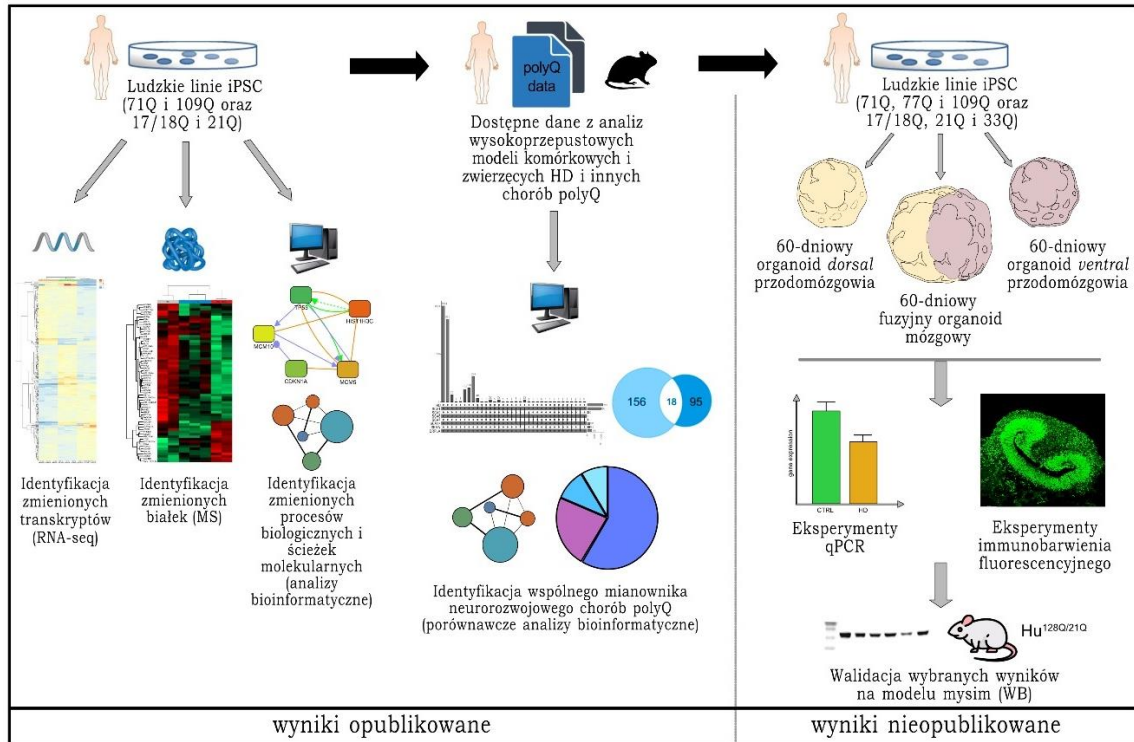
Cel 3. Stworzenie modelu umożliwiającego analizę regionów mózgu kluczowych dla neuropatologii HD. Cel ten zrealizowałam dzięki wygenerowaniu z komórek iPSC fuzyjnych organoidów mózgowych, zawierających populacje komórkowe rozwijającej się kory mózgowej oraz prążkowiec.

Cel 4. Identyfikacja fenotypów neurorozwojowych JOHD obecnych na wczesnych etapach kształtującego się mózgu. Cel ten zrealizowałam poprzez analizy transkryptomowe (qPCR) i immunofluorescencyjne uzyskanych organoidów mózgowych, oraz walidację wybranych wyników na materiale biologicznym pochodzącym z mysiego modelu HD (Hu^{128Q/21Q}).

3. WYNIKI

W kolejnych rozdziałach mojej rozprawy doktorskiej, przedstawiam opis uzyskanych przeze mnie wyników. Opis ten ma charakter „hybrydowy”, bazujący na cyklu artykułów naukowych oraz na wynikach dotychczas nieopublikowanych, dlatego został przeze mnie podzielony na dwa główne podrozdziały. W pierwszej kolejności omówię cykl 2 opublikowanych artykułów naukowych, który opatrzyłam wprowadzeniem z prezentacją koncepcji i celu badań oraz streszczeniem otrzymanych wyników w odniesieniu do rycin zawartych w dołączonych na końcu rozprawy omawianych publikacjach (**Załącznik 1 i 2**). Następnie, szczegółowo omówię nieopublikowane dotychczas wyniki, stanowiące istotną kontynuację poruszanej tematyki. Do opisu wyników nieopublikowanych dołączam zarówno rysunki z rezultatami, jak i metodykę przeprowadzonych eksperymentów. Schematyczny przebieg wszystkich wykonanych przeze mnie badań przedstawiłam na **Rysunku 1**.

Schematyczny przebieg badań



Rysunek 1. Schemat badań wykonanych w pracy doktorskiej. Pierwsza część schematu dotyczy przebiegu badań opublikowanych – eksperymenty wysokoprzepustowe ludzkich komórek JOHD iPSC oraz szczegółowe analizy bioinformatyczne. Dostępne dane z analiz modeli komórkowych i zwierzęcych HD i innych chorób polyQ obejmują zarówno dane transkryptomowe jak i dane proteomiczne. Analizy *in silico* zostały wykonane w programie RStudio (R: The R Project for Statistical Computing, n.d.) oraz przy użyciu takich narzędzi bioinformatycznych jak ConsensusPathDB (Herwig et al., 2016) i ClueGO (Cytoscape) (Bindea et al., 2009). Druga część schematu dotyczy przebiegu badań jeszcze nieopublikowanych, w których skład wchodzi wygenerowanie fuzyjnych organoidów mózgowych oraz eksperymenty qPCR, IF i WB.

3.1. Neurorozwojowe aspekty HD i innych chorób poliglutaminowych na podstawie badań molekularnych komórek HD iPSC i szeregu analiz bioinformatycznych (streszczenie wyników opublikowanych)

Choroby neurodegeneracyjne są heterogenną grupą zaburzeń neurologicznych, które niekorzystnie wpływają na życie milionów ludzi na całym świecie i wiążą się z postępującym zanikiem neuronów w

centralnym lub obwodowym układzie nerwowym. Zaburzenie struktury i sieci neuronowych oraz utrata neuronów, które nie są w stanie się wydajnie odnawiać ze względu na ich terminalnie zróżnicowaną naturę, skutkują zaburzeniem aktywności podstawowych szlaków komunikacyjnych w mózgu, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia pamięci, funkcji poznawczych, zachowania, zmysłów oraz motoryki (Wilson et al., 2023).

Dobrym modelem do badania procesu neurodegeneracji są wspomniane wcześniej choroby polyQ, spowodowane obecnością nieprawidłowo długich ciągów powtórzeń trójnukleotydowych CAG w dotkniętych chorobą genach. Wydłużone powtórzenia poliglutaminowe zaburzają strukturę kodowanych białek, prowadząc do utraty lub zaburzenia ich funkcji (Huang et al., 2019).

Z powodu znanych, monogenowych mutacji prowadzących do rozwoju tej grupy chorób, możliwe było stworzenie szeregu modeli zwierzęcych, w tym modeli mysich, obrazujących przebieg patogenezy często bardzo podobny do tego co obserwuje się u pacjentów. Podczas gdy modele zwierzęce nadal odgrywają nieocenioną rolę w pogłębianiu naszego rozumienia tych neurodegeneracyjnych zaburzeń, modele komórkowe zdobyły znaczącą popularność. Komórki macierzyste, kultury neuronów 2D oraz organoidy mózgowie stały się kluczowymi narzędziami, oferując bardziej precyzyjny i odpowiedni układ modelowy do badania mechanizmów ludzkich chorób i ich celów terapeutycznych. Modele te stanowią podejście komplementarne do zwierzęcych systemów *in vivo* w badaniu chorób polyQ.

W tej części mojej pracy doktorskiej podjęłam próbę zdefiniowania wczesnych zmian transkryptomycznych i proteomicznych w liniach JOHD iPSC, w kontekście ich znaczenia dla wczesnej, neurorozwojowej patogenezy HD. Atutem tych badań było porównanie wyników uzyskanych dla dwóch odrębnych linii komórek iPSC, pochodzących od dwóch różnych pacjentów z młodzieńczą formą HD, z różną liczbą powtórzeń CAG i różnym wiekiem zachorowania. Rezultatem takiej

analizy było opisanie zmian wspólnych dla obu linii jak i takich, które mogą być zmienne osobniczo lub być zależne od liczby powtórzeń CAG. Badaniom tym towarzyszył szereg analiz bioinformatycznych, dzięki którym mogłam jak najlepiej zinterpretować uzyskane dane. Chcąc porównać nasze dane, z dostępnymi danymi uzyskanymi w wyniku analiz różnych modeli komórkowych HD, przeprowadziłam obszerną analizę porównawczą. Badanie to miało na celu wyodrębnienie puli genów i białek, a co za tym idzie określonych procesów biologicznych, które są zaburzone w HD, niezależnie od etapu neurogenezy. Ponadto, dzięki większemu wyborowi dostępnych danych, uzyskanych w wyniku analiz modeli mysich, byłam w stanie porównać dane pomiędzy innymi chorobami polyQ, co mogłoby pokazać wspólny neurorozwojowy mianownik tych chorób.

W kolejnych rozdziałach pracy przedstawiam wyniki badań oraz analiz bioinformatycznych wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, które zostały opisane i opublikowane w dwóch artykułach naukowych. W pierwszej kolejności streszczam pracę, w której opisano wczesne zmiany molekularne w liniach komórek HD iPSC pochodzących od dwóch różnych pacjentów z młodzieńczą formą choroby Huntingtona (Świtońska et al., 2019). Następnie, omówiam pracę przeglądową stanowiącą rozszerzenie analiz bioinformatycznych opublikowanych w pracy Świtońska et al. 2019, w której porównałam szereg dostępnych danych transkryptomicznych i proteomicznych uzyskanych nie tylko w wyniku analiz modeli HD, ale również pozostałych chorób polyQ (Świtońska-Kurkowska et al., 2021). W tekście odwołuję się do rycin umieszczonych w omawianych publikacjach (Fig.).

3.1.1. Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC with 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling

Świtońska K, Szlachcic WJ, Handschuh L, Wojciechowski P, Marczak Ł, Stelmaszczuk M, Figlerowicz M*, Figiel M*.

Frontiers in Cellular Neuroscience 2019; 12:528.

doi: 10.3389/fncel.2018.00528

(Załącznik 1)

Artykuł opisuje obraz wczesnych zmian molekularnych, transkryptomocnych i proteomicznych, zachodzących w liniach komórek iPSC uzyskanych od dwóch pacjentów z JOHD. Analiza pluripotencjalnych komórek HD pochodzących od młodych pacjentów z dużą i zarazem różną liczbą powtórzeń CAG oraz odmiennym wiekiem wystąpienia objawów, jest kluczowa dla zrozumienia pierwotnych etapów patogenezы HD oraz ich wpływu na dalszy rozwój i kliniczny obraz choroby.

Pierwszym zadaniem w mojej pracy doktorskiej było odkrycie wczesnych, transkryptomocnych zmian neurorozwojowych w komórkach JOHD iPSC, dzięki interpretacji i walidacji wyników uzyskanych na drodze sekwencjonowania RNA komercyjnie dostępnych linii JOHD iPSC (71Q i 109Q) oraz kontrolnych linii iPSC (17/18Q i 21Q). Wyodrębniłam trzy grupy genów o istotnie zmienionej ekspresji w liniach JOHD iPSC ($p < 0.05$) w porównaniu do linii kontrolnych (wyniki dodatkowe w publikacji - Supp. Table S3). W pierwszej grupie, porównującej obie linie JOHD z liniami kontrolnymi, znalazło się 31 genów o istotnie obniżonej ekspresji i 76 genów o istotnie podwyższonej ekspresji. W drugiej grupie, porównującej linię 71Q z liniami kontrolnymi, znalazło się 31 genów o istotnie obniżonej ekspresji i 134 geny o istotnie podwyższonej ekspresji. W ostatniej grupie, porównującej linię 109Q z liniami kontrolnymi, znalazło się 217 genów o istotnie obniżonej ekspresji i 106 genów o istotnie podwyższonej ekspresji. Liczbę transkryptów o istotnie zmienionej ekspresji w obu liniach JOHD oraz tylko w linii 71Q lub tylko

w linii 109Q, przedstawiłam na Fig. 1E i F. Eksperymenty walidacyjne oraz późniejsze analizy bioinformatyczne przeprowadziłam na ustalonych powyżej grupach mRNA. Z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative PCR*, qPCR) przeprowadziłam część eksperymentów walidacyjnych wybranych deregulowanych genów. Analizy qPCR potwierdziły spójność kierunku deregulacji 14 z 17 wybranych genów, w tym pełną spójność zmian transkryptów deregulowanych tylko w linii 71Q (geny: *PIWIL2*, *HIST1H3C*, *FAM65B*, *PDGFB*) oraz transkryptów deregulowanych tylko w linii 109Q (geny: *TP53*, *PHLDA3*, *TRIM22*) (Fig. 2).

Żeby sprawdzić, czy deregulacje występujące w komórkach HD na poziomie transkryptów mają swoje funkcjonalne przełożenie na zmiany w poziomie białek, wykonałam wysokoprzepustowe eksperymenty proteomiczne (MS) na tych samych komórkach JOHD iPSC. Eksperymenty te obejmowały ilościową analizę białek oraz identyfikację tych, których poziom był istotnie zmieniony w liniach JOHD iPSC, w porównaniu do linii kontrolnych. W wyniku analiz proteomicznych, zidentyfikowałam 65 białek różnicujących, z których dwa, TP53 i ZFP30, wykazały taki sam kierunek zmian w komórkach JOHD jak kodujące je geny (Fig. 3). Białko TP53, którego ilość była istotnie mniejsza w liniach 109Q, związane jest ze szlakiem apoptozy i odpowiedzią na uszkodzenia DNA (Wang et al., 2023). Białko ZFP30, którego ilość była istotnie większa w liniach 71Q, jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za wiązanie DNA, biorącym udział w szeregu szlaków molekularnych (Chen et al., 2019).

Następnie, przy użyciu takich baz danych jak ConsensusPathDB (Herwig et al., 2016) oraz ClueGO (Cytoscape) (Bindea et al., 2009, 2013), wykonałam szereg analiz *in silico* dla najistotniej deregulowanych genów w liniach JOHD ($p < 0.05$). Analiza ta miała na celu sprawdzenie czy białka kodowane przez geny o zmienionej ekspresji w liniach JOHD iPSC tworzą sieć interakcji biochemicznych w komórce. Miało to również na celu identyfikację procesów biologicznych, ścieżek molekularnych i

obszarów subkomórkowych, które mogą być zaburzone w liniach JOHD. Analizy wykonałam na trzech, ustalonych wcześniej grupach genów. Dzięki analizie interakcji ustaliłam, że białka dla 25 z 107 deregulowanych w obu liniach JOHD genów tworzyło wspólną sieć interakcji w komórce (Fig. 4A). Białko PARK2, związane z rozwojem OUN oraz z egzocytozą pęcherzyków synaptycznych, było kluczowym elementem stworzonej sieci. Innym ważnym białkiem zobrazowanym w sieci powiązań biochemicznych było białko PIK3R1, którego gen był jednym z najsilniej deregulowanych w obu liniach JOHD iPSC, i który jest bezpośrednim interaktorem białka HTT w komórce (Tourette et al., 2014). Ponadto, reguluje ono procesy apoptozy oraz wzrostu i dojrzewania aksonów. Niektóre z pozostałych białek w przedstawionej sieci interakcji związane były z transdukcją sygnału oraz rozwojem układu nerwowego (ARHGAP8, DPYSL4, FLRT2). Dzięki analizie ścieżek molekularnych oraz procesów biologicznych ustaliłam, że transkrypty deregulowane w obu liniach JOHD były związane przede wszystkim z wiązaniem jonów metali w komórce (25 genów), regulacją produkcji cytokin, aktywnością aktywatora GTP-azy oraz transportem jonów i regulacją odpowiedzi immunologicznych w komórce (Fig. 5A i Fig. 6A). Analiza *in silico* podkreśliła również zaangażowanie deregulowanych genów w ścieżkę sygnałową fosfolipazy c, będącej kluczowym białkiem sygnałowym dla aktywności wielu hormonów, neuroprzekazników i czynników wzrostu. Do innych ścieżek molekularnych, w które zaangażowane były analizowane geny należały te związane z inhibicją selektywnego wyłapywania serotoniny oraz apoptozą.

Kolejną analizowaną przeze mnie grupą były geny o zmienionej ekspresji wyłącznie w liniach 71Q. Dzięki analizie interakcji ustaliłam, że białka dla 37 ze 198 genów, tworzyły wspólną sieć interakcji w komórce (Fig. 4B). Większość z nich stanowiły białka histonowe (HIST1H3C, HIST1H2BB, HIST1H1A) oraz inne regulatory transkrypcji (ZNF257, BCAS3, MCM5, RNF20). Podwyższona ekspresja kodujących je genów, może potencjalnie prowadzić do przyspieszenia rozwoju zarodka i

wcześniejszego rozwoju układu nerwowego. Wśród procesów biologicznych, w które zaangażowane były geny deregulowane w linii 71Q, znalazły się wiązanie jonów metali, regulacja organizacji komponentów komórkowych, odpowiedź na uszkodzenia DNA, kaskada sygnałowa PPAR oraz procesy zapalne w komórce (Fig. 5B i Fig. 6B).

Z kolei w linii 109Q, mającej znacząco większą liczbę powtórzeń CAG, analiza interakcji wykazała udział białek dla 41 z 217 genów we wspólnej sieci interakcji, z czego większość stanowiły transkrypty o obniżonej ekspresji (Fig. 4C). Najważniejszym białkiem, z największą liczbą interakcji regulatorowych, było białko TP53. Może to sugerować, że mHTT wchodzi w interakcje z białkiem TP53 i zaburza ekspresję i poziom wielu innych genów i białek apoptotycznych. Prowadzi to do nadmiernej ilości progenitorów i potencjalnie zaburza różnicowanie do dojrzałych neuronów. Ustaliłam, że zdecydowana większość genów deregulowanych w liniach 109Q związana była z regulacją procesów komórkowych, odpowiedzią komórkową na cytokiny, regulacją proliferacji oraz procesami związanymi z apoptozą, kaskadą sygnałową p53 i odpowiedzią komórkową na uszkodzenia DNA (Fig. 5C oraz Fig. 6C).

Ostatnie wykonane przeze mnie analizy *in silico* w tej publikacji obejmowały metaanalizę, w której porównałam dane uzyskane z wykonanego RNA-seq z innymi dostępnymi danymi pochodzącymi z komórek HD (Fig. 7). Analizę przeprowadziłam bazując na danych zawartych we wcześniejszej publikacji (Wiatr et al., 2018), uwzględniając dodatkowo dane z najnowszej wówczas publikacji, zawierającej wyniki z analiz wysokoprzepustowych komórek HD (HD iPSC Consortium, 2017). Dane z 9 publikacji podzieliłam na 4 grupy – geny deregulowane w embrionalnych komórkach macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, ESC), iPSC, NSC i neuronach. Przeprowadzona przeze mnie metaanaliza wyodrębniła pięć genów ulegających deregulacji zarówno w przeanalizowanych przez nas liniach HD iPSC, jak również w kulturach komórek NSCs i neuronach innych grup badawczych. Dwa z nich, *LHFP* oraz *FLRT2* miały istotnie niższą ekspresję we wszystkich analizowanych

przeze mnie liniach HD iPSC, z $\log_2FC = -4$. Wśród 16 genów pokrywających się pomiędzy naszą linią 109Q, a kulturami neuronów wyodrębniłam również pulę genów deregulowanych zarówno w przeanalizowanych przeze mnie liniach 71Q oraz 109Q, jak i w liniach iPSC przeanalizowanych przez inne grupy badawcze. Wykazałam, że pokrywające się pomiędzy analizami geny związane są z wieloma procesami molekularnymi, takimi jak ścieżka TGF β (*TGF β 1*) i p53 (*CDKN1A*, *GADD45B*), gospodarka wapniowa (*CALCRL*, *ANXA2*) oraz adhezja międzykomórkowa (*ANK1*).

Podsumowując, zrealizowałam pierwszy cel mojej pracy doktorskiej poprzez wykrycie wczesnych zmian transkrypcyjnych i proteomicznych w młodzieńczych liniach JOHD iPSC. W rezultacie analiz bioinformatycznych, zidentyfikowałam zmiany w kilku procesach biologicznych, które są kluczowe dla prawidłowego rozwoju neurologicznego. W świetle tych wyników można przyjąć, że procesy molekularne leżące u podstaw JOHD rozpoczynają się już w komórkach niezróżnicowanych, czyli jeszcze przed stadium rozwoju embrionalnego. Sugeruje to, że zaburzenia obserwowane u osób z HD mogą być wynikiem wczesnych i skumulowanych nieprawidłowości rozwoju embrionalnego.

3.1.2. Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data

Świtońska-Kurkowska K, Krist B, Delimata J, Figiel M*.

Frontiers in Cell and Developmental Biology 2021; 9:642773.

doi: 10.3389/fcell.2021.642773

(Załącznik 2)

Publikacja stanowi rozszerzenie analiz bioinformatycznych opublikowanych w pracy (Świtońska et al., 2019), które zostały podsumowane w poprzednim podrozdziale.

Pierwszym celem tej pracy było uzyskanie szerszego przeglądu piśmiennictwa młodzieńczych przypadków chorób polyQ, z bardzo długimi powtórzeniami CAG, w kontekście wczesnego rozwoju mózgu. Ponieważ rozwój mózgu jest przede wszystkim związany z tworzeniem nowych populacji komórek, różnicowaniem i kształtowaniem się połączeń między poszczególnymi obszarami mózgu, przyjrzałam się temu, co wiadomo o procesach neurorozwojowych w kontekście wczesnoobjawowych, młodzieńczych przypadków chorób polyQ.

Następnie, wykonałam liczne analizy *in silico* na kolekcji wybranych przeze mnie dostępnych danych eksperymentalnych komórek AOHD i JOHD oraz innych chorób polyQ (SCA1, SCA2, SCA6, SCA7, SCA17, DRPLA i SBMA) (wyniki dodatkowe w publikacji - Supp. Table S1). Wszystkie analizy porównawcze i ich wizualizacje wykonałam z wykorzystaniem programu R software 3.6.3. (R: The R Project for Statistical Computing, n.d.) i dostępnych w nim trzech pakietów: UpSetR (Conway et al., 2017), ComplexHeatmap (Gu et al., 2016) oraz VennDiagram (Chen and Boutros, 2011). Analizy ścieżek molekularnych, procesów biologicznych oraz komponentów komórkowych wykonałam w programie ClueGO (Cytoscape).

Dzięki wykonanym przeze mnie analizom, uzyskałam szerszą wiedzę na temat roli bardzo długich ciągów poliglutaminowych we wczesnym rozwoju mózgu. Po pierwsze, przeprowadziłam bioinformatyczną analizę porównawczą danych transkryptomicznych uzyskanych z analiz komórek AOHD i JOHD, odzwierciedlających poszczególne etapy rozwoju embrionalnego (Fig. 1 i Fig. 2). Dostępne dane obejmowały wyniki analiz komórek ESCs, iPSCs, NSCs, neuronalnych komórek prekursorowych (ang. *neural precursor cells*, NPCs), neuronów oraz tkanek mózgowych uzyskanych pośmiertnie od pacjentów. Wykonana przeze mnie analiza bioinformatyczna miała na celu wyodrębnienie puli genów, a później określonych procesów biologicznych, które są istotnie i stale zaburzone w HD, niezależnie od poziomu zróżnicowania komórek i etapu neurogenezy. Miało to pozwolić na

wyodrębnienie puli genów odpowiedzialnych za neurorozwojowy fenotyp HD. Analizę porównawczą w tej części pracy wykonałam przy wykorzystaniu pakietu UpSetR (RStudio), który służy do wizualizacji przecinających się zbiorów i jest bardziej skalowalną alternatywą dla diagramów Venna i Eulera. Analizę UpSetR wykonałam osobno dla genów o obniżonej i podwyższonej ekspresji w komórkach HD (Fig. 1A i Fig. 2A). Porównując geny o istotnie obniżonej ekspresji i ilości w komórkach AOHD i JOHD, wyodrębniłam dwa geny, *TBX15* i *HOXB6*, które były deregulowane w iPSC, NSC i neuronach młodzieńczej postaci HD. Geny te kodują czynniki transkrypcyjne regulujące szereg procesów rozwojowych organizmu. Wyodrębniłam również 12 genów, które miały obniżoną ekspresję zarówno w komórkach iPSC jak i w neuronach JOHD, i które są również związane z regulacją transkrypcji. Ponadto, wyodrębniłam 22 geny deregulowane zarówno w komórkach NSC jak i w neuronach. Geny te powiązane były z szeregiem procesów biologicznych składających się na morfogenezę embrionalną. Wykonana przeze mnie analiza nie wykazała genów ani białek wspólnie deregulowanych pomiędzy komórkami macierzystymi, a neuronami AOHD. Podsumowując tę część analiz bioinformatycznych, wykazałam, że w JOHD, istnieje wiele genów o obniżonej ekspresji, które są spójnie deregulowane na różnych etapach wczesnego rozwoju organizmu, co może mieć bezpośredni wpływ na późniejsze procesy neurorozwojowe i prowadzić do szybszego wystąpienia objawów choroby. W trakcie analiz porównawczych genów o obniżonej ekspresji pomiędzy neuronami AOHD a JOHD, wyodrębniłam 27 genów (lub białek) deregulowanych w neuronach obu postaci tej choroby. Geny te związane były m.in. z procesami różnicowania interneuronów GABA-ergicznym kory mózgowej, których nieprawidłowości prowadzą do zaburzenia równowagi między pobudzającymi a hamującymi szlakami sygnałowymi, co w konsekwencji wpływa na motoryczną i poznawczą patogenezę HD (Hsu et al., 2018). Na drodze analiz *in silico*, sprawdziłam również w jakie procesy biologiczne zaangażowane są geny o istotnie obniżonej ekspresji tylko w neuronach JOHD lub tylko w neuronach AOHD. Zidentyfikowałam szereg procesów

(neuro)rozwojowych, w które zaangażowane były geny o obniżonej ekspresji wyłącznie w neuronach JOHD (Fig. 3). Do procesów tych należały m.in. rozwój układu nerwowego, morfogeneza i dojrzewanie organizmu, synaptogenezę i transdukcja sygnału oraz transport i aktywność jonów.

Dodatkowo, porównałam dane transkryptomocjne ludzkich komórek HD z danymi transkryptomocnymi pochodzącymi z analiz tzw. neuroloidów HD i neuroloidów kontrolnych (struktur samoorganizujących się, odzwierciedlających procesy neurorozwojowe) (Haremaeki et al., 2019). Zidentyfikowałam szereg genów wspólnych pomiędzy grupą markerów populacji komórek neuroepitelialnych, populacji komórek cewy nerwowej i populacji neuronów motorycznych w neuroloidach, a grupą genów o obniżonej ekspresji w komórkach JOHD (wyniki dodatkowe w publikacji - Supp. Table S4). Jest to spójne z poprzednimi analizami *in silico* i wskazuje na znaczenie zaburzeń wczesnych procesów neurorozwojowych w JOHD.

Ponadto, dzięki szerszemu wyborowi danych pochodzących z wysokoprzepustowych analiz przeprowadzonych na modelach mysich, byłam w stanie porównać dostępne dane transkryptomocjne i proteomiczne pomiędzy różnymi chorobami polyQ, co miało ujawnić wspólny, neurorozwojowy mianownik chorób poliglutaminowych (Fig. 4 i Fig. 5). Najciekawszą i najbardziej liczną grupą, będącą wynikiem moich analiz, była grupa 87 genów o obniżonej ekspresji zarówno w HD jak i w SCA1. Wykazałam, że są one związane m.in. z kaskadą sygnałową neuropeptydów, kanałami jonowymi oraz odpowiedzią komórkową na dopaminę. Zidentyfikowałam również geny o wspólnie obniżonej ekspresji w SCA1 i w DRPLA. Wykazałam, że powiązane były one ze ścieżkami zaangażowanymi w uzależnienie od amfetaminy, błoną komórkową neuronów oraz markerami powierzchni receptorów transbłonowych. Zidentyfikowałam również gen *Grid2ip*, którego ekspresja była istotnie obniżona w modelach mysich pięciu różnych chorób polyQ (HD, SCA1, SCA2, SCA7 i SCA17). Kodowane przez ten gen białko synaptyczne

Grid2ip występuje specyficznie w komórkach Purkinjego w mózgu, gdzie wchodzi w interakcje z białkiem receptorowym Grid2 odgrywającym kluczową rolę w synaptogenezie, plastyczności synaptycznej oraz przebudowywaniu macierzy zewnątrzkomórkowej (Matsuda et al., 2006). Do innych ciekawych genów, których ekspresja była obniżona w kilku różnych chorobach polyQ należały *Rgs8*, *Rgs16* i *Pcp4*. Kodowane przez te geny białka biorą udział w procesach wiązania białka kalmoduliny, co ma znaczenie w ścieżkach przekazywania sygnałów wapniowych, wzroście neuronów i plastyczności synaptycznej (Mouton-Liger et al., 2011; Wang and Putkey, 2016). Porównując geny o podwyższonej ekspresji w mysich modelach chorób polyQ, wyodrębniłam pulę 14 genów o takim samym kierunku deregulacji w SCA17 i w SCA7, związanych głównie z aktywnością mikrogleju w centralnym układzie nerwowym.

Następnie, wykonałam kilka dodatkowych analiz porównawczych z wykorzystaniem danych proteomicznych. Po pierwsze, porównałam analizowane wcześniej dane transkryptomiczne z danymi proteomicznymi ludzkich komórek HD. Wykazałam spójność kierunku zmian białek dla trzech genów o obniżonej ekspresji (*TP53*, *ELAVL4* i *COL1A2*), zaangażowanych w wiązanie mRNA i proteaz, oraz dla czterech genów o podwyższonej ekspresji (*LAMB1*, *CD44*, *SPP1*, *HIST1H1B*), związanych z morfogenezą i rozwojem układu nerwowego. Wykonałam również analogiczną analizę porównawczą dla mysich komórek HD i wyodrębniłam 13 białek o takim samym kierunku zmian co odpowiadające im geny (Fig. 6). Analiza procesów biologicznych wykazała ich udział w dojrzewaniu neuronów, transporcie jonów i pęcherzyków, funkcjonowaniu synaps oraz w procesach katabolicznych.

Podsumowując, mimo iż formy młodzieńcze HD i innych chorób polyQ to zdecydowana mniejszość, przypadki wczesnoobjawowe wskazują na neurorozwojowy charakter tej grupy chorób. Wykonana przeze mnie obszerna analiza bioinformatyczna wykazała stałe zaburzenie procesów (neuro)rozwojowych na wielu poziomach rozwoju komórkowego w JOHD, takich jak wieloetapowa morfogeneza zarodka, wzrost i wydłużanie

neuronów oraz transmisja synaptyczna. Wykonane przeze mnie analizy wyodrębniły również zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w procesy tworzenia neuronów, synaptogenezę oraz tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej w modelach mysich różnych chorób polyQ. Wskazuje to na neurorozwojowe podobieństwa tej grupy schorzeń.

3.2. Fuzyjne organoidy mózgowe odzwierciedlające populacje komórkowe rozwijającego się przodomózgowia, prezentują wczesne zaburzenia neurorozwojowe młodzieńczej postaci HD (szczegółowy opis wyników nieopublikowanych)

W chorobie Huntingtona, atrofia prążkowania oraz utrata neuronów MSN i neuronów piramidowych w korze mózgowej, to najbardziej charakterystyczne zmiany obserwowane w mózgu pacjentów (Vonsattel et al., 2011). Zaburzona komunikacja między regionem grzbietowym (korą mózgową), a brzuszny (prążkowiec) rozwijającego się przedmózgowia jest kluczowym czynnikiem w patogenezie HD (Rangel-Barajas and Rebec, 2016). Dlatego też, fuzyjne organoidy mózgowe są idealnym modelem do badania interakcji między najważniejszymi i zaangażowanymi w HD obszarami mózgu. Organoidy mózgu pochodzące z komórek JOHD byłyby szczególnie przydatne do definiowania patogenezy mózgu HD na różnych poziomach, takich jak molekularna organizacja struktur mózgowych czy transkryptomika. Połączenie organoidów grzbietowych i brzusznych w jedną strukturę 3D może również pomóc w modelowaniu bariery krew-mózg (BBB) oraz struktur splotu naczyniówkowego.

W kolejnej części badań wchodzących w skład mojej pracy doktorskiej, wygenerowałam fuzyjne organoidy mózgowe z komórek iPSC pacjentów z młodzieńczą postacią HD, by określić złożone zaburzenia neurologiczne na poziomie biomarkerów molekularnych, różnicowania i interakcji komórkowych oraz uszkodzeń strukturalnych w mózgu HD. Wykazałam, że modelowanie osi grzbietowo-brzusznej przodomózgowia

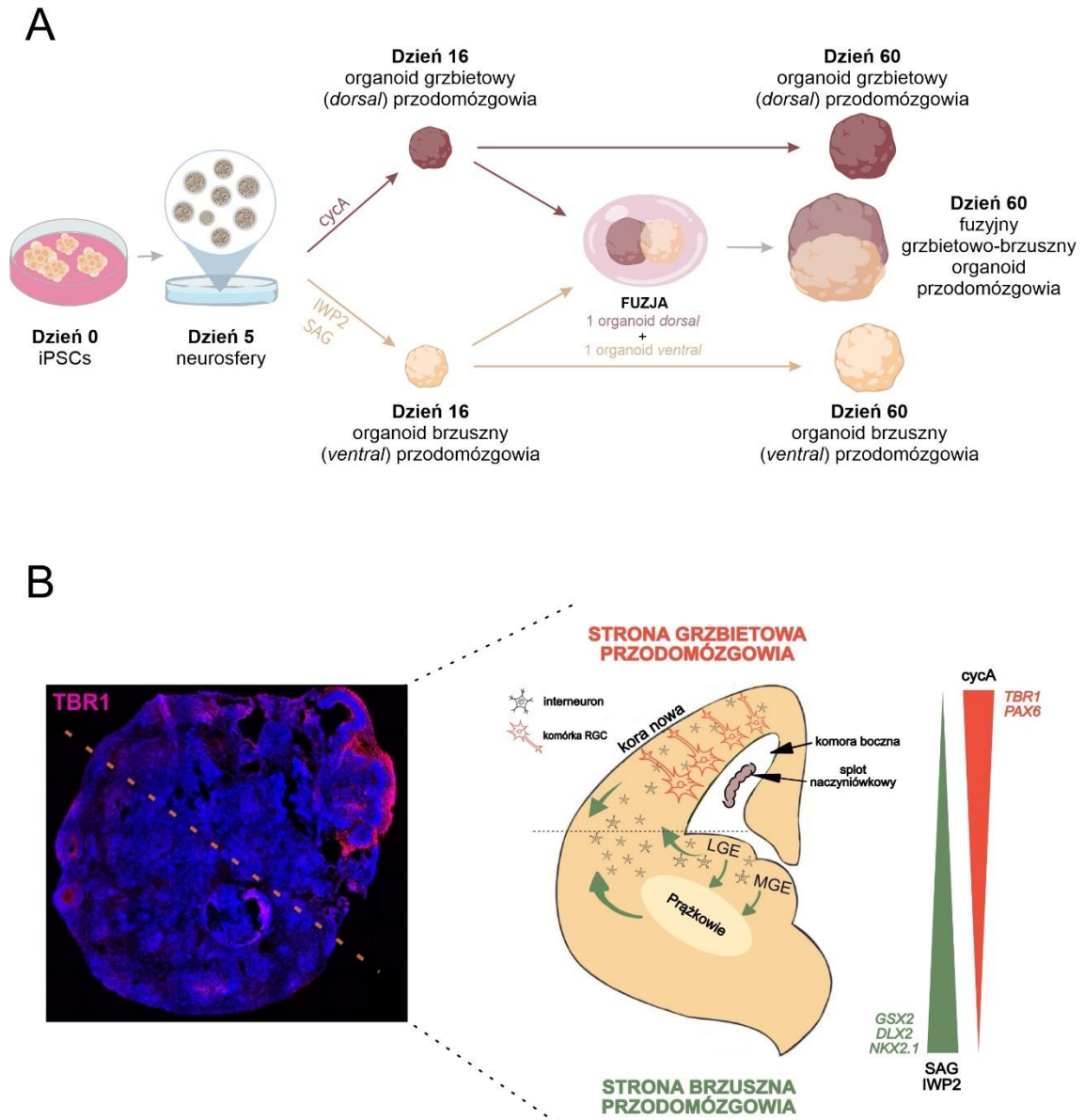
poprzez fuzję organoidów HD różnicujących się w kierunku kory mózgowej i prążkowiec może ujawnić wczesne zaburzenia mózgowe w HD. Odkryłam zaburzenia związane z populacją komórek splotu naczyniówkowego (ChP), w tym obecność pseudo-organów ChP w organoidach JOHD oraz zmiany w ilości mRNA i białka biomarkera ChP, zarówno w organoidach JOHD jak i w surowicy krwi myszy HD. Wykazałam, że nieprawidłowości ChP są istotne dla patogenezy neurorozwojowej HD, a markery ChP w surowicy krwi powinny być dalej badane w kontekście wczesnych markerów HD. Na drodze fuzji organoidów 21Q z organoidami 71Q, stworzyłam również tzw. organoidy mozaikowe. Organoidy typu mozaikowego mogą być modelem do badania zaangażowania poszczególnych struktur mózgu w patogenezę i zależności poziomu prawidłowej i zmutowanej huntingtyny w określonych obszarach rozwijającego się mózgu JOHD.

3.2.1. Wyniki

3.2.1.1. Wygenerowanie 60-dniowych organoidów mózgowych z ludzkich linii komórek iPSC

Neurosferę uzyskane z każdej linii iPSC (21Q, 33Q, 71Q, 77Q i 109Q) poddałam odpowiedniemu różnicowaniu i utworzyłam dwa podstawowe typy organoidów mózgowych - pierwszy odpowiadający części grzbietowej przodomózgowia rozwijającego się zarodka oraz drugi odpowiadający części brzusznej rozwijającego się przodomózgowia. Organoidy części grzbietowej rozwojowo odpowiadają formującej się korze mózgowej (tzw. *dorsal*), natomiast organoidy brzuszne odpowiadają strukturalom wyniosłości zwojowych tworzących późniejsze prążkowiec (tzw. *ventral*). Aby zidentyfikować jak najwięcej zmian neurorozwojowych, postanowiłam połączyć oba typy organoidów w mózgowie organoidy fuzyjne, zawierające populacje komórkowe dwóch obszarów mózgu, najważniejszych w neuropatologii HD. Różnicowanie do organoidów kory mózgowej i prążkowiec przeprowadziłam odpowiednio dzięki dodaniu do pożywki NI chemicznych inhibitorów (*cycA*) lub aktywatorów (SAG i IWP2) ścieżki sygnałowej SHH (ang. *Sonic Hedgehog*) (**Materiały 3.2.2.4**). Po 10

dniach różnicowania z wymienionymi związkami niskocząsteczkowymi, wykonałam fuzję pewnej części wygenerowanych organoidów (**Metody 3.2.3.3**). Fuzję wykonałam osobno dla każdej linii organoidów – 21Q, 33Q, 71Q, 77Q oraz 109Q. Schemat hodowli organoidów mózgowych z ludzkich komórek iPSC oraz obraz zawartych w nim regionów embrionalnego przodomózgowia przedstawiłam na **Rysunku 2**. Aby zaobserwować bardzo wczesne zmiany neurorozwojowe w mózgu HD, jako koniec dojrzewania i hodowli organoidów ustanowiłam dzień 60. Organoidy w takim stadium rozwojowym zawierają potencjalnie największą ilość różnych populacji komórkowych charakterystycznych dla mózgu embrionalnego (Mulder et al., 2023). Umożliwia to identyfikację potencjalnie większej liczby zmian neurorozwojowych w organoidach JOHD.

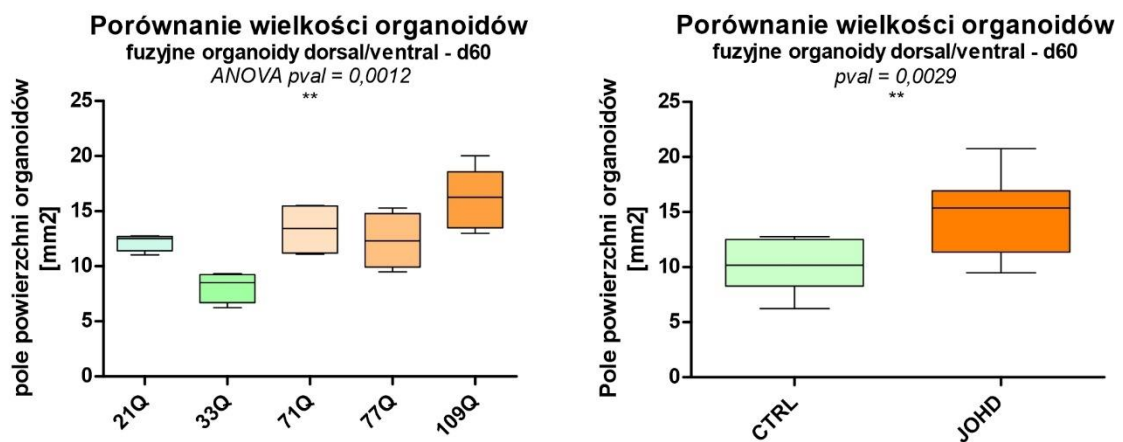


Rysunek 2. Schemat generowania fuzyjnych organoidów mózgowych oraz obraz zawartych w nim regionów odpowiadających embrionalnemu przodomózgowiu. (A) Fuzję wykonano w kropli Matrigelu (Corning). **(B)** Fuzyjne organoidy mózgowie zawierają populacje komórek kory nowej oraz komórek GE dających początek późniejszemu prążkowiowi. Fuzyjne organoidy mózgowie odzwierciedlają procesy migracji interneuronów w układzie korowo-prążkowiowym. Związek niskocząsteczkowy *cycA*, promuje różnicowanie w kierunku komórek kory mózgowej (gradient zaznaczony kolorem czerwonym) i ekspresję markerów *TBR1* i *PAX6*. Związki niskocząsteczkowe *SAG* oraz *IWP2*, promują różnicowanie w kierunku komórek GE (gradient zaznaczony kolorem zielonym) i ekspresję markerów *GSX2*, *DLX2* i *NKX2.1*.

3.2.1.2. Rosnące, fuzyjne organoidy mózgowe JOHD osiągają większe rozmiary od organoidów kontrolnych

Na początku oceniłam morfologię uzyskanych organoidów poprzez wykonanie zdjęć mikroskopowych (**Rysunek 3A**) i porównanie wielkości między fuzyjnymi organoidami JOHD a organoidami kontrolnymi (**Rysunek 3B**) po 60 dniach hodowli. W wyniku pomiarów pól powierzchni (**Metody 3.2.3.7**) każdego organoidu wykazałam, że organoidy 109Q osiągały istotnie większe rozmiary w porównaniu do kontrolnych organoidów 21Q i 33Q. Podobnie organoidy 77Q były również istotnie większe niż organoidy kontrolne 33Q. Zbiorczo, organoidy JOHD rosły do istotnie większych rozmiarów w porównaniu do organoidów kontrolnych ($p_{\text{val}} = 0,0029$). Biorąc pod uwagę ten sam wiek wszystkich organoidów, zwiększony rozmiar organoidów JOHD, w szczególności linii 109Q, może świadczyć o wzmożonej proliferacji komórek w organoidach HD. Może być to również ściśle związane z rezultatami uzyskanymi we wcześniej opisanych wynikach, dotyczących obniżenia ekspresji genów odpowiedzialnych za apoptozę w komórkach 109Q iPSC. Obniżenie aktywności apoptozy może prowadzić do zaburzenia równowagi pomiędzy proliferacją a różnicowaniem komórek.

Wykonane przeze mnie pomiary podkreśliły również aspekt dużego zróżnicowania wielkości organoidów (heterogenności), która ma swoje odzwierciedlenie w istotnej różnicy rozmiarów pomiędzy organoidami kontrolnymi 21Q a 33Q. Organoidy JOHD nie wykazały istotnej różnicy w wielkości pomiędzy genotypami, ale charakteryzowały się większym zróżnicowaniem rozmiaru w obrębie organoidów z tej samej linii JOHD.

A**B**

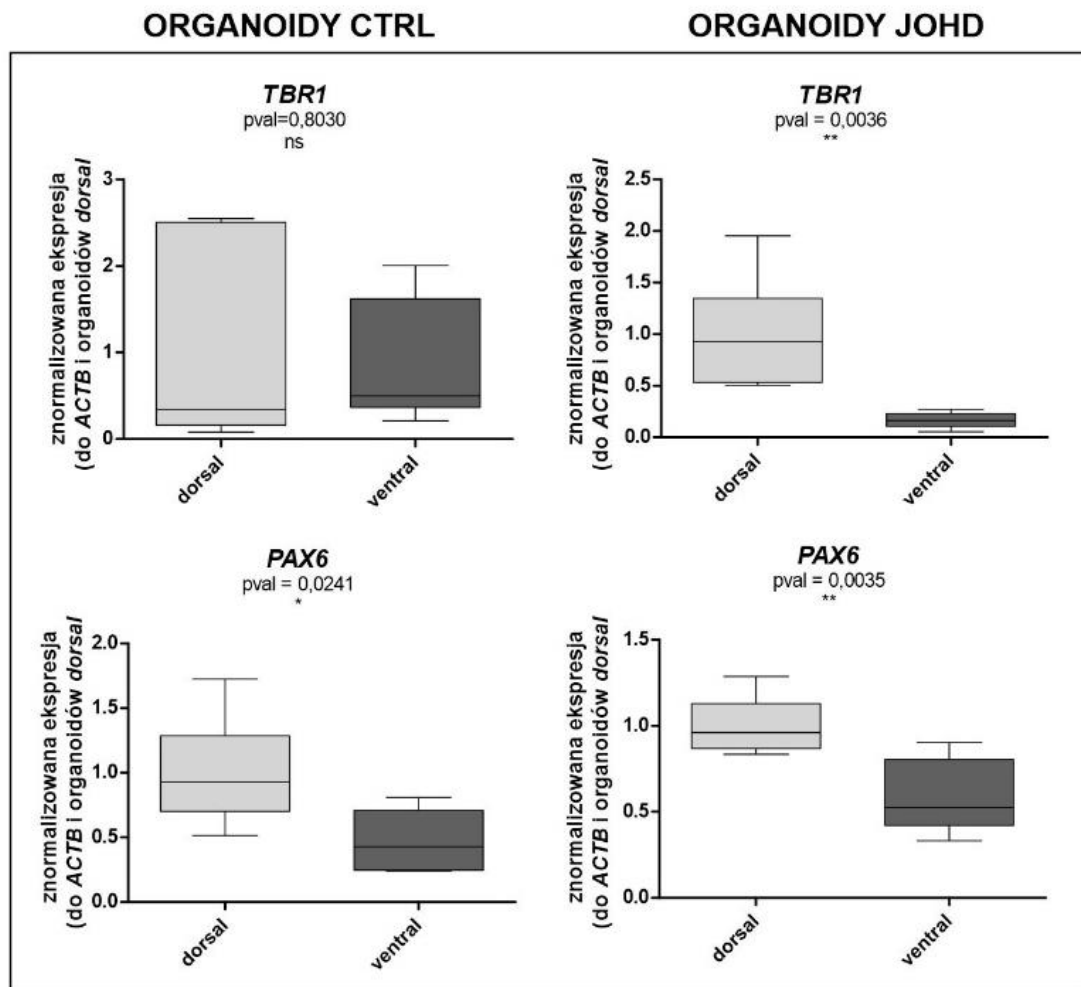
Rysunek 3. Porównanie wielkości pomiędzy 60-dniowymi organoidami JOHD, a organoidami kontrolnymi. (A) Mikroskopowe zdjęcia 60-dniowych fuzyjnych organoidów JOHD oraz organoidów kontrolnych. (B) Wykres po stronie lewej przedstawia pola powierzchni organoidów [mm²], których wartości zostały naniesione na dla każdej linii organoidów osobno. Wykres przedstawia zgrupowane wartości dla 4 powtórzeń biologicznych ±SEM. Wykres po stronie prawej przedstawia pola powierzchni organoidów [mm²] zbiorczo dla organoidów kontrolnych 21Q i 33Q i zbiorczo dla organoidów JOHD 71Q, 77Q i 109Q; ±SEM. Zastosowane testy statystyczne to odpowiednio jednokierunkowa ANOVA z poprawką post-hoc

Bonferonniego (wykres po lewej stronie) oraz t-test dla prób niezależnych (wykres po prawej stronie).

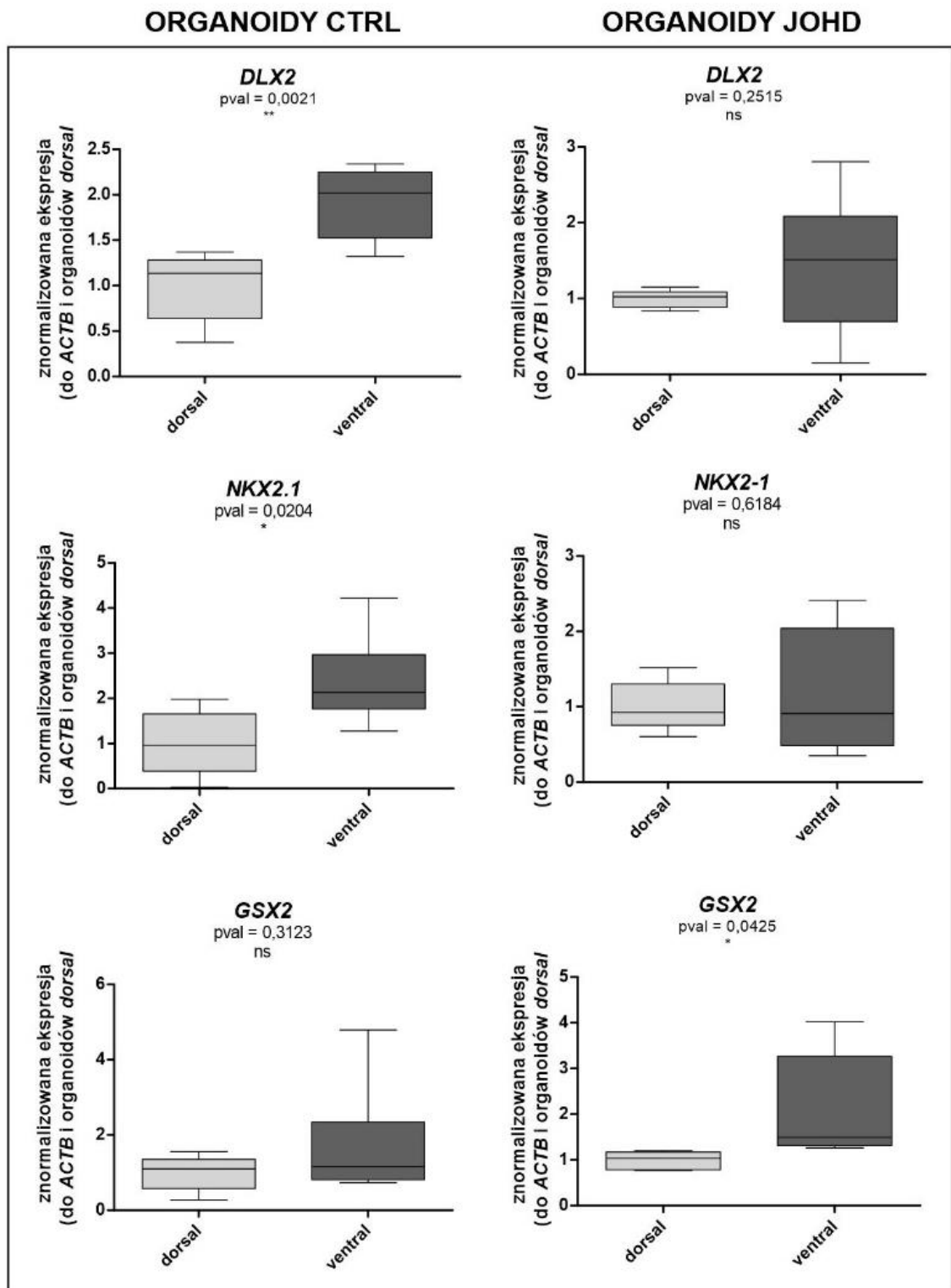
3.2.1.3. Mózgowe organoidy dorsal, ventral oraz fuzyjne, wykazują ekspresję markerów charakterystycznych dla wczesnego rozwoju przodomózgowia

W celu potwierdzenia efektywności różnicowania organoidów do wybranych struktur i populacji komórkowych przodomózgowia, wykonałam eksperymenty qPCR i porównałam ekspresję mRNA markerów kory mózgowej (*TBR1* i *PAX6*) i markerów wyniosłości zwojowych (*NKX2.1*, *DLX2* i *GSX2*) pomiędzy wygenerowanymi 60-dniowymi organoidami grzbietowymi (*dorsal*) i brzuszными (*ventral*) przodomózgowia dla linii JOHD i linii kontrolnych (**Rysunek 4 i 5**). Następnie, aby ocenić czy organoidy fuzyjne wykazują obecność dojrzałych neuronów i populacji komórkowych charakterystycznych dla wczesnego przodomózgowia, przeprowadziłam barwienie immunofluorescencyjne na szereg markerów neuronalnych (**Rysunek 6**). Wykazałam obecność markerów białkowych strefy komorowej i podkomorowej rozwijającej się kory mózgowej: odpowiednio białek *TBR1* i *PAX6*. Wykryłam również obecność markerów białkowych dla przyśrodkowych i ogonowych interneuronów zwojowych wzgórza (ang. *medial/lateral ganglionic eminence*, MGE/LGE), odpowiednio białek *NKX2.1* i *DLX2* oraz *GSX2*, odpowiedzialnych za rozwój prążkowiec i migrację interneuronów do różnych obszarów mózgu podczas rozwoju zarodka. Ponadto, dzięki immunobarwieniu fluorescencyjnemu przeciwciałami skierowanymi na NEFH, SMI-32 oraz MAP2, potwierdziłam obecność dojrzałych neuronów w fuzyjnych organoidach przodomózgowia (**Rysunek 6**). Obecność białka nestyny (*NES*) w organoidach, wskazało na obecność populacji komórek NSC, które są charakterystyczne dla mózgu embrionalnego. Przedstawione na **Rysunkach 4-6** wyniki potwierdzają, że przeprowadziłam efektywne różnicowanie ludzkich komórek iPSC do organoidów zawierających populacje rozwijającego się przodomózgowia. Podsumowując, wygenerowane przeze mnie organoidy mózgowe mogą służyć jako model

do badania wczesnych zmian neurorozwojowych zachodzących w populacjach neuronalnych kluczowych w neuropatogenezie JOHD.

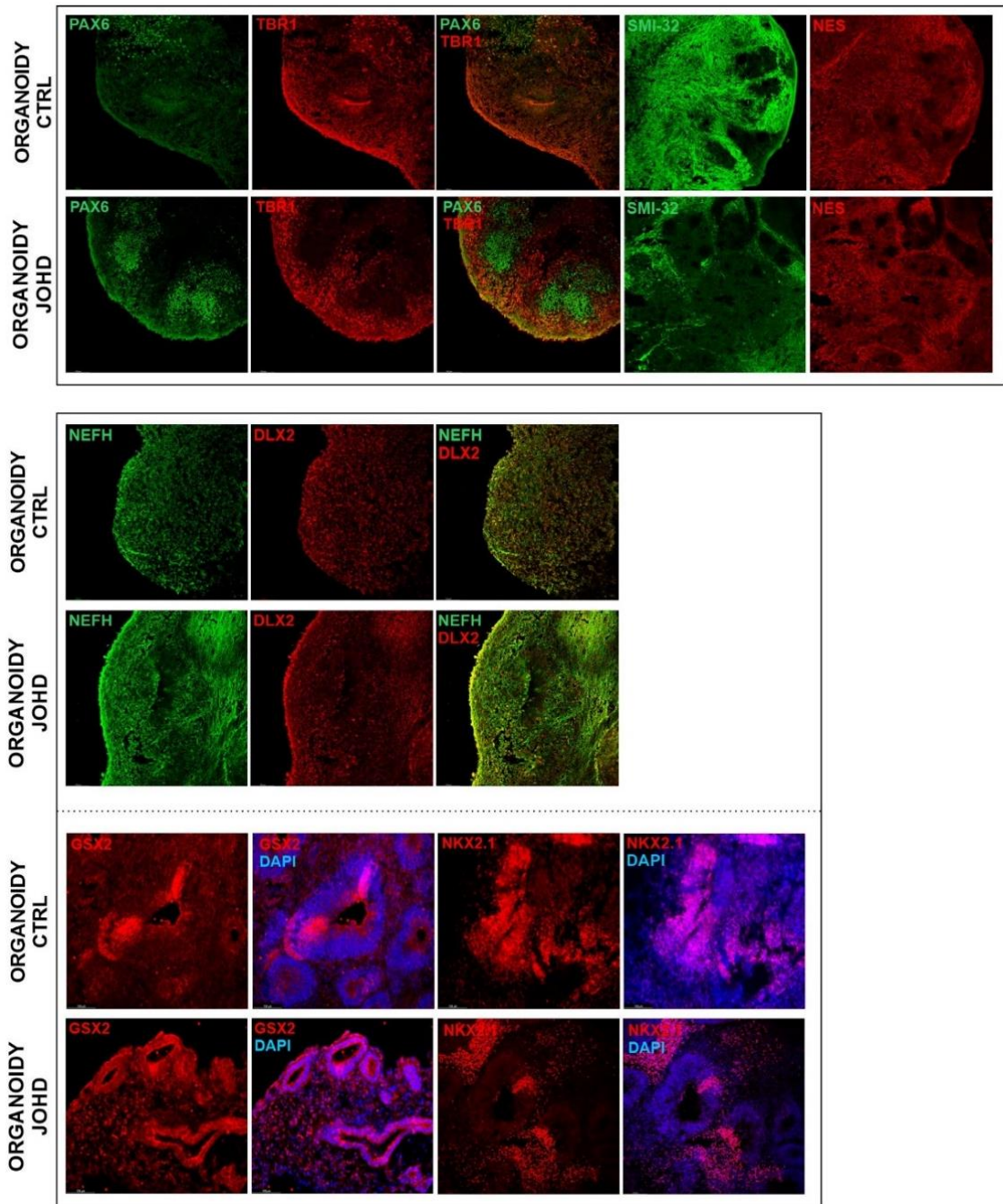


Rysunek 4. 60-dniowe organoidy mózgowe *dorsal* i *ventral*, JOHD oraz kontrolne, wykazują ekspresję markerów strony grzbietowej (kory mózgowej) rozwijającego się przodomózgowia. Wykresy przedstawiają znormalizowany poziom ekspresji markerów *TBR1* i *PAX6* dla kontrolnych i JOHD organoidów *dorsal* i *ventral*. Wykresy zostały wykonane w programie GraphPad. Wykresy przedstawiają zgrupowane wartości dla 6 powtórzeń biologicznych \pm SEM. Zastosowany test statystyczny to t-test dla prób niezależnych.



Rysunek 5. 60-dniowe organoidy mózgowie *dorsal* i *ventral*, JOHD oraz kontrolne, wykazują ekspresję markerów strony brzusznej rozwijającego się przodomózgowia. Wykresy przedstawiają znormalizowany poziom ekspresji markerów *DLX2*, *NKX2.1* oraz *GSX2* dla kontrolnych i JOHD organoidów *dorsal* i *ventral*. Wykresy zostały wykonane w programie

GraphPad. Wykresy przedstawiają zgrupowane wartości dla 6 powtórzeń biologicznych \pm SEM. Zastosowany test statystyczny to t-test dla prób niezależnych.



Rysunek 6. Barwienie immunofluorescencyjne (IF) 60-dniowych fuzyjnych organoidów mózgowych wykazało obecność markerów strony grzbietowej i brzusznej rozwijającego się przodomózgowia zarówno w organoidach JOHD jak i organoidach kontrolnych. Barwienie zostało wykonane na markery kory mózgowej (TBR1 and PAX6), markery populacji komórek GE (DLX2, NKX2.1 oraz GSX2) marker populacji NSCs (NES) oraz na markery dojrzałych

neuronów (SMI-32, NEFH). Wizualizację skrawków przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

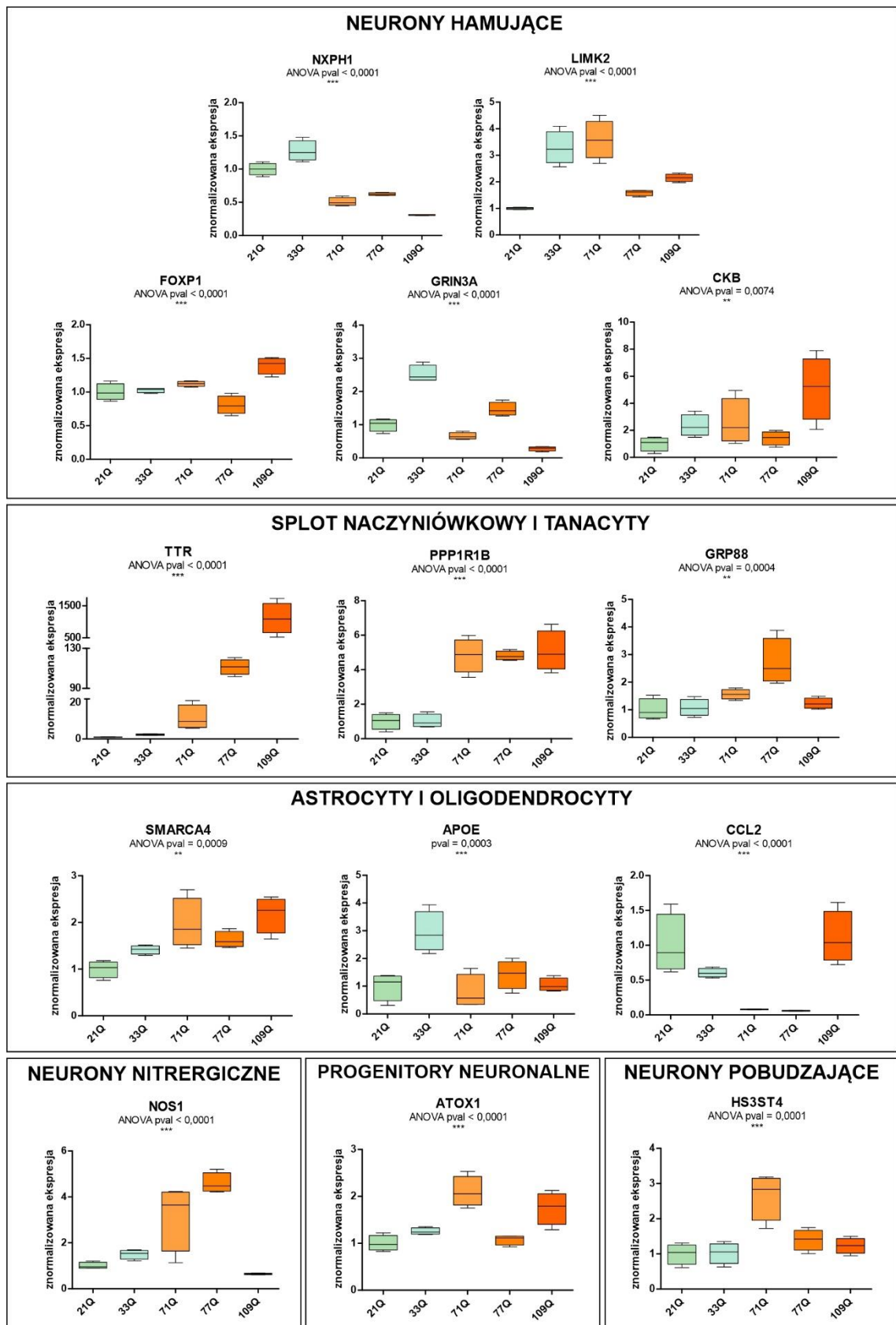
3.2.1.4. Markery specyficznych populacji komórkowych mózgu wykazują zmienioną ekspresję w 60-dniowych fuzyjnych organoidach mózgowych JOHD w porównaniu do organoidów kontrolnych

Przeanalizowałam ogólnodostępne dane pochodzące z sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek (scRNA-seq) i wyselekcjonowałam markery populacji komórek neuronalnych i nieneuronalnych obecnych w rozwijającym się ludzkim mózgu. Następnie, zbadałam ekspresję wybranych genów w 60-dniowych fuzyjnych organoidach mózgowych JOHD i organoidach kontrolnych za pomocą metody qPCR (**Rysunek 7**). Wyselekcjonowane geny były markerami określonych populacji komórkowych obecnych w ludzkim mózgu, takich jak neurony hamujące i pobudzające, astrocyty i oligodendrocyty, tanacyty, splot naczyńnkowy, neurony nitrergiczne, czy progenitory neuronalne.

Zidentyfikowałam zmienioną ekspresję pięciu markerów różnych populacji neuronów hamujących w organoidach JOHD w porównaniu do organoidów kontrolnych. Dwa z nich, geny *LIMK2* i *CKB*, wykazały podwyższoną ekspresję we wszystkich organoidach JOHD. Gen *LIMK2* reguluje dynamikę cytoszkieletu aktynowego i plastyczność synaptyczną, a jego deregulacja jest silnie związana z neuropatologią choroby Alzheimera i choroby Parkinsona (Cuberos et al., 2015). Natomiast, gen *CKB* reguluje homeostazę energetyczną komórki i odgrywa ważną rolę w neurogenezie. Został on również opisany jako jeden z genów ryzyka autyzmu (Yang and Shcheglovitov, 2020). Inny wybrany marker neuronów hamujących, gen *NXPH1*, wykazał istotne obniżenie ekspresji we wszystkich liniach JOHD. Gen ten koduje białko neureksofilinę-1, białko biorące udział w synaptogenezie, które tworzy ścisły kompleks z białkami promującymi adhezję między dendrytami i aksonami. Ta adhezja jest kluczowym czynnikiem integralności synaptycznej, której

utrata jest cechą charakterystyczną kilku chorób neurodegeneracyjnych, takich jak AD (Saykin et al., 2010). Następnie, skupiłam się na analizie ekspresji wybranych markerów splotu naczyniówkowego i tanacytów. Najciekawszym z deregulowanych genów, o podwyższonej ekspresji we wszystkich organoidach JOHD był gen *TTR*, kodujący transtyretynę (inaczej prealbuminę), czyli białko wiążące i rozprowadzające hormony tarczycy we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym (Alshehri et al., 2020). Gen *TTR* ulega ekspresji głównie w komórkach nabłonka splotu naczyniówkowego, co czyni go najlepszym możliwym markerem ChP. W kontekście neuropatogenezy HD był to wynik szczególnie ważny, ponieważ komory mózgu są obszarem istotnie powiększonym u osób chorych. Podwyższenie ekspresji genu *TTR* zostało już wcześniej opisane dla mysich modeli AD (Stein and Johnson, 2002). Badania sugerują również, że białko TTR odgrywa rolę ochronną w neuropatologii AD ze względu na jego zdolność do wiązania toksycznych agregatów amyloidogennych (Buxbaum et al., 2008). Gen *PPP1R1B*, marker tanacytów, również wykazał istotne obniżenie ekspresji we wszystkich liniach JOHD w porównaniu do linii kontrolnej 21Q. Białko DARPP-32, kodowane przez gen *PPP1R1B*, odgrywa kluczową rolę w integracji transdukcji sygnału w neuronach dopaminoceptywnych prądkowia i pełni rolę regulacyjną w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) (Lin et al., 2021). Inny marker tanacytów, gen *GPR88*, miał podwyższony poziom ekspresji we wszystkich badanych liniach JOHD. Kodowanym przez niego białkiem jest neuronalny receptor mózgowy sprzężony z białkiem G (GPCR), który związany jest z różnymi zaburzeniami psychicznymi (Massart et al., 2016). W grupie genów markerowych dla astrocytów i oligodendrocytów, tylko jeden gen miał podwyższoną ekspresję we wszystkich organoidach JOHD – gen *SMARCA4*. Deregulacja tego aktywatora transkrypcji została niedawno ustalona dla kory P0 myszy HdhQ7/Q111 (Capizzi et al., 2022). Ekspresja genu *ATOX1*, markera progenitorów komórek neuronalnych oraz genu *H3ST4*, markera neuronów pobudzających, również była wyższa we wszystkich organoidach JOHD w porównaniu z organoidami kontrolnymi. Wśród

wszystkich wybranych markerów było kilka, które nie wykazywały spójnej deregulacji we wszystkich analizowanych organoidach JOHD, lecz kierunek zmian ekspresji różnił się między różnymi liniami JOHD. Na przykład, ekspresja genu *CCL2* wskazała na obniżenie ekspresji w organoidach 71Q i 77Q i jednocześnie na lekkie podwyższenie ekspresji w organoidach 109Q, w porównaniu do kontrolnej linii 21Q. Odwrotny wynik uzyskałam dla genu *NOS1*, markera hamujących neuronów nitrergicznych, który wykazał podwyższenie ekspresji w organoidach 71Q i 77Q oraz obniżenie ekspresji w linii 109Q.

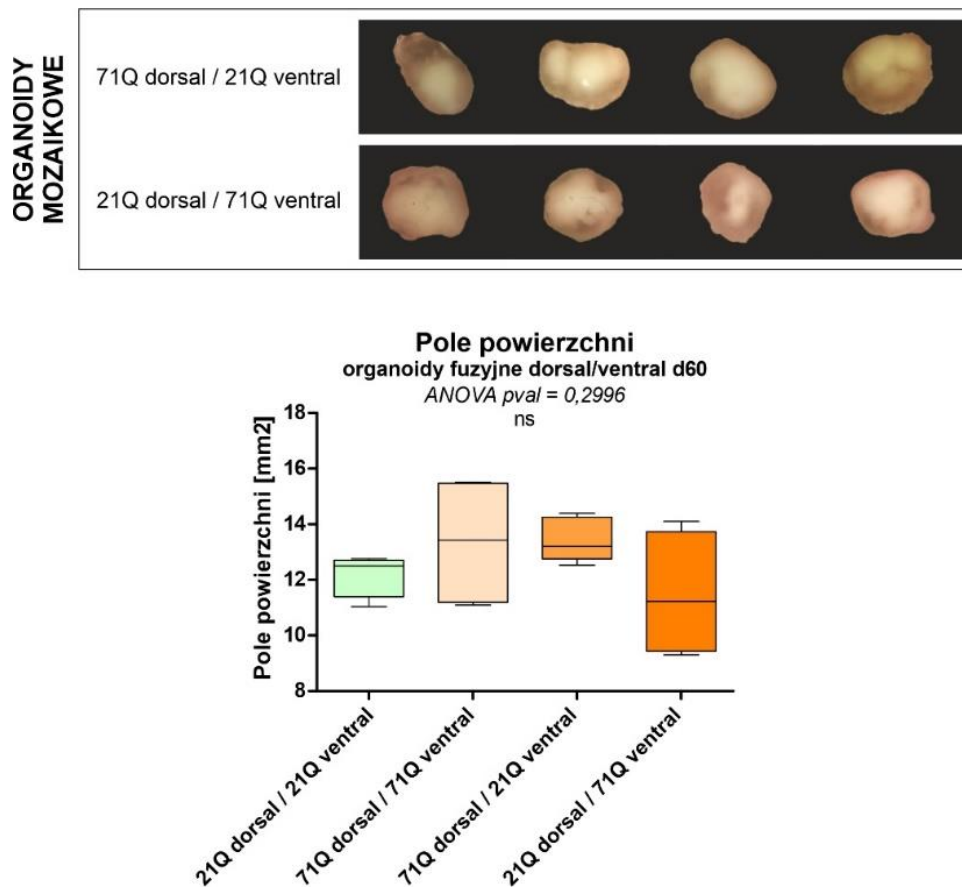


Rysunek 7. Wykresy dla markerów wybranych typów neuronalnych i nie-neuronalnych populacji komórkowych, wykazujące zmienione poziomy ekspresji w 60-dniowych fuzyjnych organoidach mózgowych JOHD. Wybranych zostało czternaście genów do analizy

DE (ang. *differential expression*, DE) w próbkach cDNA uzyskanych z 60-dniowych fuzyjnych organoidów mózgowych. Wyniki dla każdego analizowanego genu są prezentowane jako wykres znormalizowanej ekspresji (w stosunku do genu referencyjnego ACT β , a następnie do organoidów kontrolnych 21Q). Wykresy zostały wykonane w programie GraphPad. Wykresy przedstawiają zgrupowane wartości dla 3 powtórzeń biologicznych \pm SEM. Zastosowany test statystyczny to jednokierunkowa ANOVA z poprawką post-hoc Bonferonniego.

3.2.1.5. Wygenerowanie 60-dniowych organoidów mozaikowych, powstałych przez fuzję organoidów JOHD z organoidami kontrolnymi

Chcąc stworzyć model do badań nad zaangażowaniem poszczególnych struktur mózgu w neuropatogenezę JOHD i nad zależnościami poziomu prawidłowej i zmutowanej huntingtyny w określonych obszarach rozwijającego się mózgu JOHD, przeprowadziłam fuzję organoidów *dorsal* lub *ventral* linii 71Q JOHD z organoidami *dorsal* lub *ventral* 21Q i stworzyłam fuzyjne organoidy mozaikowe. Uzyskane 60-dniowe fuzyjne organoidy mozaikowe 21Q *dorsal/71Q ventral* oraz 71Q *dorsal/21Q ventral*, miały taką samą morfologię makroskopową jak wcześniej wygenerowane fuzyjne organoidy 71Q oraz organoidy 21Q (**Rysunek 8**). Organoidy mozaikowe 71Q *dorsal/21Q ventral* były nieznacznie większe od organoidów kontrolnych 21Q i wykazywały większą homogenność pod względem wielkości w porównaniu do organoidów 71Q.

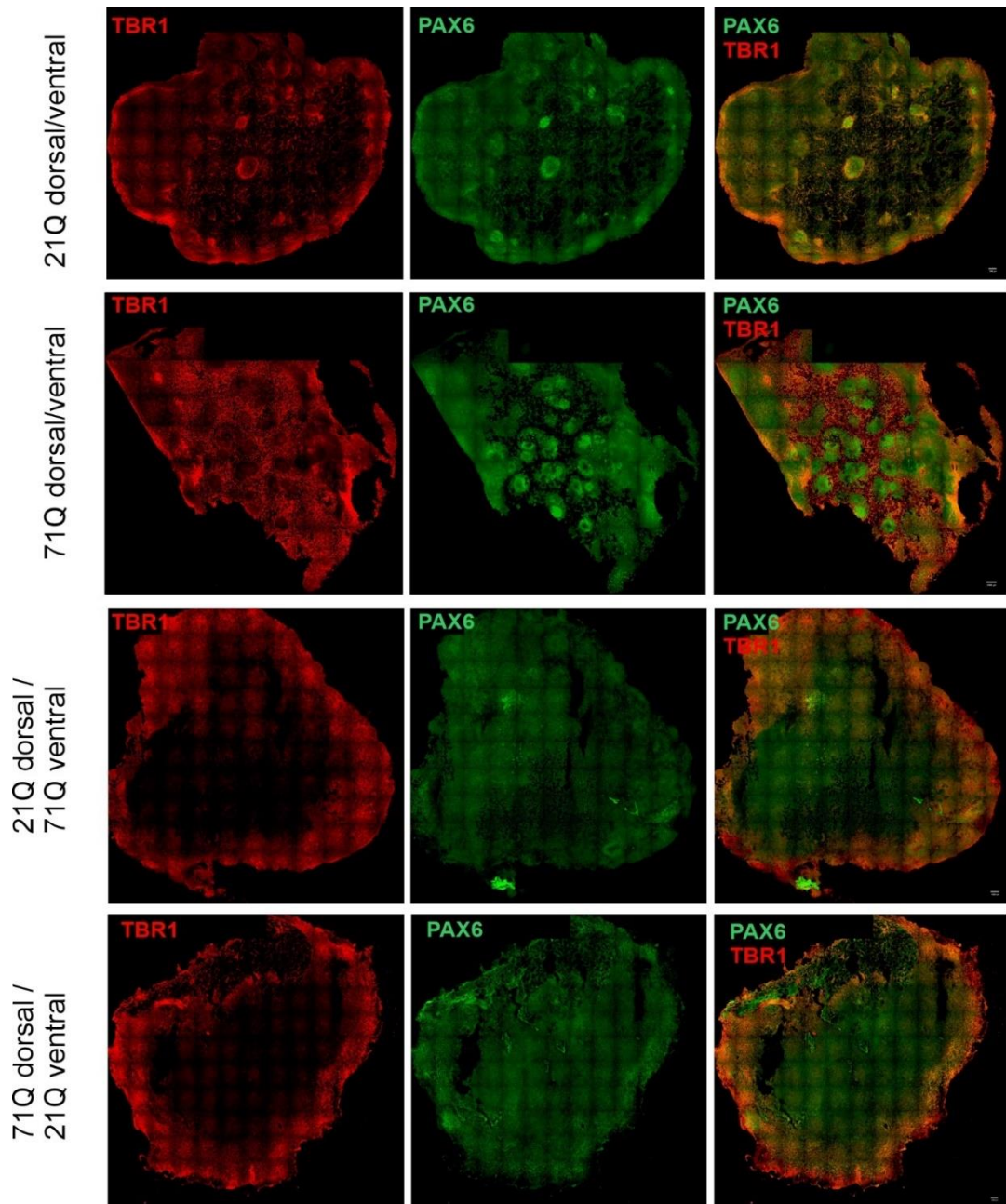


Rysunek 8. Ocena morfologii oraz rozmiaru wygenerowanych organoidów mozaikowych. Rysunek przedstawia zdjęcia 60-dniowych fuzyjnych organoidów mozaikowych oraz pola powierzchni tych organoidów [mm²]. Wykres przedstawia zgrupowane wartości dla 4 powtórzeń biologicznych organoidów mozaikowych oraz wartości dla 4 powtórzeń biologicznych fuzyjnych organoidów 71Q oraz 21Q; ±SEM. Zastosowany test statystyczny to jednokierunkowa ANOVA z poprawką post-hoc Bonferonniego.

3.2.1.6. Fuzyjne organoidy JOHD charakteryzują się większą ilością rozet neuronalnych w porównaniu do organoidów kontrolnych oraz organoidów mozaikowych

Dzięki eksperymentom immunobarwienia fluorescencyjnego wykazałam, że fuzyjne organoidy JOHD 71Q posiadają widocznie większą liczbę rozet neuronalnych w porównaniu do fuzyjnych organoidów 21Q oraz w porównaniu do organoidów mozaikowych (**Rysunek 9**). Rozety neuronalne to struktury odzwierciedlające etap pośredni pomiędzy komórkami macierzystymi, a wyspecjalizowanymi neuronami. Uzyskany przeze mnie wynik wskazuje na wciąż bardzo aktywne procesy proliferacji i produkcji komórek progenitorowych w organoidach 71Q, co może być

ściśle skorelowane z omówionym wcześniej wynikiem dotyczącym większych rozmiarów organoidów JOHD w porównaniu do kontroli. Wzmoczona proliferacja w organoidach 71Q może być wynikiem nieprawidłowego dojrzewania lub nieprawidłowej migracji komórek. To z kolei może powodować rozwojowe zatrzymanie się organoidów JOHD na etapie migracji komórek ze strefy VZ do strefy podpłytkowej (ang. *subplate zone*, SP) tworzącej się kory mózgowej (Conforti et al., 2018). Zbliżona morfologia organoidów mozaikowych do organoidów kontrolnych 21Q może świadczyć o istotnym wpływie zwiększonej ilości niezmutowanego białka HTT w określonych populacjach przedomózgowia na dalszy rozwój mózgu i modyfikację przebiegu neuropatogenezy HD. Uzyskany przeze mnie wynik sugeruje, że fuzyjne organoidy mozaikowe są kolejnym modelem komórkowym 3D odpowiednim do badania przebiegu wczesnej neuropatogenezy HD, który może potencjalnie wskazać zaburzenia nieobserwowane w fuzyjnych organoidach JOHD.

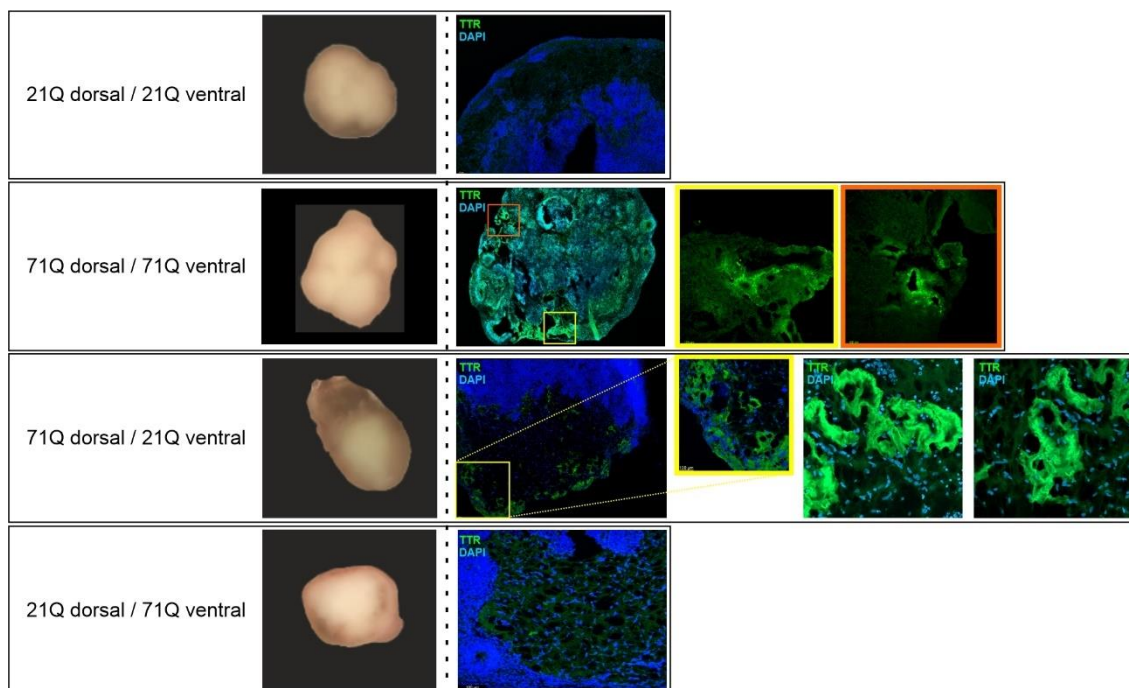


Rysunek 9. Barwienie immunofluorescencyjne (IF) 60-dniowych fuzyjnych organoidów mózgowych. Barwienie zostało wykonane na markery TBR1 i PAX6, markery dwóch stref proliferacyjnych kształtującej się kory mózgowej (odpowiednio VZ i SVZ). Wizualizację skrawków przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

3.2.1.7. Fuzyjne organoidy 71Q wykazują zwiększoną ilość białka TTR w porównaniu do organoidów kontrolnych 21Q oraz organoidów mozaikowych

W kolejnych eksperymentach skupiłam się na dalszej charakterystyce istotnie zmienionego we wszystkich organoidach JOHD

markera splotu naczyniówkowego, TTR. Wykonałam eksperymenty immunobarwienia fluorescencyjnego (**Rysunek 10**) i wykazałam obecność dużej ilości białka TTR w fuzyjnych organoidach 71Q oraz braku sygnału tego białka w organoidach kontrolnych 21Q. Wynik ten wspiera rezultaty wcześniejszych analiz qPCR i porównanie ekspresji genu *TTR* pomiędzy organoidami tych samych linii (21Q i 71Q). Dzięki eksperymentom IF zidentyfikowałam również obecność białka TTR w fuzyjnych organoidach mozaikowych 71Q *dorsal*/21Q *ventral* i 21Q *dorsal*/71Q *ventral*. Ilość białka TTR w organoidach mozaikowych była jednak widocznie mniejsza w porównaniu do fuzyjnych organoidów 71Q. Uzyskane przeze mnie rezultaty wspierają wcześniejszy wynik dotyczący podwyższonej ekspresji genu *TTR* w liniach JOHD (w tym w linii 71Q).

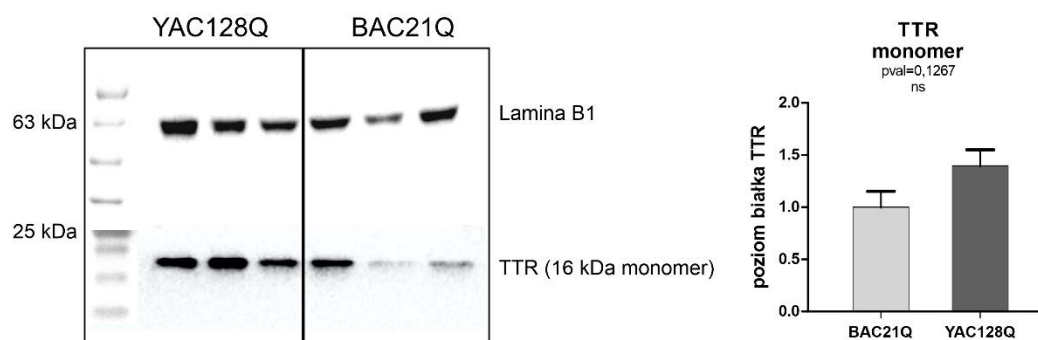


Rysunek 10. Immunobarwienie fluorescencyjne (IF) białka TTR w 60-dniowych fuzyjnych organoidach mózgowych. Wizualizację skrawków przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

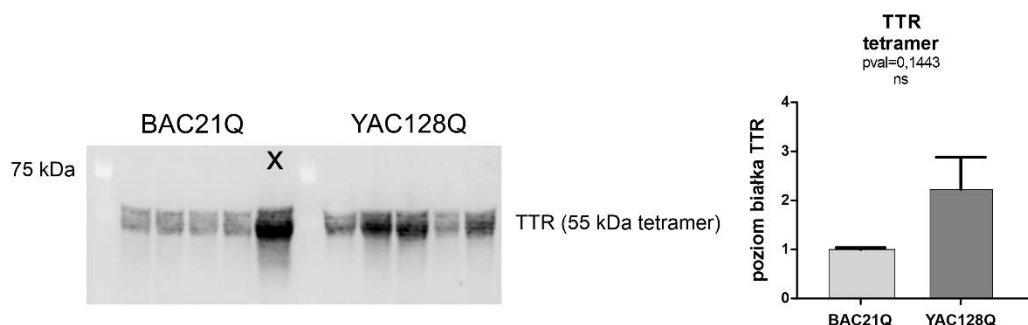
3.2.1.8. Podwyższony poziom białka TTR w osoczu myszy YAC^{128Q} wskazuje na istotną funkcję tego białka w patogenezie JOHD i jego potencjalną rolę jako biomarkera JOHD

W celu dalszej analizy znaczenia podwyższonej ekspresji genu *TTR* oraz zwiększonej ilości białka TTR w fuzyjnych organoidach mózgowych JOHD, wykonałam analizy Western Blot na materiale biologicznym pochodzącym z mysiego modelu Hu^{128Q/21Q}. Przeprowadziłam analizę ilościową białka TTR w osoczu krwi uzyskanym z myszy BAC^{21Q} oraz YAC^{128Q}. Zidentyfikowałam zmianę poziomu monomeru (16 kDa) oraz tetrameru (55 kDa) białka TTR w osoczu myszy YAC^{128Q} w porównaniu do myszy kontrolnych BAC^{21Q} (**Rysunek 11**). Mimo, iż zaobserwowane podwyższenie poziomu tego białka nie jest istotne statystycznie, wspiera ono wyniki, które uzyskałam w eksperymentach qPCR oraz IF przeprowadzonych na fuzyjnych organoidach mózgowych.

A



B



Rysunek 11. Analiza western blot, porównująca ilość białka TTR w osoczu pomiędzy myszami YAC^{128Q} i BAC^{21Q}. (A) Poziom monomeru białka TTR (16 kDa) został znormalizowany do poziomu białka referencyjnego LAMIN B1. Wykres został wykonany w programie GraphPad. Zastosowany test statystyczny to t-test dla prób niezależnych (n=3). (B) Poziom tetrameru białka TTR (55 kDa) został znormalizowany do całkowitej ilości białka w

ścieżce wybarwionej roztworem Ponceau S. Wykres został wykonany w programie GraphPad. Zastosowany test statystyczny to t-test dla prób niezależnych (n=5).

3.2.2. Materiały

3.2.2.1. Ludzkie linie komórek iPSC

Episomalne ludzkie linie HD i kontrolne iPSC zakupiono z *NINDS Human Cell and Data Repository* oraz z *Cedars-Sinai Induced Pluripotent Stem Cell Core Production Facility*. Do analiz wykorzystano trzy różne linie JOHD, z 71, 77 i 109 powtórzeniami CAG, oraz dwie różne linie kontrolne, z 21 i 33 powtórzeniami CAG.

3.2.2.2. Myszy HD

Do badań wykorzystano myszy model HD, Hu^{128Q/21Q} (Southwell et al., 2017). Model ten stworzony został na drodze krzyżowania myszy Hdh^{-/-} BAC^{21Q} z myszami Hdh^{-/-} YAC^{128Q} i późniejszego genotypowania. Utrzymywanie hodowli i rozmnażanie myszy prowadzone było w standardowych warunkach LD 12:12 (12 godzin światła i 12 godzin ciemności), z ciągłym dostępem myszy do pokarmu i wody, w zwierzętarni w Centrum Zaawansowanych Technologii (CZT) UAM w Poznaniu. Eksperymenty na myszach zostały zatwierdzone i są monitorowane przez Lokalną Komisję Etyki ds. doświadczeń na zwierzętach w Poznaniu (64/2018). Krew do analiz WB pobrano z dwóch grup eksperymentalnych, liczących 3 i 5 myszy YAC^{128Q} oraz 3 i 5 myszy BAC^{21Q}.

3.2.2.3. Oligonukleotydy

Stosowane w badaniach oligonukleotydy DNA zostały zakupione w firmie Merck Life Science Sp. z o.o. Wszystkie sekwencje przedstawiono w **Tabeli 1.**

Tabela 1. Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych do analiz.

Nazwa genu	Sekwencja startera F	Sekwencja startera R
<i>PAX6</i>	TGGGCAGGTATTACGAGACTG	ACTCCCGCTTATACTGGGCTA
<i>TBR1</i>	GCAGCAGCTACCCACATTCA	AGGTTGTCAGTGGTCGAGATA
<i>DLX2</i>	ATGCACTCGACCCAGATCG	GGCTTGGTACTGGTAGGAACC
<i>GSX2</i>	ATGTCGCGCTCCTTCTATGTC	CAAGCGGGATGAAGAAATCCG
<i>NKX2.1</i>	ATGAAGCGCCAGGCTAAGG	GGTTTGCCGTCTTTGACTAGG
<i>TTR</i>	TGGGAGCCATTTGCCTCTG	AGCCGTGGTGGAATAGGAGTA
<i>CCL2</i>	CCCCAGTCACCTGCTGTTAT	AGATCTCCTTGGCCACAATG
<i>LIMK2</i>	GAATCTGGAGGGGACACTGA	ACCTCCCCATGGATTAGGTC
<i>FOXP1</i>	ATCCCGATGTGTCTGTGTGA	GCAGTTGCACAAAAGCAAA
<i>MSTO1</i>	ATGGTGTCTGGAGGGTCAAA	GGGATGGAGATGGACTCTGA
<i>ATOX1</i>	AGGCTGTGCTGAAGCTGTCT	TCCATGCTGTGCTCAGATTC
<i>CKB</i>	ACGACGTCATCCAGACAGG	AGGTCGGTCTTGTGCTCATC
<i>APOE</i>	GGTCGCTTTTGGGATTACCT	TCCAGTTCCGATTTGTAGGC
<i>GRIN3A</i>	CCACTCCACTGGACAATGTG	GGTTTGATGGCCACTGTTCT
<i>NXP1</i>	GAGCAAGACCTCTGGGACTG	AAATGTCCCATTGCCATGAT
<i>NOS1</i>	TTGAAAAGGCCAACAATTC	TTGACCGACTGGATTTAGGG
<i>GPR88</i>	CCCGGTGTCACTCCTGTATT	GTTACGATGAAGGCGTTG
<i>PPP1R1B</i>	CAGAGGAGGAGGATGAGCTG	AGCAGACTGCCTGATGACCT
<i>HS3ST4</i>	CATCATCGGGGTCAAGAAAG	CACTCCAACCCCTTTTCGTA

3.2.2.4. Bufory, pożywki i roztwory barwiące

Pożywki do hodowli komórkowej:

Pożywka E8 do hodowli iPSCs

49 mL pożywki E8
1 mL suplementu E8

Pożywka do neurosfer (EZ)

34 mL DMEM
14,5 mL F12
1 mL suplementu B27
356 uL Glutamaxu
50 uL heparyny
100 ng/ml EGF
100 ng/ml FGF

Pożywka NI (neural induction) do organoidów grzbietowych przodomózgowia

50 mL DMEM/F12
500 uL suplementu N2
500 uL Glutamaxu
500 uL MEM-NEAA
500 uL P/S
50 uL heparyny
5 μ M cycA

Pożywka NI (neural induction) do organoidów brzusznych przodomózgowia

50 mL DMEM/F12
500 uL suplementu N2
500 uL Glutamaxu
500 uL MEM-NEAA
500 uL P/S
50 uL heparyny
2,5 μ M IWP2
100 nM SAG

Pożywka DIFF. -A (differentiation medium) bez witaminy A do organoidów

25 mL DMEM/F12
25 mL Neurobasal
500 uL suplementu B27 -A
500 uL Glutamaxu
500 uL P/S
250 uL suplementu N2
250 uL MEM-NEAA
12,5 uL insuliny

Pożywka DIFF. +A (differentiation medium) z witaminą A do organoidów

25 mL DMEM/F12
25 mL Neurobasal
500 uL suplementu B27 +A
500 uL Glutamaxu
500 uL P/S
250 uL suplementu N2
250 uL MEM-NEAA
12,5 uL insuliny

Bufory i roztwory barwiące użyte do analizy białek metodą western blot:

Bufor PB 1x do izolacji białek

60 mM Tris
0,8 g (2% w/v) SDS
4 g (10% w/v) sacharoza
Dopełniono wodą do objętości 40 mL

Bufor PB 1x z inhibitorem proteaz do izolacji białek

900 uL PB 1x
18 uL PMSF

Bufor Laemmli do elektroforezy białek 10x stężony

250 mM Tris
1,92 M glicyna
1% (w/v) SDS
Dopełniono wodą do objętości 500 mL
Do elektroforezy użyto bufor 1x – rozcieńczono wodą

Bufor TBS 10x stężony

24,2 g Tris
80 g NaCl
Dopełniono wodą do objętości 900 mL i następnie ustalono pH na 7.6
Dopełniono wodą do objętości 1 L

Bufor TBS-Tween 1x

50 mL TBS 10x
0,25 mL Tween-20 (0.05%)
Dopełniono wodą do objętości 500 mL

Bufor Towbin do elektrotransferu mokrego 10x stężony

250 mM Tris
1,92 M glicyna
Dopełniono wodą do objętości 500 mL

Bufor Towbin do elektrotransferu mokrego 1x stężony

100 mL Towbin 10x
200 mL metanol
700 mL H₂O
1 mL SDS 20%

Bufor blokujący

50 mL TBS-T 1x
2,5 g (5% w/v) mleka odtłuszczonego w proszku

Ponceau S 1x do barwienia membrany nitrocelulozowej po elektrotransferze

0,5 g (0.1% w/v) Ponceau S
15 mL (3%) kwas octowy
Dopełniono wodą do objętości 500 mL

Bufory i roztwory użyte do metody immunobarwienia fluorescencyjnego (IF):

4% paraformaldehyd do utrwalania fuzyjnych organoidów mózgowych

8 g paraformaldehyd
100 mL H₂O
Roztwór podgrzano do 60 stopni i dodano kilka kropel 1 N NaOH dla ułatwienia rozpuszczenia
Roztwór schłodzono do temperatury pokojowej i dodano 100 mL PBS 2x

10% sacharoza do odwodnienia fuzyjnych organoidów mózgowych

5 g sacharozy
Dopełniono buforem PBS do 50 mL

20% sacharoza do odwodnienia fuzyjnych organoidów mózgowych

10 g sacharozy
Dopełniono buforem PBS do 50 mL

30% sacharoza do odwodnienia fuzyjnych organoidów mózgowych

15 g sacharozy
Dopełniono buforem PBS do 50 mL

Bufor blokujący

50 mL TBS-T 1x
2 mL (4% w/v) normalnej surowicy koziej (NGS)

3.2.2.5. Przeciwciała

Stosowane w badaniach przeciwciała I-rzędowe zostały zakupione w firmach ProteinTech, Abcam, DSHB, Merck, R&D Systems, BioLegend oraz Thermo Scientific™. Wszystkie przeciwciała I-rzędowe i ich zastosowane rozcieńczenia przedstawiono w **Tabeli 2**. Stosowane w badaniach fluorescencyjne oraz chemiluminescencyjne przeciwciała II-rzędowe zostały zakupione w firmie Jackson Immunoresearch (JIR). Wszystkie przeciwciała II-rzędowe i ich zastosowane rozcieńczenia przedstawiono w **Tabeli 3**.

Tabela 2. Przeciwciała I-rzędowe wykorzystane do analiz IF oraz WB.

Nazwa przeciwciała	Nazwa firmy	Gospodarz	Rozcieńczenie do IF	Rozcieńczenie do WB
TBR1	ProteinTech	Królik	1:400	-
PAX6	DSHB	Mysz	1:20	-
NOTCH1	DSHB	Szczur	1:50	-
NEFH	DSHB	Mysz	1:50	-
NES	DSHB	Mysz	1:50	-
MAP2	DSHB	Mysz	1:50	-
GSH2	Merck	Królik	1:500	-
FOXG1	Abcam	Królik	1:400	-
DLX2	Thermo Scientific™	Królik	1:100	-
NKX2.1	R&D Systems	Królik	1:250	-
TTR	DSHB	Mysz	1:50	1:100
TTR	Proteintech	Królik	1:400	1:1000
SMI-32	BioLegend	Mysz	1:400	-
LAMIN B1	Proteintech	Mysz	-	1:2000

Tabela 3. Przeciwciała II-rzędowe wykorzystane do analiz IF oraz WB.

Nazwa przeciwciała	Nazwa firmy	Antygen	Rozcieńczenie do IF	Rozcieńczenie do WB
---------------------------	--------------------	----------------	----------------------------	----------------------------

Alexa Fluor 488	JIR	Mysie IgG (H+L)	1:1000	1:1000
Dylight 594	JIR	Królicze	1:1000	-
Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	JIR	Królicze	1:1000	-
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	JIR	Królicze IgG (H+L)	-	1:5000
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	JIR	Mysie IgG (H+L)	-	1:5000

3.2.2.6. Żele poliakrylamidowe (PAA)

- Komercyjne żele gradientowe 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels
- 12% żel rozdzielający z 5% żelem zagęszczającym, typu SDS-PAGE:

Żel rozdzielający:

1,6 mL H₂O
2 mL 30% akrylamid w stosunku 29:1
1,3 mL 1.5M Tris-HCl, pH 8,8
0,05 mL 10% SDS
0,05 10% APS
0,002 mL TEMED

Żel zagęszczający:

1,4 mL H₂O
0,33 mL 30% akrylamid w stosunku 29:1
0,25 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8
0,02 mL 10% SDS
0,02 mL 10% APS
0,002 mL TEMED

3.2.2.7. Wzorce wielkości

Do analiz w żelach PAA wykorzystano marker wielkości Perfect™ Tricolor Protein Ladder (EURx).

3.2.2.8. Ważniejsze odczynniki wykorzystywane do badań

- Geltrex™ LDEV-Free, hESC-Qualified, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Gibco™, ThermoFisher Scientific)

- HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis Biodyne)
- Ribonuclease inhibitor (EURx)
- Oligo(dT)20 Primers (EURx)
- Random Hexamer Primers (EURx)
- 10 mM Ultrapure dNTPs mix (EURx)
- Nuclease-free water, not DEPC treated (EURx)
- Normal Goat Serum (JIR)
- 4x SDS Sample Buffer (Merck)
- Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X) (ThermoFisher Scientific™)
- Cyclopamine A (cycA) (Biogems)
- IWP-2 (Biogems)
- Smoothened agonist (SAG) (Biogems)
- Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix (Merck)
- FGF basic (ORF Genetics)
- EGF (ORF Genetics)
- Hoechst 33342 Solution (ThermoFisher Scientific™)

3.2.2.9. Komeracyjnie dostępne zestawy (kity) wykorzystywane w badaniach

- Maxima Reverse Transcriptase (200U/uL) (ThermoFisher Scientific™)
- ECL - SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific™)

3.2.3. Metody

3.2.3.1. Hodowla indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC)

Ludzkie komórki iPSC hodowano w chemicznie zdefiniowanych warunkach w komercyjnie dostępnej pożywce E8 (Essential 8, Thermo Scientific™). Komórki hodowano na powierzchni opłaszczonyj macierzą komórkową (Geltrex™ LDEV-Free, hESC-Qualified, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, Thermo Scientific™) Komórki pasażowano poprzez delikatną dysocjację z 0,5 mM EDTA w PBS.

3.2.3.2. Hodowla neurosfer

Neurosferę wygenerowano poprzez delikatną dysocjację kolonii komórek iPSC, z 0,5 mM EDTA w PBS, do stanu agregatów wielokomórkowych i umieszczeniu ich bezpośrednio w pożywce wzrostowej dla progenitorów neuronalnych bogatej w suplement B27 (ThermoFisher Scientific™), 100 ng/mL podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, ORF Genetics), 100 ng/mL naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ORF Genetics) oraz 5 ug/mL heparyny (Merck). Komórki hodowano na szalkach opłaszczonych poly-HEMA (Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) zapewniającą nieadherentne warunki hodowli neurosfer.

3.2.3.3. Hodowla organoidów mózgowych 3D

Opierając się na opublikowanym już protokole hodowli fuzyjnych organoidów mózgowych (Bagley et al., 2017), dostosowaliśmy procedurę generowania takich grzbietowo-brzusznym organoidów przodomózgowia z ludzkich komórek iPSC poprzez etap hodowli neurosfer (Ebert et al., 2013). Przez pierwsze 24 h, uzyskane z komórek iPSC neurosfery utrzymywane były w pożywce E8 z dodatkiem inhibitora ścieżki ROCK, Y-2736 (Tocris). Drugiego dnia, pożywkę E8 zmieniono na pożywkę dedykowaną neurosferom (DMEM, F12, 2% B27-A, 1% penicylina/streptomycyna, 0.5% Glutamax, 0.1% heparyna) z czynnikami wzrostu, bFGF i EGF (ORF Genetics). Po 5-7 dniach hodowli i zmianie pożywki co 2 dni, neurosfery poddano mechanicznemu pasażowi z wykorzystaniem urządzenia McIlwain Tissue Chopper (model TC752, Campden Instruments), w którym zawieszono neurosfer cięto w odstępach co 150 µm. Następnie, po kolejnych 4-5 dniach hodowli, neurosfery uzyskane z każdej linii rozdzielono na dwie szalki i rozpoczęto ukierunkowane różnicowanie do strony brzusznej (populacje komórek GE tworzące późniejsze prążkowie) lub grzbietowej (kora mózgowa) przodomózgowia. W tym celu, zmieniono pożywkę na pożywkę do indukcji neuronalnej wzbogaconej o cykloпамinę A (cycA) w stężeniu 5 µM dla neurosfer przeznaczonych do różnicowania w organoidy grzbietowe lub wzbogaconej o związek niskocząsteczkowy IWP2 (w stężeniu 2.5 µM) oraz

SAG (w stężeniu 100 nM) dla neurosfer przeznaczonych do różnicowania w organoidy brzuszne. Kolejne etapy różnicowania, fuzji oraz dojrzewania organoidów prowadzone były zgodnie z publikacją źródłową (Bagley et al., 2017). Fuzyjne grzbietowo-brzuszne organoidy mózgowie HD, kontrolne oraz mozaiki zebrane zostały w dniu 60-tym hodowli do dalszych analiz, obejmujących sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek, analizy qPCR oraz barwienie immunofluorescencyjne.

3.2.3.4. Analiza Western Blot

Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących wykonano w żelach poliakrylamidowych zawierających SDS. Do badań zastosowano komercyjnie dostępne żele gradientowe 4-20% o wymiarach 8,5x8 cm (BIO-RAD) lub przygotowywane w laboratorium żele 12%. Próby białkowe denaturowano przez 5 min w 95°C z 4 x stężonym buforem obciążającym zawierającym SDS (4x Sample Buffer), a następnie po 2-minutowej inkubacji na lodzie próby nakładano na żel. Rozdział prowadzono w buforze do elektroforezy białek 1x Laemmli przez 15 min przy napięciu 90 V dla żelu zagęszczającego, a następnie przez 15-45 min przy napięciu 200 V dla żelu rozdzielającego. Kolejno, za pomocą elektrotransferu półsuchego, białko przeniesiono na membranę nitrocelulozową (ThermoFisher Scientific™). Bibuły Wypall oraz membranę namoczono w 1x buforze BSN przez kilka minut. Następnie, w dolnej części aparatu do transferu (będącej anodą) umieszczono kolejne od dołu: 3 warstwy bibuły, membranę nitrocelulozową, żel, 3 warstwy bibuły i zamknięto szczelnie pokrywą (będącą katodą). Transfer prowadzono przez 60 minut z ustawieniami stałego natężenia prądu wynoszącego 200 mA. Następnie, po zakończonym transferze membranę blokowano w przygotowanym na świeżo 5% roztworze mleka w TBS-T.

Kolejno przeprowadzono inkubację białek z pierwszorzędownym, poliklonalnym króliczym przeciwciałem anti-TTR w stosunku 1:1000 (Proteintech) oraz z pierwszorzędownym, monoklonalnym mysim przeciwciałem anti-Lamin B1, będącym referencją, w stosunku 1:2000. Przeciwciała pierwszorzędowne rozcieńczone w roztworze 5% mleka w TBS-

T, a inkubację białek z przeciwciałami prowadzono przez noc w 4°C. Następnie, po trzykrotnym przepłukaniu membrany buforem TBS-T, białka inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi skierowanymi na IgG królicze oraz mysie (JIR), połączonymi z peroksydazą chrzanową w stosunku 1:5000 w buforze TBS-T przez godzinę. Wizualizację wykonano za pomocą metody chemiluminescencji, do której użyto zestawu SuperSignal™West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™). Wynik analizy udokumentowano z wykorzystaniem urządzenia ChemiDoc™ MP (BIO-RAD). W przypadku fluorescencyjnej analizy Western blot, wykorzystano przeciwciało drugorzędowe skierowane na IgG mysie, znakowane fluoroforem, Alexa Fluor 488 (JIR), w stosunku 1:1000 w buforze TBS-T.

3.2.3.5. Przygotowywanie skrawków organoidów mózgowych oraz barwienie immunofluorescencyjne

Po usunięciu pożywki, organoidy przepłukano trzykrotnie buforem PBS i utrwalono przez 20 min w temperaturze 4°C za pomocą zimnego 4% roztworu PFA. Następnie, organoidy zabarwiono roztworem Ponceau S przez 15 min, przepłukano buforem PBS i odwodniono w roztworze 30% sacharozy przez około 24 h. Następnie, organoidy zatopiono w odczynniku OCT Compound™ na suchym lodzie. Zatopione organoidy przechowywano w -80°C. Organoidy cięto na skrawki o grubości 25-30 µm z wykorzystaniem kriostatu wolnostojącego (Leica CM1950) w -20°C. Skrawki zbierane były na szkiełka mikroskopowe Superfrost Plus™ i suszone w temperaturze pokojowej przez noc. Następnie, skrawki były blokowane roztworem 4% NGS w TBS-T przez godzinę w temperaturze pokojowej. Wykorzystane do badań przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe umieszczono w **Tabeli 2** i **3**. Do wizualizacji jąder komórkowych zastosowano barwnik Hoechst 33258 (ThermoFisher Scientific™) w stosunku 1:10,000.

3.2.3.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji oraz PCR w czasie rzeczywistym

Całkowite RNA było izolowane za pomocą odczynnika TRIzol (Invitrogen), zgodnie z protokołem producenta. Do reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 500 ng całkowitego RNA. Reakcję prowadzono z wykorzystaniem zestawu Maxima RT (ThermoFisher Scientific™) zgodnie z protokołem producenta, z wykorzystaniem oligo(dT)20 primers (EURx), random hexamer primers (EURx) oraz dNTP Ultrapure Mix (EURx). Po zakończonej reakcji, próby rozcieńczono wodą wolną od nukleaz (EURx) do końcowego stężenia 10 ng/uL. Do reakcji qPCR wykorzystano komercyjny odczynnik HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis Biotec). Do analizy ekspresji poszczególnych genów wykorzystano 10 ng uzyskanego cDNA. Reakcja qPCR prowadzona była z wykorzystaniem urządzenia CFX96™ (BIO-RAD), które wyznaczało parametr C_q. Do określenia względnego poziomu ekspresji badanych genów zastosowano metodę $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Normalizację przeprowadzono w oparciu o referencyjny gen β -aktyne. Wykonano również reakcje kontrolne NTC (ang. *non-template control*), bez dodatku matrycy cDNA. Reakcję prowadzono zawsze na trzech powtórzeniach technicznych dla każdego z minimum trzech powtórzeń biologicznych. Do analizy statystycznej wykorzystano t-test lub jednokierunkowy test ANOVA z poprawką post-hoc Bonferroni, dostępne w programie GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Sekwencje użytych starterów przedstawiono w **Tabeli 1 (Materiały 6.1.1.2)**.

3.2.3.7. Pomiar pola powierzchni 60-dniowych fuzyjnych organoidów mózgowych

Zdjęcia 60-dniowych organoidów fuzyjnych zostały zrobione za pomocą cyfrowego mikroskopu Q-scope, model QS.80200-P (Euromex). Analiza pomiaru pól powierzchni została przeprowadzona w programie ImageJ z użyciem narzędzia "Freehand selection". Skalę do pomiarów ustawiono na podstawie fotografii linijki kalibracyjnej dodanej do zestawu Q-scope, gdzie znana liczba pikseli odpowiadała długości równej 5 mm.

Wykresy zostały stworzone przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism (Boston, MA, USA).

4. PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Ludzki mózg jest szczególnie podatny na uszkodzenia w czasie swojego rozwoju. Zaburzenie kluczowych procesów (neuro)rozwojowych na etapie embriogenezy, takich jak proliferacja, migracja i różnicowanie komórek nerwowych, mogą przyczyniać się do neurodegeneracji obserwowanej u osób dorosłych. Chociaż różne choroby neurodegeneracyjne mają pewne cechy wspólne, ich złożona patogeneza wciąż pozostaje niejasna (Mariani i in., 2015). Sugeruje to istnienie pewnej luki w naszej wiedzy na temat powiązania rozwoju ludzkiego z powstawaniem chorób. Dobrym modelem do badania neurorozwojowych aspektów patogenezy chorób neurodegeneracyjnych są choroby polyQ, takie jak HD i jej młodzieńcza postać, spowodowane konkretnymi mutacjami dominującymi które są dobrze poznane. Aby móc wyróżnić najwcześniejsze zaburzenia molekularne i komórkowe rozwoju mózgu JOHD, kluczowe jest użycie odpowiednich modeli badawczych, którymi mogą być komórki macierzyste oraz wygenerowane z nich organoidy mózgowe.

Wielkoskalowa identyfikacja zmian w poziomie transkryptów i białek umożliwiła predykcję neurorozwojowych procesów biologicznych i ścieżek molekularnych w komórkach JOHD jeszcze przed etapem rozwoju, na poziomie linii komórek macierzystych iPSC. Podwyższona ekspresja genów kodujących czynniki transkrypcyjne i histony w linii 71Q, może świadczyć o nieprawidłowo rozwoju zarodka i zbyt wczesnym rozwoju układu nerwowego. Natomiast, obniżenie ekspresji genów związanych z apoptozą w linii 109Q, może przyczyniać się do obecności nadmiernej ilości progenitorów, która potencjalnie zaburza procesy dojrzewania komórek neuronalnych. Wykonane przeze mnie analizy *in silico* dostępnych danych z eksperymentów wysokoprzepustowych,

pozwołyły na uzyskanie szerszego obrazu (neuro)rozwojowych procesów molekularnych zaburzonych w HD, na wielu etapach rozwoju komórkowego oraz w dorosłym mózgu. Analizy te pozwoliły również na identyfikację genów i białek wspólnie deregulowanych w różnych chorobach polyQ, co wskazało na pewne neurorozwojowe podobieństwa tych schorzeń, takie jak nieprawidłowości w procesach wzrostu i wydłużania aksonów, synaptogenezie czy wieloetapowej morfogenezie zarodka i tworzeniu macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykorzystanie analizowanych wcześniej linii iPSC do wygenerowania fuzyjnych organoidów mózgowych, zawierających populacje komórkowe obszarów mózgu najważniejszych w neuropatologii HD, pozwoliło na odzwierciedlenie zmian zachodzących na wczesnym etapie neurogenezy. Uzyskane organoidy fuzyjne były zdecydowanie większe od pojedynczych organoidów *dorsal* i *ventral* przodomózgowia, co świadczyło o ważnych, wzajemnych interakcjach kory mózgowej i rozwijającego się prążkowie i pozwoliło na badanie populacji komórkowych dotychczas nieobserwowanych w klasycznych systemach organoidowych. Analizy eksperymentalne wygenerowanych organoidów mózgowych pozwoliły na wskazanie konkretnych populacji komórek nerwowych i ich markerów zmienionych w JOHD. Bardzo ciekawym odkryciem było bardzo duże podwyższenie ekspresji genu TTR w organoidach JOHD, którego wzrost był dodatkowo skorelowany ze wzrostem liczby powtórzeń CAG. Zidentyfikowałam również podwyższoną ilość białka TTR w ludzkich fuzyjnych organoidach mózgowych oraz w osoczu krwi myszy YAC^{128Q}. Co więcej, stworzone przeze mnie fuzyjne organoidy mozaikowe, powstałe przez połączenie organoidów kontrolnych 21Q z organoidami JOHD 71Q, mogą stanowić model do badań nad wpływem zwiększonej ilości niezmutowanej *HTT* na modyfikację przebiegu neuropatogenezy HD. Wykonane przeze mnie wstępne eksperymenty wykazały widocznie zmniejszoną ilość białka TTR w organoidach mozaikowych w porównaniu do organoidów JOHD. Mimo, iż ta część poruszanej tematyki badawczej wymaga głębszych analiz, wyznacza ona nowe fascynujące kierunki dla przyszłych badań.

Podsumowując, w mojej pracy doktorskiej, zidentyfikowałam wiele dotychczas niepoznanych zmian w modelach komórkowych JOHD na poziomie transkryptów, białek oraz procesów komórkowych. Wyznaczają one nowe kierunki badań mogące stworzyć szerszy obraz patomechanizmu tej choroby neurodegeneracyjnej. Uzyskane badania mogą przynieść lepsze zrozumienie choroby Huntingtona jako choroby neurorozwojowej. Wykonane w ramach niniejszej pracy analizy porównawcze pozwoliły na wyodrębnienie genów, których ekspresja zmieniona jest wspólnie w różnych chorobach poliglutaminowych. Może to przybliżyć poznanie uniwersalnych mechanizmów wiodących do neurodegeneracji, co w dalszej perspektywie mogłoby wskazać nowe cele terapeutyczne.

5. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, S. T., Rogers, A. D., Chen, M. J., Dixit, R., Adnani, L., Frankiw, L. S., et al. (2019). Capicua regulates neural stem cell proliferation and lineage specification through control of Ets factors. *Nat. Commun.* 10, 2000. doi: 10.1038/s41467-019-09949-6.
- Ahmed, I., Sbodio, J. I., Harraz, M. M., Tyagi, R., Grima, J. C., Albacarys, L. K., et al. (2015). Huntington's disease: Neural dysfunction linked to inositol polyphosphate multikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 9751–9756. doi: 10.1073/pnas.1511810112.
- Alshehri, B., D'Souza, D. G., Lee, J. Y., Petratos, S., and Richardson, S. J. (2015). The Diversity of Mechanisms Influenced by Transthyretin in Neurobiology: Development, Disease and Endocrine Disruption. *J. Neuroendocrinol.* 27, 303–323. doi: 10.1111/jne.12271.
- Alshehri, B., Pagnin, M., Lee, J. Y., Petratos, S., and Richardson, S. J. (2020). The Role of Transthyretin in Oligodendrocyte Development. *Sci. Rep.* 10, 4189. doi: 10.1038/s41598-020-60699-8.
- Assous, M., and Tepper, J. M. (2019). Excitatory extrinsic afferents to striatal interneurons and interactions with striatal microcircuitry. *Eur. J. Neurosci.* 49, 593–603. doi: 10.1111/ejn.13881.
- Auerbach, W., Hurlbert, M. S., Hilditch-Maguire, P., Wadghiri, Y. Z., Wheeler, V. C., Cohen, S. I., et al. (2001). The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2515–2523. doi: 10.1093/hmg/10.22.2515.

- Aylward, E. H., Harrington, D. L., Mills, J. A., Nopoulos, P. C., Ross, C. A., Long, J. D., et al. (2013). Regional atrophy associated with cognitive and motor function in prodromal Huntington disease. *J. Huntingt. Dis.* 2, 477–489. doi: 10.3233/JHD-130076.
- Bagley, J. A., Reumann, D., Bian, S., Lévi-Strauss, J., and Knoblich, J. A. (2017). Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat. Methods* 14, 743–751. doi: 10.1038/nmeth.4304.
- Bakels, H. S., Roos, R. A. C., Roon-Mom, W. M. C., and Bot, S. T. (2022). Juvenile-Onset Huntington Disease Pathophysiology and Neurodevelopment: A Review. *Mov. Disord.* 37, 16–24. doi: 10.1002/mds.28823.
- Barry, J., Akopian, G., Cepeda, C., and Levine, M. S. (2018). Striatal Direct and Indirect Pathway Output Structures Are Differentially Altered in Mouse Models of Huntington’s Disease. *J. Neurosci.* 38, 4678–4694. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0434-18.2018.
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., et al. (2015). Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 1, 1–21. doi: 10.1038/nrdp.2015.5.
- Benito-Kwiecinski, S., and Lancaster, M. A. (2020). Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 12, a035709. doi: 10.1101/cshperspect.a035709.
- Bezerra, F., Saraiva, M. J., and Almeida, M. R. (2020). Modulation of the Mechanisms Driving Transthyretin Amyloidosis. *Front. Mol. Neurosci.* 13, 592644. doi: 10.3389/fnmol.2020.592644.
- Bindea, G., Galon, J., and Mlecnik, B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29, 661–663. doi: 10.1093/bioinformatics/btt019.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., et al. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093. doi: 10.1093/bioinformatics/btp101.
- Buxbaum, J. N., Ye, Z., Reixach, N., Friske, L., Levy, C., Das, P., et al. (2008). Transthyretin protects Alzheimer’s mice from the behavioral and biochemical effects of A β toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 2681–2686. doi: 10.1073/pnas.0712197105.
- Capiluppi, E., Romano, L., Reborá, P., Nanetti, L., Castaldo, A., Gellera, C., et al. (2020). Late-onset Huntington’s disease with 40–42 CAG expansion. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 41, 869–876. doi: 10.1007/s10072-019-04177-8.
- Capizzi, M., Carpentier, R., Denarier, E., Adrait, A., Kassem, R., Mapelli, M., et al. (2022). Developmental defects in Huntington’s disease show that axonal growth

- and microtubule reorganization require NUMA1. *Neuron* 110, 36-50.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2021.10.033.
- Caron, N. S., Haqqani, A. S., Sandhu, A., Aly, A. E., Findlay Black, H., Bone, J. N., et al. (2022). Cerebrospinal fluid biomarkers for assessing Huntington disease onset and severity. *Brain Commun.* 4, fcac309. doi: 10.1093/braincomms/fcac309.
- Casas Gimeno, G., and Paridaen, J. T. M. L. (2022). The Symmetry of Neural Stem Cell and Progenitor Divisions in the Vertebrate Brain. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 885269. doi: 10.3389/fcell.2022.885269.
- Celestino-Soper, P. B., Skinner, C., Schroer, R., Eng, P., Shenai, J., Nowaczyk, M. M., et al. (2012). Deletions in chromosome 6p22.3-p24.3, including ATXN1, are associated with developmental delay and autism spectrum disorders. *Mol. Cytogenet.* 5, 17. doi: 10.1186/1755-8166-5-17.
- Chan, W. Y., Lorke, D. E., Tiu, S. C., and Yew, D. T. (2002). Proliferation and apoptosis in the developing human neocortex. *Anat. Rec.* 267, 261–276. doi: 10.1002/ar.10100.
- Chen, H., and Boutros, P. C. (2011). VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 12, 35. doi: 10.1186/1471-2105-12-35.
- Chen, W., Schwalie, P. C., Pankevich, E. V., Gubelmann, C., Raghav, S. K., Dainese, R., et al. (2019). ZFP30 promotes adipogenesis through the KAP1-mediated activation of a retrotransposon-derived Pparg2 enhancer. *Nat. Commun.* 10, 1809. doi: 10.1038/s41467-019-09803-9.
- Conforti, P., Besusso, D., Bocchi, V. D., Faedo, A., Cesana, E., Rossetti, G., et al. (2018). Faulty neuronal determination and cell polarization are reverted by modulating HD early phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E762–E771. doi: 10.1073/pnas.1715865115.
- Conway, J. R., Lex, A., and Gehlenborg, N. (2017). UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 33, 2938–2940. doi: 10.1093/bioinformatics/btx364.
- Cuberos, H., Vallée, B., Vourc'h, P., Tastet, J., Andres, C. r., and Bénédicti, H. (2015). Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction. *FEBS Lett.* 589, 3795–3806. doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.032.
- Di Benedetto, D., Di Vita, G., Romano, C., Giudice, M. L., Vitello, G. A., Zingale, M., et al. (2013). 6p22.3 deletion: report of a patient with autism, severe intellectual disability and electroencephalographic anomalies. *Mol. Cytogenet.* 6, 4. doi: 10.1186/1755-8166-6-4.
- Dienel, S. J., and Lewis, D. A. (2019). Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia. *Neurobiol. Dis.* 131, 104208. doi: 10.1016/j.nbd.2018.06.020.

- Ebert, A. D., Shelley, B. C., Hurley, A. M., Onorati, M., Castiglioni, V., Patitucci, T. N., et al. (2013). EZ spheres: a stable and expandable culture system for the generation of pre-rosette multipotent stem cells from human ESCs and iPSCs. *Stem Cell Res.* 10, 417–427. doi: 10.1016/j.scr.2013.01.009.
- Edamakanti, C. R., Do, J., Didonna, A., Martina, M., and Opal, P. (2018). Mutant ataxin1 disrupts cerebellar development in spinocerebellar ataxia type 1. *J. Clin. Invest.* 128, 2252–2265. doi: 10.1172/JCI96765.
- Estevez-Fraga, C., Elmalem, M. S., Papoutsis, M., Durr, A., Rees, E. M., Hobbs, N. Z., et al. (2023). Progressive alterations in white matter microstructure across the timecourse of Huntington’s disease. *Brain Behav.* 13, e2940. doi: 10.1002/brb3.2940.
- Fame, R. M., and Lehtinen, M. K. (2020). Emergence and Developmental Roles of the Cerebrospinal Fluid System. *Dev. Cell* 52, 261–275. doi: 10.1016/j.devcel.2020.01.027.
- Fields, E., Vaughan, E., Tripu, D., Lim, I., Shrout, K., Conway, J., et al. (2021). Gene Targeting Techniques for Huntington’s Disease. *Ageing Res. Rev.* 70, 101385. doi: 10.1016/j.arr.2021.101385.
- Fleming, C. E., Mar, F. M., Franquinho, F., Saraiva, M. J., and Sousa, M. M. (2009). Transthyretin internalization by sensory neurons is megalin mediated and necessary for its neurotogenic activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3220–3232. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6012-08.2009.
- Fusilli, C., Migliore, S., Mazza, T., Consoli, F., Luca, A. D., Barbagallo, G., et al. (2018). Biological and clinical manifestations of juvenile Huntington’s disease: a retrospective analysis. *Lancet Neurol.* 17, 986–993. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30294-1.
- Gibb, R., and Kolb, B. eds. (2018). “Copyright,” in *The Neurobiology of Brain and Behavioral Development* (Academic Press), iv. doi: 10.1016/B978-0-12-804036-2.00018-2.
- Gomes, J. R., Nogueira, R. S., Vieira, M., Santos, S. D., Ferraz-Nogueira, J. P., Relvas, J. B., et al. (2016). Transthyretin provides trophic support via megalin by promoting neurite outgrowth and neuroprotection in cerebral ischemia. *Cell Death Differ.* 23, 1749–1764. doi: 10.1038/cdd.2016.64.
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847–2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313.
- Harembaki, T., Metzger, J. J., Rito, T., Ozair, M. Z., Etoc, F., and Brivanlou, A. H. (2019). Self-organizing neuruloids model developmental aspects of Huntington’s disease in the ectodermal compartment. *Nat. Biotechnol.* 37, 1198–1208. doi: 10.1038/s41587-019-0237-5.

- HD iPSC Consortium (2012). Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* 11, 264–278. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.027.
- HD iPSC Consortium (2017). Developmental alterations in Huntington's disease neural cells and pharmacological rescue in cells and mice. *Nat. Neurosci.* 20, 648–660. doi: 10.1038/nn.4532.
- Hedjoudje, A., Nicolas, G., Goldenberg, A., Vanhulle, C., Dumant-Forrest, C., Deverrière, G., et al. (2018). Morphological features in juvenile Huntington disease associated with cerebellar atrophy - magnetic resonance imaging morphometric analysis. *Pediatr. Radiol.* 48, 1463–1471. doi: 10.1007/s00247-018-4167-z.
- Herwig, R., Hardt, C., Lienhard, M., and Kamburov, A. (2016). Analyzing and interpreting genome data at the network level with ConsensusPathDB. *Nat. Protoc.* 11, 1889–1907. doi: 10.1038/nprot.2016.117.
- Hobbs, N. Z., Barnes, J., Frost, C., Henley, S. M. D., Wild, E. J., Macdonald, K., et al. (2010). Onset and progression of pathologic atrophy in Huntington disease: a longitudinal MR imaging study. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 31, 1036–1041. doi: 10.3174/ajnr.A2018.
- Hsu, Y.-T., Chang, Y.-G., and Chern, Y. (2018). Insights into GABAergic system alteration in Huntington's disease. *Open Biol.* 8. doi: 10.1098/rsob.180165.
- Huang, S., Zhu, S., Li, X.-J., and Li, S. (2019). The Expanding Clinical Universe of Polyglutamine Disease. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 25, 512–520. doi: 10.1177/1073858418822993.
- I Oliveira da Silva, M., Lopes, C. S., and Liz, M. A. (2020). Transthyretin interacts with actin regulators in a Drosophila model of familial amyloid polyneuropathy. *Sci. Rep.* 10, 13596. doi: 10.1038/s41598-020-70377-4.
- Iennaco, R., Formenti, G., Trovesi, C., Rossi, R. L., Zuccato, C., Lischetti, T., et al. (2022). The evolutionary history of the polyQ tract in huntingtin sheds light on its functional pro-neural activities. *Cell Death Differ.* 29, 293–305. doi: 10.1038/s41418-021-00914-9.
- Iqbal, J. (2018). Transthyretin—A Key Gene Involved in Regulating Learning and Memory in Brain, and Providing Neuroprotection in Alzheimer Disease via Neuronal Synthesis of Transthyretin Protein. *J. Behav. Brain Sci.* 8, 77–92. doi: 10.4236/jbbs.2018.82005.
- Jahanshahi, A., Boonstra, J. T., Alosaimi, F., Ozsoy, O., Michielse, S., and Temel, Y. (2022). Hidden brain atrophy in ultra-high field MR images in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Brain Disord.* 6, 100039. doi: 10.1016/j.dscb.2022.100039.
- Jansen, A. H. P., van Hal, M., Op den Kelder, I. C., Meier, R. T., de Ruiter, A.-A., Schut, M. H., et al. (2017). Frequency of nuclear mutant huntingtin inclusion

formation in neurons and glia is cell-type-specific. *Glia* 65, 50–61. doi: 10.1002/glia.23050.

- Jimenez-Sanchez, M., Licitra, F., Underwood, B. R., and Rubinsztein, D. C. (2017). Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7, a024240. doi: 10.1101/cshperspect.a024240.
- Kaye, J. A., and Finkbeiner, S. (2013). Modeling Huntington's Disease with Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 0, 50–64. doi: 10.1016/j.mcn.2013.02.005.
- Kinnunen, K. M., Schwarz, A. J., Turner, E. C., Pustina, D., Gantman, E. C., Gordon, M. F., et al. (2021). Volumetric MRI-Based Biomarkers in Huntington's Disease: An Evidentiary Review. *Front. Neurol.* 12, 712555. doi: 10.3389/fneur.2021.712555.
- Krzyzanowska, A., and Carro, E. (2012). Pathological alteration in the choroid plexus of Alzheimer's disease: implication for new therapy approaches. *Front. Pharmacol.* 3, 75. doi: 10.3389/fphar.2012.00075.
- Lancaster, M. A., and Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345, 1247125. doi: 10.1126/science.1247125.
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., et al. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 10.1038/nature12517. doi: 10.1038/nature12517.
- Latimer, C. S., Flanagan, M. E., Cimino, P. J., Jayadev, S., Davis, M., Hoffer, Z. S., et al. (2017). Neuropathological Comparison of Adult Onset and Juvenile Huntington's Disease with Cerebellar Atrophy: A Report of a Father and Son. *J. Huntingt. Dis.* 6, 337–348. doi: 10.3233/JHD-170261.
- Lee, J., Kim, M., Itoh, T. Q., and Lim, C. (2018). Ataxin-2: A versatile posttranscriptional regulator and its implication in neural function. *WIREs RNA* 9, e1488. doi: 10.1002/wrna.1488.
- Lesinskienė, S., Rojaka, D., Praninskienė, R., Morkūnienė, A., Matulevičienė, A., and Utkus, A. (2020). Juvenile Huntington's disease: two case reports and a review of the literature. *J. Med. Case Reports* 14, 173. doi: 10.1186/s13256-020-02494-7.
- Lin, R., Learman, L. N., Na, C.-H., Renuse, S., Chen, K. T., Chen, P. Y., et al. (2021). Persistently Elevated mTOR Complex 1-S6 Kinase 1 Disrupts DARPP-32-Dependent D1 Dopamine Receptor Signaling and Behaviors. *Biol. Psychiatry* 89, 1058–1072. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.10.012.
- Liu, L., Tong, H., Sun, Y., Chen, X., Yang, T., Zhou, G., et al. (2023). Huntingtin Interacting Proteins and Pathological Implications. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 13060. doi: 10.3390/ijms241713060.

- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lizano, P., Lutz, O., Ling, G., Lee, A. M., Eum, S., Bishop, J. R., et al. (2019). Association of Choroid Plexus Enlargement With Cognitive, Inflammatory, and Structural Phenotypes Across the Psychosis Spectrum. *Am. J. Psychiatry* 176, 564–572. doi: 10.1176/appi.ajp.2019.18070825.
- Lo Sardo, V., Zuccato, C., Gaudenzi, G., Vitali, B., Ramos, C., Tartari, M., et al. (2012). An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin. *Nat. Neurosci.* 15, 713–721. doi: 10.1038/nn.3080.
- Lu, H.-C., Tan, Q., Rousseaux, M. W. C., Wang, W., Kim, J.-Y., Richman, R., et al. (2017). Disruption of the ATXN1-CIC complex causes a spectrum of neurobehavioral phenotypes in mice and humans. *Nat. Genet.* 49, 527–536. doi: 10.1038/ng.3808.
- MacAulay, N., Keep, R. F., and Zeuthen, T. (2022). Cerebrospinal fluid production by the choroid plexus: a century of barrier research revisited. *Fluids Barriers CNS* 19, 26. doi: 10.1186/s12987-022-00323-1.
- MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., et al. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983. doi: 10.1016/0092-8674(93)90585-E.
- Mannervik, M. (2014). Control of Drosophila embryo patterning by transcriptional co-regulators. *Exp. Cell Res.* 321, 47–57. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.10.010.
- Marques, F., Sousa, J. C., Brito, M. A., Pahnke, J., Santos, C., Correia-Neves, M., et al. (2017). The choroid plexus in health and in disease: dialogues into and out of the brain. *Neurobiol. Dis.* 107, 32–40. doi: 10.1016/j.nbd.2016.08.011.
- Marques, F., Sousa, J. C., Sousa, N., and Palha, J. A. (2013). Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 8, 38. doi: 10.1186/1750-1326-8-38.
- Massart, R., Mignon, V., Stanic, J., Munoz-Tello, P., Becker, J. A. J., Kieffer, B. L., et al. (2016). Developmental and adult expression patterns of the G-protein-coupled receptor GPR88 in the rat: Establishment of a dual nuclear–cytoplasmic localization. *J. Comp. Neurol.* 524, 2776–2802. doi: 10.1002/cne.23991.
- Matsuda, K., Matsuda, S., Gladding, C. M., and Yuzaki, M. (2006). Characterization of the $\delta 2$ Glutamate Receptor-binding Protein Delphilin: SPLICING VARIANTS WITH DIFFERENTIAL PALMITOYLATION AND AN ADDITIONAL PDZ DOMAIN*. *J. Biol. Chem.* 281, 25577–25587. doi: 10.1074/jbc.M602044200.
- McColgan, P., and Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* 25, 24–34. doi: 10.1111/ene.13413.

- Mehta, S. R., Tom, C. M., Wang, Y., Bresee, C., Rushton, D., Mathkar, P. P., et al. (2018). Human Huntington's Disease iPSC-Derived Cortical Neurons Display Altered Transcriptomics, Morphology, and Maturation. *Cell Rep.* 25, 1081-1096.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.076.
- Mi, D., Li, Z., Lim, L., Li, M., Moissidis, M., Yang, Y., et al. (2018). Early emergence of cortical interneuron diversity in the mouse embryo. *Science* 360, 81–85. doi: 10.1126/science.aar6821.
- Milunsky, J. M., Maher, T. A., Loose, B. A., Darras, B. T., and Ito, M. (2003). XL PCR for the detection of large trinucleotide expansions in juvenile Huntington's disease. *Clin. Genet.* 64, 70–73. doi: 10.1034/j.1399-0004.2003.00108.x.
- Moeller, A. A., Felker, M. V., Brault, J. A., Duncan, L. C., Hamid, R., and Golomb, M. R. (2021). Patients With Extreme Early Onset Juvenile Huntington Disease Can Have Delays in Diagnosis: A Case Report and Literature Review. *Child Neurol. Open* 8, 2329048X211036137. doi: 10.1177/2329048X211036137.
- Molero, A. E., Arteaga-Bracho, E. E., Chen, C. H., Gulinello, M., Winchester, M. L., Pichamoorthy, N., et al. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 5736–5741. doi: 10.1073/pnas.1603871113.
- Monk, R., Lee, K., Jones, K. S., and Connor, B. (2021). Directly reprogrammed Huntington's disease neural precursor cells generate striatal neurons exhibiting aggregates and impaired neuronal maturation. *STEM CELLS* 39, 1410–1422. doi: 10.1002/stem.3420.
- Moser, A. D., Epping, E., Espe-Pfeifer, P., Martin, E., Zhorne, L., Mathews, K., et al. (2017). A survey-based study identifies common but unrecognized symptoms in a large series of juvenile Huntington's disease. *Neurodegener. Dis. Manag.* 7, 307–315. doi: 10.2217/nmt-2017-0019.
- Mouton-Liger, F., Thomas, S., Rattenbach, R., Magnol, L., Larigaldie, V., Ledru, A., et al. (2011). PCP4 (PEP19) overexpression induces premature neuronal differentiation associated with Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase II- δ activation in mouse models of Down syndrome. *J. Comp. Neurol.* 519, 2779–2802. doi: 10.1002/cne.22651.
- Movsas, T. Z., Pinto-Martin, J. A., Whitaker, A. H., Feldman, J. F., Lorenz, J. M., Korzeniewski, S. J., et al. (2013). Autism Spectrum Disorder is associated with ventricular enlargement in a Low Birth Weight Population. *J. Pediatr.* 163, 73–78. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.12.084.
- Mulder, L. A., Depla, J. A., Sridhar, A., Wolthers, K., Pajkrt, D., and Vieira de Sá, R. (2023). A beginner's guide on the use of brain organoids for neuroscientists: a systematic review. *Stem Cell Res. Ther.* 14, 87. doi: 10.1186/s13287-023-03302-x.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. L., and Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 143–150. doi: 10.1038/83967.

- Nelles, D. G., and Hazrati, L.-N. (2022). Ependymal cells and neurodegenerative disease: outcomes of compromised ependymal barrier function. *Brain Commun.* 4, fcac288. doi: 10.1093/braincomms/fcac288.
- Nguyen, G. D., Molero, A. E., Gokhan, S., and Mehler, M. F. (2013). Functions of huntingtin in germ layer specification and organogenesis. *PLoS One* 8, e72698. doi: 10.1371/journal.pone.0072698.
- Nian, F.-S., and Hou, P.-S. (2022). Evolving Roles of Notch Signaling in Cortical Development. *Front. Neurosci.* 16, 844410. doi: 10.3389/fnins.2022.844410.
- Niewiadomska-Cimicka, A., and Trottier, Y. (2019). Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Neurotherapeutics* 16, 1074–1096. doi: 10.1007/s13311-019-00778-5.
- Nomura, T. (2021). Interneuron Dysfunction and Inhibitory Deficits in Autism and Fragile X Syndrome. *Cells* 10, 2610. doi: 10.3390/cells10102610.
- Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Dev. Camb. Engl.* 146, dev156059. doi: 10.1242/dev.156059.
- Palaiogeorgou, A. M., Papakonstantinou, E., Golfopoulou, R., Sigala, M., Mitsis, T., Papageorgiou, L., et al. (2023). Recent approaches on Huntington's disease (Review). *Biomed. Rep.* 18, 5. doi: 10.3892/br.2022.1587.
- Peyre, E., Silva, C. G., and Nguyen, L. (2015). Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Front. Cell. Neurosci.* 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00129> [Accessed June 11, 2023].
- Qian, X., Song, H., and Ming, G.-L. (2019). Brain organoids: advances, applications and challenges. *Dev. Camb. Engl.* 146, dev166074. doi: 10.1242/dev.166074.
- R: The R Project for Statistical Computing (n.d.). Available at: <https://www.r-project.org/> [Accessed August 29, 2023].
- Rangel-Barajas, C., and Rebec, G. V. (2016). Dysregulation of Corticostriatal Connectivity in Huntington's Disease: A Role for Dopamine Modulation. *J. Huntingt. Dis.* 5, 303–331. doi: 10.3233/JHD-160221.
- Reiner, A., and Deng, Y.-P. (2018). Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 24, 250–280. doi: 10.1111/cns.12844.
- Ring, K. L., An, M. C., Zhang, N., O'Brien, R. N., Ramos, E. M., Gao, F., et al. (2015). Genomic Analysis Reveals Disruption of Striatal Neuronal Development and Therapeutic Targets in Human Huntington's Disease Neural Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 5, 1023–1038. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.005.

- Ross, C. A., and Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* 10, 83–98. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70245-3.
- Roussakis, A.-A., Gennaro, M., Gordon, M. F., Reilmann, R., Borowsky, B., Rynkowski, G., et al. (2023). A PET-CT study on neuroinflammation in Huntington's disease patients participating in a randomized trial with laquinimod. *Brain Commun.* 5, fcad084. doi: 10.1093/braincomms/fcad084.
- Sakazume, S., Yoshinari, S., Oguma, E., Utsuno, E., Ishii, T., Narumi, Y., et al. (2009). A patient with early onset Huntington disease and severe cerebellar atrophy. *Am. J. Med. Genet. A.* 149A, 598–601. doi: 10.1002/ajmg.a.32707.
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89, 910–926. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.003.
- Saykin, A. J., Shen, L., Foroud, T. M., Potkin, S. G., Swaminathan, S., Kim, S., et al. (2010). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative biomarkers as quantitative phenotypes: Genetics core aims, progress, and plans. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 6, 265–273. doi: 10.1016/j.jalz.2010.03.013.
- Schulte, J., and Littleton, J. T. (2011). The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology.
- Schultz, J. L., Langbehn, D. R., Al-Kaylani, H. M., van der Plas, E., Kosciak, T. R., Epping, E. A., et al. (2023). Longitudinal Clinical and Biological Characteristics in Juvenile-Onset Huntington's Disease. *Mov. Disord.* 38, 113–122. doi: 10.1002/mds.29251.
- Shen, Y., and Peterson, A. S. (2008). Atrophins' emerging roles in development and neurodegenerative disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 437. doi: 10.1007/s00018-008-8403-9.
- Shenoy, S. S., and Lui, F. (2023). "Neuroanatomy, Ventricular System," in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532932/> [Accessed June 9, 2023].
- Silva-Vargas, V., Maldonado-Soto, A. R., Mizrak, D., Codega, P., and Doetsch, F. (2016). Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 19, 643–652. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.013.
- Southwell, A. L., Skotte, N. H., Villanueva, E. B., Østergaard, M. E., Gu, X., Kordasiewicz, H. B., et al. (2017). A novel humanized mouse model of Huntington disease for preclinical development of therapeutics targeting mutant huntingtin alleles. *Hum. Mol. Genet.* 26, 1115–1132. doi: 10.1093/hmg/ddx021.
- Stein, T. D., and Johnson, J. A. (2002). Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 7380–7388. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-17-07380.2002.

- Stiles, J., and Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* 20, 327–348. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4.
- Stout, J. C. (2018). Juvenile Huntington’s disease: left behind? *Lancet Neurol.* 17, 932–933. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30334-X.
- Świtońska, K., Szlachcic, W. J., Handschuh, L., Wojciechowski, P., Marczak, Ł., Stelmaszczuk, M., et al. (2019). Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling. *Front. Cell. Neurosci.* 12. doi: 10.3389/fncel.2018.00528.
- Świtońska-Kurkowska, K., Krist, B., Delimata, J., and Figiel, M. (2021). Juvenile Huntington’s Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 642773. doi: 10.3389/fcell.2021.642773.
- Szlachcic, W. J., Switonski, P. M., Krzyzosiak, W. J., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2015). Huntington disease iPSCs show early molecular changes in intracellular signaling, the expression of oxidative stress proteins and the p53 pathway. *Dis. Model. Mech.* 8, 1047–1057. doi: 10.1242/dmm.019406.
- Szlachcic, W. J., Wiatr, K., Trzeciak, M., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2017). The Generation of Mouse and Human Huntington Disease iPSC Cells Suitable for In vitro Studies on Huntingtin Function. *Front. Mol. Neurosci.* 10. doi: 10.3389/fnmol.2017.00253.
- Tabrizi, S. J., Estevez-Fraga, C., Van Roon-Mom, W. M. C., Flower, M. D., Scahill, R. I., Wild, E. J., et al. (2022). Potential disease-modifying therapies for Huntington’s disease: lessons learned and future opportunities. *Lancet Neurol.* 21, 645–658. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00121-1.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Tereshchenko, A., Magnotta, V., Epping, E., Mathews, K., Espe-Pfeifer, P., Martin, E., et al. (2019). Brain structure in juvenile-onset Huntington disease. *Neurology* 92, e1939–e1947. doi: 10.1212/WNL.0000000000007355.
- Tereshchenko, A., McHugh, M., Lee, J. K., Gonzalez-Alegre, P., Crane, K., Dawson, J., et al. (2015). Abnormal Weight and Body Mass Index in Children with Juvenile Huntington’s Disease. *J. Huntingt. Dis.* 4, 231–238. doi: 10.3233/JHD-150152.
- Thakor, B., Jagtap, S. A., and Joshi, A. (2021). Juvenile Huntington’s disease masquerading as progressive myoclonus epilepsy. *Epilepsy Behav. Rep.* 16, 100470. doi: 10.1016/j.ebr.2021.100470.
- Tong, Y., Ha, T. J., Liu, L., Nishimoto, A., Reiner, A., and Goldowitz, D. (2011). Spatial and temporal requirements for huntingtin (Htt) in neuronal migration and

- survival during brain development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 14794–14799. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2774-11.2011.
- Tourette, C., Li, B., Bell, R., O’Hare, S., Kaltenbach, L. S., Mooney, S. D., et al. (2014). A Large Scale Huntingtin Protein Interaction Network Implicates Rho GTPase Signaling Pathways in Huntington Disease♦. *J. Biol. Chem.* 289, 6709–6726. doi: 10.1074/jbc.M113.523696.
- Ueda, M. (2022). Transthyretin: Its function and amyloid formation. *Neurochem. Int.* 155, 105313. doi: 10.1016/j.neuint.2022.105313.
- Vonsattel, J. P. G., Keller, C., and Cortes Ramirez, E. P. (2011). Huntington’s disease - neuropathology. *Handb. Clin. Neurol.* 100, 83–100. doi: 10.1016/B978-0-444-52014-2.00004-5.
- Wang, H., Guo, M., Wei, H., and Chen, Y. (2023). Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8, 92. doi: 10.1038/s41392-023-01347-1.
- Wang, X., and Putkey, J. A. (2016). PEP-19 modulates calcium binding to calmodulin by electrostatic steering. *Nat. Commun.* 7, 13583. doi: 10.1038/ncomms13583.
- Wiatr, K., Szlachcic, W. J., Trzeciak, M., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2018). Huntington Disease as a Neurodevelopmental Disorder and Early Signs of the Disease in Stem Cells. *Mol. Neurobiol.* 55, 3351–3371. doi: 10.1007/s12035-017-0477-7.
- Wilson, D. M., Cookson, M. R., Bosch, L. V. D., Zetterberg, H., Holtzman, D. M., and Dewachter, I. (2023). Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell* 186, 693–714. doi: 10.1016/j.cell.2022.12.032.
- Wright, G. E. B., Black, H. F., Collins, J. A., Gall-Duncan, T., Caron, N. S., Pearson, C. E., et al. (2020). Interrupting sequence variants and age of onset in Huntington’s disease: clinical implications and emerging therapies. *Lancet Neurol.* 19, 930–939. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30343-4.
- Yang, G., and Shcheglovitov, A. (2020). Probing disrupted neurodevelopment in autism using human stem cell-derived neurons and organoids: An outlook into future diagnostics and drug development. *Dev. Dyn.* 249, 6–33. doi: 10.1002/dvdy.100.
- Yang, L., Li, Z., Liu, G., Li, X., and Yang, Z. (2022). Developmental Origins of Human Cortical Oligodendrocytes and Astrocytes. *Neurosci. Bull.* 38, 47–68. doi: 10.1007/s12264-021-00759-9.
- Yang, S., Li, X.-J., and Li, S. (2016). Molecular mechanisms underlying Spinocerebellar Ataxia 17 (SCA17) pathogenesis. *Rare Dis.* 4, e1223580. doi: 10.1080/21675511.2016.1223580.
- Yoon, G., Kramer, J., Zanko, A., Guzijan, M., Lin, S., Foster-Barber, A., et al. (2006). Speech and language delay are early manifestations of juvenile-onset Huntington disease. *Neurology* 67, 1265–1267. doi: 10.1212/01.wnl.0000238390.86304.4e.

- Ypsilanti, A. R., Pattabiraman, K., Catta-Preta, R., Golonzhka, O., Lindtner, S., Tang, K., et al. (2021). Transcriptional network orchestrating regional patterning of cortical progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, e2024795118. doi: 10.1073/pnas.2024795118.
- Zhang, F., Xu, D., Yuan, L., Sun, Y., and Xu, Z. (2014). Epigenetic regulation of Atrophin1 by lysine-specific demethylase 1 is required for cortical progenitor maintenance. *Nat. Commun.* 5, 5815. doi: 10.1038/ncomms6815.
- Zhang, J., Ooi, J., Utami, K. H., Langley, S. R., Aning, O. A., Park, D. S., et al. (2019). Expanded huntingtin CAG repeats disrupt the balance between neural progenitor expansion and differentiation in human cerebral organoids. 850586. doi: 10.1101/850586.
- Zhang, X.-J., Li, Z., Han, Z., Sultan, K. T., Huang, K., and Shi, S.-H. (2017). Precise inhibitory microcircuit assembly of developmentally related neocortical interneurons in clusters. *Nat. Commun.* 8, 16091. doi: 10.1038/ncomms16091.
- Zhao, Z., Zhang, D., Yang, F., Xu, M., Zhao, S., Pan, T., et al. (2022). Evolutionarily conservative and non-conservative regulatory networks during primate interneuron development revealed by single-cell RNA and ATAC sequencing. *Cell Res.* 32, 425–436. doi: 10.1038/s41422-022-00635-9.

6. ZAŁĄCZNIKI

- OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE PRACY KANDYDATA W PUBLIKACJE ZAWARTE W ROZPRAWIE DOKTORSKIEJ.

- PUBLIKACJA NR 1.

Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling

- PUBLIKACJA NR 2.

Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data

Poznań, 06.09.2023r.

Mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska
Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

OŚWIADCZENIE KANDYDATA DO NADANIA STOPNIA DOKTORSKIEGO

Tytuł artykułu naukowego: „Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling”.

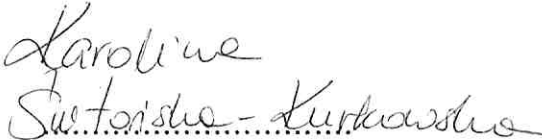
Autorzy: Świtońska K, Szlachcic WJ, Handschuh L, Wojciechowski P, Marczak Ł, Stelmaszczuk M, Figlerowicz M*, Figiel M*.

Czasopismo: Frontiers in Cellular Neuroscience

Data opublikowania: styczeń 2019

Oświadczam, że mój wkład autorski w artykuł naukowy zatytułowany „Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling” obejmuje:

- Znaczny udział w pisaniu publikacji
- Interpretację wyników otrzymanych po sekwencjonowaniu RNA (RNA-seq) komórek HD iPSC, uzyskanych od pacjentów z młodzieńczą formą choroby Huntingtona i komórek kontrolnych
- Przeprowadzenie części eksperymentów qPCR walidujących wyniki uzyskane z RNA-seq
- Hodowlę komórek HD iPSC i komórek kontrolnych, uzyskanie materiału komórkowego oraz przygotowanie go do eksperymentów proteomicznych (MS), które obejmowały analizę ilościową białek w komórkach HD iPSC oraz w komórkach kontrolnych
- Analizy bioinformatyczne wszystkich danych otrzymanych w eksperymentach transkryptomicznych i proteomicznych
- Przeprowadzenie eksperymentu potwierdzającego ekspresję markerów pluripotencji we wszystkich użytych do analiz komórek iPSC
- Utworzenie wszystkich rycin i tabel zawartych w artykule, z wyjątkiem Fig. 2


Podpis kandydata

Poznań, 16.10.2023r.

Prof. dr hab. Marek Figlerowicz
Dyrektor Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN
Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej
Ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

OŚWIADCZENIE AUTORA KORESPONDENCYJNEGO ARTYKUŁÓW ZAWARTYCH W ROZPRAWIE

Tytuł artykułu naukowego: „Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling”.

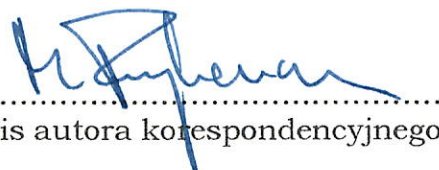
Autorzy: Świtońska K, Szlachcic WJ, Handschuh L, Wojciechowski P, Marczak Ł, Stelmaszczuk M, Figlerowicz M*, Figiel M*.

Czasopismo: Frontiers in Cellular Neuroscience

Data opublikowania: styczeń 2019

Oświadczam, że wkład autorski mgr inż. Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej w artykuł naukowy zatytułowany „Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling” obejmuje:

- Znaczący udział w pisaniu publikacji
- Interpretację wyników otrzymanych po sekwencjonowaniu RNA (RNA-seq) komórek HD iPSC, uzyskanych od pacjentów z młodzieńczą formą choroby Huntingtona i komórek kontrolnych
- Przeprowadzenie części eksperymentów qPCR walidujących wyniki uzyskane z RNA-seq
- Hodowlę komórek HD iPSC i komórek kontrolnych, uzyskanie materiału komórkowego oraz przygotowanie go do eksperymentów proteomicznych (MS), które obejmowały analizę ilościową białek w komórkach HD iPSC oraz w komórkach kontrolnych
- Analizy bioinformatyczne wszystkich danych otrzymanych w eksperymentach transkryptomicznych i proteomicznych
- Przeprowadzenie eksperymentu potwierdzającego ekspresję markerów pluripotencji we wszystkich użytych do analiz komórek iPSC
- Utworzenie wszystkich rycin i tabel zawartych w artykule, z wyjątkiem Fig. 2



.....
Podpis autora korespondencyjnego

Poznań, 06.09.2023r.

Dr hab. Maciej Figiel, prof. ICHB
Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

OŚWIADCZENIE AUTORA KORESPONDENCYJNEGO ARTYKUŁÓW ZAWARTYCH W ROZPRAWIE

Tytuł artykułu naukowego: „Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling”.

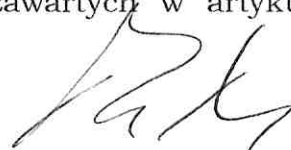
Autorzy: Świtońska K, Szlachcic WJ, Handschuh L, Wojciechowski P, Marczak Ł, Stelmaszczuk M, Figlerowicz M*, Figiel M*.

Czasopismo: Frontiers in Cellular Neuroscience

Data opublikowania: styczeń 2019

Oświadczam, że wkład autorski mgr inż. Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej w artykuł naukowy zatytułowany „Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling” obejmuje:

- Znaczny udział w pisaniu publikacji
- Interpretację wyników otrzymanych po sekwencjonowaniu RNA (RNA-seq) komórek HD iPSC, uzyskanych od pacjentów z młodzieńczą formą choroby Huntingtona i komórek kontrolnych
- Przeprowadzenie części eksperymentów qPCR walidujących wyniki uzyskane z RNA-seq
- Hodowlę komórek HD iPSC i komórek kontrolnych, uzyskanie materiału komórkowego oraz przygotowanie go do eksperymentów proteomicznych (MS), które obejmowały analizę ilościową białek w komórkach HD iPSC oraz w komórkach kontrolnych
- Analizy bioinformatyczne wszystkich danych otrzymanych w eksperymentach transkryptomicznych i proteomicznych
- Przeprowadzenie eksperymentu potwierdzającego ekspresję markerów pluripotencji we wszystkich użytych do analiz komórek iPSC
- Utworzenie wszystkich rycin i tabel zawartych w artykule, z wyjątkiem Fig. 2



.....
Podpis autora korespondencyjnego

Maciej Figiel

Poznań, 06.09.2023r.

Mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska
Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

OŚWIADCZENIE KANDYDATA DO NADANIA STOPNIA DOKTORSKIEGO

Tytuł artykułu naukowego: „Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data”.

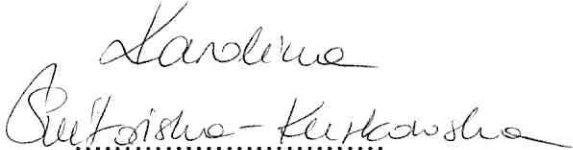
Autorzy: Świtońska-Kurkowska K, Krist B, Delimata J, Figiel M*.

Czasopismo: Frontiers in Cell and Developmental Biology

Data opublikowania: lipiec 2021

Oświadczam, że mój wkład autorski w artykuł naukowy zatytułowany „Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data” obejmuje:

- Znaczny udział w pisaniu publikacji
- Wybór i zebranie wszystkich dostępnych danych transkryptomycznych i proteomicznych do późniejszych analiz bioinformatycznych
- Przeprowadzenie wszystkich analiz bioinformatycznych i zaprojektowanie sposobu ich przedstawienia
- Przygotowanie wszystkich rycin i tabel zawartych w artykule


Podpis kandydata

Poznań, 06.09.2023r.

Dr hab. Maciej Figiel, prof. ICHB
Zakład Neurobiologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

**OŚWIADCZENIE AUTORA KORESPONDENCYJNEGO
ARTYKUŁÓW ZAWARTYCH W ROZPRAWIE**

Tytuł artykułu naukowego: „Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data”.

Autorzy: Świtońska-Kurkowska K, Krist B, Delimata J, Figiel M.

Czasopismo: Frontiers in Cell and Developmental Biology

Data opublikowania: lipiec 2021

Oświadczam, że wkład autorski mgr inż. Karoliny Świtońskiej-Kurkowskiej w artykuł naukowy zatytułowany „Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data” obejmuje:

- Znaczny udział w pisaniu publikacji
- Wybór i zebranie wszystkich dostępnych danych transkryptomicznych i proteomicznych do późniejszych analiz bioinformatycznych
- Przeprowadzenie wszystkich analiz bioinformatycznych i zaprojektowanie sposobu ich przedstawienia
- Przygotowanie wszystkich rycin i tabel zawartych w artykule



.....
Podpis autora korespondencyjnego

Maciej Figiel



Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling

Karolina Świtońska¹, Wojciech J. Szlachcic¹, Luiza Handschuh¹, Paweł Wojciechowski^{1,2}, Łukasz Marczak¹, Michał Stelmaszczuk¹, Marek Figlerowicz^{1*} and Maciej Figiel^{1*}

¹ Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland, ² Institute of Computing Science, Poznań University of Technology, Poznań, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:

Rosanna Parlato,
Ulm University, Germany

Reviewed by:

Marta Biagioli,
University of Trento, Italy
Maciej Maurycy Lalowski,
University of Helsinki, Finland

*Correspondence:

Marek Figlerowicz
marek.figlerowicz@ibch.poznan.pl
Maciej Figiel
mfigiel@ibch.poznan.pl

Received: 05 July 2018

Accepted: 19 December 2018

Published: 18 January 2019

Citation:

Świtońska K, Szlachcic WJ, Handschuh L, Wojciechowski P, Marczak Ł, Stelmaszczuk M, Figlerowicz M and Figiel M (2019) Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling. *Front. Cell. Neurosci.* 12:528. doi: 10.3389/fncel.2018.00528

In Huntington disease (HD) subtle symptoms in patients may occur years or even decades prior to diagnosis. HD changes at a molecular level may begin as early as in cells that are non-lineage committed such as stem cells or HD patients induced pluripotent stem cells (iPSCs) offering opportunity to enhance the understanding of the HD pathogenesis. In addition, juvenile HD non-lineage committed cells were previously not directly investigated in detail by RNA-seq. In the present manuscript, we define the early HD and juvenile HD transcriptional alterations using 6 human HD iPSC cell lines from two patients, one with 71 CAGs and one with 109 CAG repeats. We identified 107 (6 HD lines), 198 (3 HD71Q lines) and 217 (3 HD109Q lines) significantly dysregulated mRNAs in each comparison group. The analyses showed that many of dysregulated transcripts in HD109Q iPSC lines are involved in DNA damage response and apoptosis, such as CCND1, CDKN1A, TP53, BAX, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, DDB2, PLCB1, PRKCCQ, HSH2D, ZMAT3, PLK2, and RPS27L. Most of them were identified as downregulated and their proteins are direct interactors with TP53. HTT probably alters the level of several TP53 interactors influencing apoptosis. This may lead to accumulation of an excessive number of progenitor cells and potential disruption of cell differentiation and production of mature neurons. In addition, HTT effects on cell polarization also demonstrated in the analysis may result in a generation of incorrect progenitors. Bioinformatics analysis of transcripts dysregulated in HD71Q iPSC lines showed that several of them act as transcription regulators during the early multicellular stages of development, such as ZFP57, PIWIL2, HIST1H3C, and HIST1H2BB. Significant upregulation of most of these transcripts may lead to a global increase in expression level of genes involved in pathways critical for embryogenesis and early neural development. In addition, MS analysis revealed altered levels of TP53 and ZFP30 proteins reflecting the functional significance of dysregulated mRNA levels of these proteins which were associated with apoptosis and DNA binding. Our finding very well corresponds to the fact that mutation in the HTT gene may cause precocious neurogenesis and identifies pathways likely disrupted during development.

Keywords: polyglutamine (polyQ), neurodevelopmental disease, iPSC, stem cells, neurodegenerative, Huntington disease, HD, RNA sequencing

INTRODUCTION

Huntington disease (HD) is a fatal dominantly inherited neurodegenerative disorder, caused by expansion of cytosine-adenine-guanine (CAG) repeats in exon 1 of the huntingtin (*HTT*) gene, resulting in elongated polyglutamine tract in HTT protein (MacDonald et al., 1993). HD symptoms are characterized by a general lack of coordination, progressive motor dysfunction accompanied by cognitive decline, psychiatric disturbances all leading to dementia (Victorson et al., 2014). The pathology of HD is most extensively localized in the central nervous system and includes striatal neuronal cell death followed by atrophy of the cerebral cortex, subcortical white matter, thalamus, hypothalamus, and other brain regions (Jimenez-Sanchez et al., 2017). Despite the fact that HD has a much-delayed clinical onset, subtle symptoms in patients may occur years or even decades prior to diagnosis. HD symptoms often aggravate with increasing number of CAG repeats and number of CAG repeats above 60 may result in disease onset occurring early in life, before age of 20 or even in childhood manifesting as juvenile HD (JHD) (Quarrell et al., 2013). Lack of HTT protein in an embryo is lethal probably because of HTT essential function in gastrulation (Saudou and Humbert, 2016) and for development of the nervous system, among others for development of brain corticostriatal pathways (Godin et al., 2010). Moreover, *HTT* gene is involved in the regulation of various biological processes and cellular activities that are impaired in HD cells, for example, apoptosis, transcription, signal transduction, vesicle-mediated transport, cytoskeleton assembly, centrosome formation and mitochondrial activity (Saudou and Humbert, 2016). In addition, a growing number of evidence points to HD as a neurodevelopmental disorder (Wiatr et al., 2018). In such context, the pathogenic function of mutant HTT in embryonic cells is not fully understood. The molecular HD changes begin at early cellular stages, even in cells that are not yet lineage committed such as stem cells. The molecular changes in the HD iPSC lines included MAPK signaling, increase in *SOD1* expression and decreased expression of *TP53* (Szlachcic et al., 2015) and changes of neurodevelopmental pathways (Ring et al., 2015). To date, high throughput transcriptional profiling focused on neuronal stem cells derived from HD patient iPSCs and demonstrated HD dysregulated genes and pathways, connected with GABA signaling, axonal guidance and calcium influx (HD iPSC Consortium, 2012, 2017). Until now, the single research group reported RNA-seq data on undifferentiated human HD iPSCs with 71 CAG repeats (Ring et al., 2015). However, no reports compared cells from juvenile patients with different number of CAG repeats and age of disease onset. A focus on pluripotent juvenile HD cells with a distinct number of CAG will be valuable for understanding the earliest events in HD pathogenesis and their impact on later developmental events and HD clinical picture. For example, it is unknown if pathways dysregulated already in stem cells may contribute to cell fate specification failures in HD.

We aimed here to reveal transcriptional changes in juvenile HD iPSC lines in order to identify dysregulated transcripts that may be involved in pathways critical for the

early, neurodevelopmental HD pathogenesis. Therefore, we investigated the transcriptional profiles of several lines of HD juvenile iPSC with 71 and 109 CAG repeats using RNA-seq. We identified commonly dysregulated genes for both HD71Q and HD109Q iPSC lines and also unique genes dysregulated in sets HD lines with different CAG repeats. The mRNA profiling was followed by qRT-PCR validation of several mRNAs and bioinformatics analyses and also the mass spectrometry assay of proteins. As a result, we pointed out the involvement of several dysregulated transcripts and proteins in several biological processes crucial for proper neurodevelopment. In view of these results, it can be assumed that the molecular processes underlying juvenile HD begin as early as in stem cells in initial stages of embryo development.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were conducted in accordance with the relevant guidelines and established standards.

Human HD iPSC Cells Culture

Human episomal HD and control iPSC lines were obtained from the NINDS Human Genetics Resource Center DNA and Cell Line Repository¹. For the analysis, we used three clonal HD lines with 71 CAG repeats (ND42228, ND42229, ND42230; derived from a 20-year-old patient), three juvenile HD clonal lines with 109 CAG repeats (ND42222, ND42223, ND42224; derived from a 9-year-old patient) control lines (two clonal lines with 17/18 (ND41654, ND41658) and one line with 21 (ND42245) CAG repeats. Human iPSCs were cultured in chemically defined conditions in Essential 8 medium (Life Technologies) and grown on recombinant human vitronectin-coated surfaces (VTN-N, Life Technologies). Cells were passaged using gentle dissociation with 0.5 mM EDTA in PBS.

RNA Isolation and Assessment

After medium removal, iPSC cells were washed once with PBS and subsequently covered with 1 mL of RNazol RT RNA Isolation Reagent (GeneCopoeia, Inc.), scraped and frozen in -80°C . Upon thaw, total RNA isolation was performed according to the manufacturer's protocol with 75% ethanol, isopropanol, and RNase-free water. Isolated total RNA was then treated with TURBO DNase (ambion) and purified with QIAquick[®] Nucleotide Removal Kit (QIAGEN). Each reaction was performed in PCR probes and contained 10 μg of RNA sample, 10x TURBO Buffer, RNaseOUT (Invitrogen), DNase TURBO and RNase-free water. The reaction mix was incubated in 37°C for 30 min and transferred to 1.5 ml Eppendorf tubes. Purification was performed according to the manufacturer's protocol. RNA content was measured on NanoDrop. RNA quality and integrity were validated using capillary electrophoresis (2100 Bioanalyzer, Agilent). Average RNA Integrity Number (RIN) for all samples was 9.78, where 10 is the highest score.

¹<https://catalog.coriell.org/1/ninds>

Library Preparation and RNA Sequencing

For RNA-seq, total RNA was extracted from 9 samples, including 3 from control iPSC lines, 3 from clonal iPSC lines with 71 CAG repeats and 3 from clonal iPSC lines with 109 CAG repeats. RNA was analyzed with Bioanalyzer 2100 and RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States). Libraries were prepared from 5 µg of total RNA with RIN > 9.3, using KAPA Stranded mRNA-seq Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, United States) and NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA, United States). 9 pM-indexed libraries were sequenced with the use of Illumina HiSeq2000, rapid run with paired-end 75 bp reads. On average, 65 mln reads were collected per library (**Supplementary Figure S1**).

RNA-seq Data Statistical Analysis

NGSQCToolkit (v 2.2.3) (Patel and Jain, 2012) was used to generate quality metrics for assessment of FASTQ input files. Statistics generated by the above-mentioned tool was used to generate two charts which show the average quality score on the base positions for iPSC lines separately in R. Fastq files were then aligned to the GRCh38.p10 reference genome using STAR (v 2.5.3a) (Dobin et al., 2013) with default parameters suggested by QoRTs (v 1.3.0) (Hartley and Mullikin, 2015) used for genes and exons hits count. After alignment and hits counting, the differential gene expression was calculated using the Bioconductor package DESeq2 (v 1.14.1) (Love et al., 2014) and it consisted mainly of estimation of size factor and dispersion. The genes with significant differential expression were detected by DESeq2 pipeline and manually checked in order to find genes where outliers (automatic outliers detection with replacing their expression by mean across replicates is recommended for a larger number of replicates) influenced the mean expression of replicates. Dysregulated X and Y chromosome genes were excluded from DESeq2 analysis. After calculation of the differential expression by DESeq2, the shrinkage of effect size was performed (function lfcShrink of DESeq2 package). Then, for the results, the base mean expression against the log₂ fold change (MA plots) were plotted with significant genes marked in red (plotMA from DESeq2 package). The gene counts were transformed to the log₂ scale and normalized with respect to the library size (rlog function). Then, the Principal Component Analysis (PCA) was performed, and a chart was generated automatically by plotPCA DESeq2 function. For each normalized gene count for each sample the total mean gene expression was subtracted and based on the result, the heat map chart was prepared for manually selected list of genes (pheatmap function from pheatmap_1.0.10 package). All the RNA-seq data were uploaded to the GEO repository (accession number GSE124664).

RT-PCR and Quantitative Real Time PCR

Reverse transcription was performed using Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) (200U per reaction) on 2 µg of RNA in 20 µl of total reaction according to the manufacturer's protocol. For priming a mixture of random hexamers (25 pmol) and oligo(dT) 18 (25 pmol) was used. Additionally, RiboLock RNase inhibitor was added to the

reaction mix (20U). Before adding the enzyme and the inhibitor, templates were denatured in 65°C for 5 min; after mixing all reaction reagents reaction was incubated for 10 min at 25°C followed by 15 min at 50°C. Resulting cDNA was further 10 times diluted with nuclease-free water and stored in -20°C. RT- controls were included. RT-PCR products from all HD lines were checked for reference gene (*GAPDH*) and several pluripotency markers, including *SOX2*, *NANOG*, *OCT4* and *LIN28A* (**Supplementary Figure S2**).

qPCR was performed using HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (SOLIS BIODYNE) on 1 µl of cDNA in 10 µl of total reaction volume. Reaction mix included 250/125 nM primers. Primers are listed in **Supplementary Table S1**. Thermocycling parameters were as follows: 12 min of initial denaturation at 95°C and 45 three-step cycles with 15 s denaturation at 95°C; 20 s annealing at 60–64°C and 20 s elongation at 72°C. The reaction was run on CFX96 instrument (Bio-Rad). Specificity of reaction for each primer pair was confirmed by agarose gel electrophoresis and EtBr staining. For each primer calibration curves were prepared within 10¹ to 10⁻⁴ cDNA concentration; slope, y intercepts, PCR efficiency, r², linear dynamic range and CIs were calculated. Details for each primer set are included in **Supplementary Table S1**. Each qPCR plate included a calibrator, non-treated control (NTC) and samples were run in duplicates. For each cDNA template, a corresponding RT- sample was amplified; none of the analyzed samples had a positive signal of RT- reaction. Data was obtained and analyzed using CFX Manager 3.1 (Bio-Rad). Cq values were determined in software using the regression model and were exported to Excel for further analyses. *GAPDH*, *PGK1*, and *Clorf43* were used as reference genes.

Log₂ NRQ was calculated as follows for each gene. First, a mean Cq was calculated for each sample as an arithmetical mean of technical replicates Cq values. Then the mean Cq values were corrected for a gene's amplification efficiency by its multiplication by Log₂ of E . E values was calculated as a $(\%Efficiency * 0.01 + 1)$. Next, Relative Quantities (RQ) were calculated for each sample as the exponentiation of the efficiency corrected mean Cq of a sample subtracted from the arithmetic mean Cq of control samples mean Cqs, with the base of E , which is $E^{[(\text{arithmetic mean of control samples Cqs}) - \text{sample Cq}]}$. Normalized Relative Quantities (NRQ) for each sample were calculated by dividing a gene of interest (GOI) RQ by Normalization Factor (NF). Normalization factor for each sample was calculated as a geometrical mean of Reference Genes (REF) RQs of that sample. Next, a base 2 logarithm was calculated from NRQ values and the resulting symmetrical Log₂ NRQ value for each sample and GOI was visualized as a dot in a scatter plot together of Mean Log₂ NRQ for each genotype. To calculate 95% CI in an RQ for genotype (geometrical mean of mean genotype Cqs) and genotype Standard deviation (from Mean genotype Cqs) were calculated. Based on these values NF and NRQ were calculated as before (genotype NF and genotype NRQ). Error propagation was calculated in subsequent steps: $RQ\ SD = \text{genotype SD} * \text{genotype RQ} * \ln(E)$, then $SD\ NF = NF * \sqrt{(\sum(SD\ RQ/X * \text{genotype RQ})^2) REF1toX}$, where X is number of REF genes; $SD\ NRQ = \text{genotype NRQ}$

* $\sqrt{((SD\ NF/NF)^2 + (SD\ RQ/RQ)^2)}$, then $SE\ NRQ = SD\ NRQ/\sqrt{(\text{genotype } N)}$, where N is number of samples per genotype, then $SE\ Log_2\ NRQ = SE\ NRQ/(\text{genotype } NRQ * \ln(2))$. The final Combined-SE $Log_2\ NRQ$, which combines SE of a disease genotype with SE of a control genotype is $\sqrt{((SE\ log_2\ NRQ\ dis)^2 + (SE\ log_2\ NRQ\ ctrl)^2)}$. Upper and lower 95% CI limits were as follows: $CI = Log_2\ NRQ \pm s * \text{Combined-SE } Log_2\ NRQ$, where s is a scaling parameter value from a t-Student table for $N-1$ degrees of freedom and 0.05 confidence.

Bioinformatics Analysis

Two open source platforms were used for the bioinformatics analysis of significantly differentiated transcripts, including ConsensusPathDB (CPDB) (Herwig et al., 2016), and ClueGO (Cytoscape plug-in) (Bindea et al., 2009, 2013). A simple meta-analysis, considering data from several publications, was also performed. As considered to be significantly dysregulated, transcripts with $padj < 0.05$ were submitted to the analyses. As genes identifier type, HUGO Gene Nomenclature Comity symbols (HGNC) symbols were chosen.

Genetic, Biochemical, and Protein Interaction Analyses

A list of differentially expressed mRNAs was submitted to the web interface of CPDB for induced network modules analysis to create a network of different types of functional interactions between transcripts. CPDB collects data from 32 public resources, such as Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Wikipathways, Reactome, Pathway Interaction Database (PID) and BioGRID, and integrate them to create networks containing different types of interactions.

We performed three separate analyses, one for each comparison group. We pasted a list of significantly dysregulated mRNAs in both HD lines and only in HD71Q or HD109Q lines. 63, 73, and 69% of accession numbers from the input lists were mapped to proteins in CPDB, respectively. Identifiers which were not mapped are listed in the **Supplementary Table S2**. In the next step, we chose protein, genetic, biochemical and gene regulatory interactions to be considered. For protein interactions confidence filter, we decided to choose high and medium confidence in the analysis considering both HD lines and high, medium and low confidence in the two following analyses. We set intermediate nodes z-score threshold to 30 in the analysis considering transcripts DE in both HD iPSC lines. Intermediate nodes were excluded from the analyses for genes dysregulated only in 71Q or 109Q HD lines. Nodes which were additionally added to the generated network and which were placed peripherally were deleted from the network in order to make the whole protein complex clearer. What is more, in order to visualize down- and upregulation in created networks we decided to upload $log_2\text{FoldChange}$ values for transcripts, obtained during the RNA-seq data statistical analysis. In order to do that, we chose the overlay values option.

Over-Representation and Enrichment Analyses

Over-representation and Gene Ontology (GO) enrichment analyses were conducted in CPDB to reveal overrepresented

functional terms in the genomic background. Pathway-based sets and Gene Ontology-based sets were the two chosen categories of pre-defined gene sets among which over-represented terms were searched. Pre-defined sets contain proteins and/or genes that are together annotated with a specific pathway or GO term. A list of significantly dysregulated transcripts was submitted to the analysis ($p < 0.05$). For the pathway-based sets, search settings were set to 2 minimum overlap with input list and p -value cutoff = 0.01. Gene ontology level 4 and 5 were chosen to identify overrepresented biological processes, molecular functions, and cellular components. GO terms showing $p < 0.01$ were regarded as significantly enriched.

Enrichment analysis and data visualization were also performed with ClueGO app, which is another Cytoscape plug-in. It analyzes interrelations of terms and functional groups in biological networks. Gene identifier sets were directly uploaded in a simple text format. Few adjustments were made to reveal functional clusters for submitted transcripts. Analysis mode was set to “ClueGO: Function,” network specificity was set as default, between medium and detailed although much closer to the medium value. The visual style was set to “Groups.” We also selected “Use GO Term Fusion” function, which fuses GO parent-child terms based on similar associated genes, and “Show only Pathways with $pV \leq 0.05$.” In the advanced term/pathway selection options, no changes were made. In the advanced statistical options enrichment/depletion (two-sided hypergeometric test) was chosen and the pV correction, which refers to the most significant pVs , was set to “Bonferroni step down.” The preferred layout was set to Organic Layout (yFiles).

Meta-Analysis of Differences in Gene Expression

Nine works listed in **Table 1**, all containing HT (microarray, RNA-seq) data on human HD cells, were selected for the meta-analysis. The analysis was performed similarly as previously (Wiatr et al., 2018), but with the inclusion of the additional data from the recent HD consortium publication (HD iPSC Consortium, 2017) and in order to compare dysregulated genes from these other publications with dysregulated genes obtained from our work. The names of the dysregulated genes or proteins were retrieved from 9 original publications and were sorted into 4 separate lists. We did not distinguish between the dysregulated genes/proteins identified in transcriptomic and proteomic experiments. Names of genes and names of genes

TABLE 1 | List of publications used for the meta-analysis of differences in gene expression.

Publication reference

Ring et al., 2015
 HD iPSC Consortium, 2012
 HD iPSC Consortium, 2017
 An et al., 2012
 McQuade et al., 2014
 Chae et al., 2012
 Nekrasov et al., 2016
 Chiu et al., 2015
 Feyeux et al., 2012

corresponding to dysregulated proteins were subsequently listed as HGNC symbol. We established a list containing names of genes dysregulated in ESC, iPSC, NSC, and neurons. The genes overlapping between lists, and the genes reported in more than one of the nine studies included in the meta-analysis, were identified using MS Excel formulas.

Protein Extraction, Ultrafiltration, and Digestion for Proteomics Analysis

Each cell line was collected for lysis in buffer containing 1 M triethylammonium bicarbonate (TEAB) and 0.1% SDS. The material was subjected to a threefold cycle of freezing and thawing followed by bath sonication for 3-min repeated three times while cooling the tube on ice in between the sonication. The material was centrifuged in $8,000 \times g$ for 10 min and the supernatant was collected. Lysates were then ultra-filtrated using Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter 3 kDa Devices (MERCK) to remove any remnants of culture media. The device was pre-rinsed with milli-Q water and 600 μ L of lysate was subjected to a fivefold cycle of centrifugation with a fresh amount of TEAB buffer in $7,500 \times g$ for 5 min. Proteins in clear concentrate were estimated using 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences). Ten μ g of total protein per sample were diluted with 15 μ l of 50 mM NH_4HCO_3 , reduced with 5.6 mM DTT for 5 min at 95°C followed by alkylation with 5 mM iodoacetamide for 20 min in the dark at RT. Subsequently, the proteins were digested with 0.2 μ g of sequencing-grade trypsin (Promega) overnight at 37°C followed by label free quantitative proteomics.

Mass Spectrometry Analysis of Proteins

Analysis of protein extracts was done on Dionex UltiMate 3000 RSLC nanoLC System coupled with QExactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Peptides derived from in-solution digestion of proteins were separated on a reverse phase Acclaim PepMap RSLC nanoViper C18 column ($75 \mu\text{m} \times 25 \text{cm}$, $2 \mu\text{m}$ granulation) using acetonitrile gradient (from 4 to 60%, in 0.1% formic acid) at 30°C and a flow rate of 300 nL/min (for 185 min). Mass spectra were acquired in a semi-targeted method using two analysis modes. First was a classic data-dependent mode with top 10 data-dependent MS/MS scans, and second, was scheduled MS/MS mode with inclusion list containing peptide sequences chosen based on protein targets selected from previous transcriptome analysis. The target value for the full scan MS spectra was set to $1\text{e}6$ with a maximum injection time of 100 ms and a resolution of 70,000 at m/z 400. The 10 most intense ions charged two or more were selected with an isolation window of 2 Da and fragmented by a higher energy collisional dissociation with NCE 28. The ion target value for MS/MS was set to $5\text{e}4$ with a maximum injection time of 100 ms and a resolution of 17,500 at m/z 400.

Analysis of Proteomic Data

Protein identification was performed using UniProt human database (March 2017, 137404 entries) with a precision tolerance 10 ppm for peptide masses and 0.08 Da for fragment

ion masses. For protein identification and quantification, all raw data obtained were analyzed using MaxQuant 1.5.3.30 (Max Planck Institute of Biochemistry, Munich) (Cox and Mann, 2008). Obtained normalized data were imported to Perseus 1.6.1.3 software (Max Planck Institute of Biochemistry, Munich) (Tyanova et al., 2016). All numeric values corresponding to protein intensity were transformed to a logarithmic scale, and all samples were grouped using categorical annotation. Missing values were then replaced by imputation and PCA analysis was performed. For protein differentiation, ANOVA test was performed with the p -value calculation used for protein truncation. The proteins were annotated for chromosome localization and all proteins translated from genes located on X and Y chromosomes were removed from the list. Then, for the clustering analysis, the data were normalized for each compound using the Z-score algorithm.

RESULTS

Early Transcriptional Changes in Human HD iPSC Lines Revealed by Next-Generation High-Throughput RNA Sequencing

Strand-specific RNA-seq of the whole transcriptome was performed using clonal lines from 2 HD patients with 71 or 109 CAG repeats in exon 1 of the HTT gene, and 2 healthy individuals, with 17/18 and 21 CAG repeats, to comprehensively identify mRNAs related to HD. A DESeq2 pipeline for transcripts of HD was developed to identify significantly dysregulated mRNAs. During the RNA-seq data analysis, we compared 6 HD iPSC lines derived from both patients (71Q and 109Q) with control lines and also compared separately each set of three HD lines from one patient with three control lines. As a result of such an approach, we generated statistical values for three comparison groups, HD vs. WT, HD71Q vs. WT, and HD109Q vs. WT (**Supplementary Table S3**). Heat map diagram, PCA graph and MA plots were generated for differential gene expression analysis (**Figures 1A–D** and **Supplementary Figures S3, S4**).

We set the padj cutoff value to create lists of significantly dysregulated mRNAs in each comparison group. Transcripts with $\text{padj} < 0.05$ were considered to be differentially expressed. In the first group, comparing HD iPSC lines (71Q and 109Q) with control lines, 107 significantly dysregulated mRNAs were identified (31 downregulated and 76 upregulated). In HD71Q iPSC lines 198 differentially expressed mRNAs were identified (64 downregulated and 134 upregulated). In the last group, in which HD109Q lines were compared with control lines, 217 significantly dysregulated mRNAs were identified (111 downregulated and 106 upregulated). The number of transcripts differentially expressed in both HD lines and in each line separately is shown on the Venn diagram (**Figures 1E,F**). We have focused our experimental validation and further bioinformatics analyses on these mRNAs (**Supplementary**

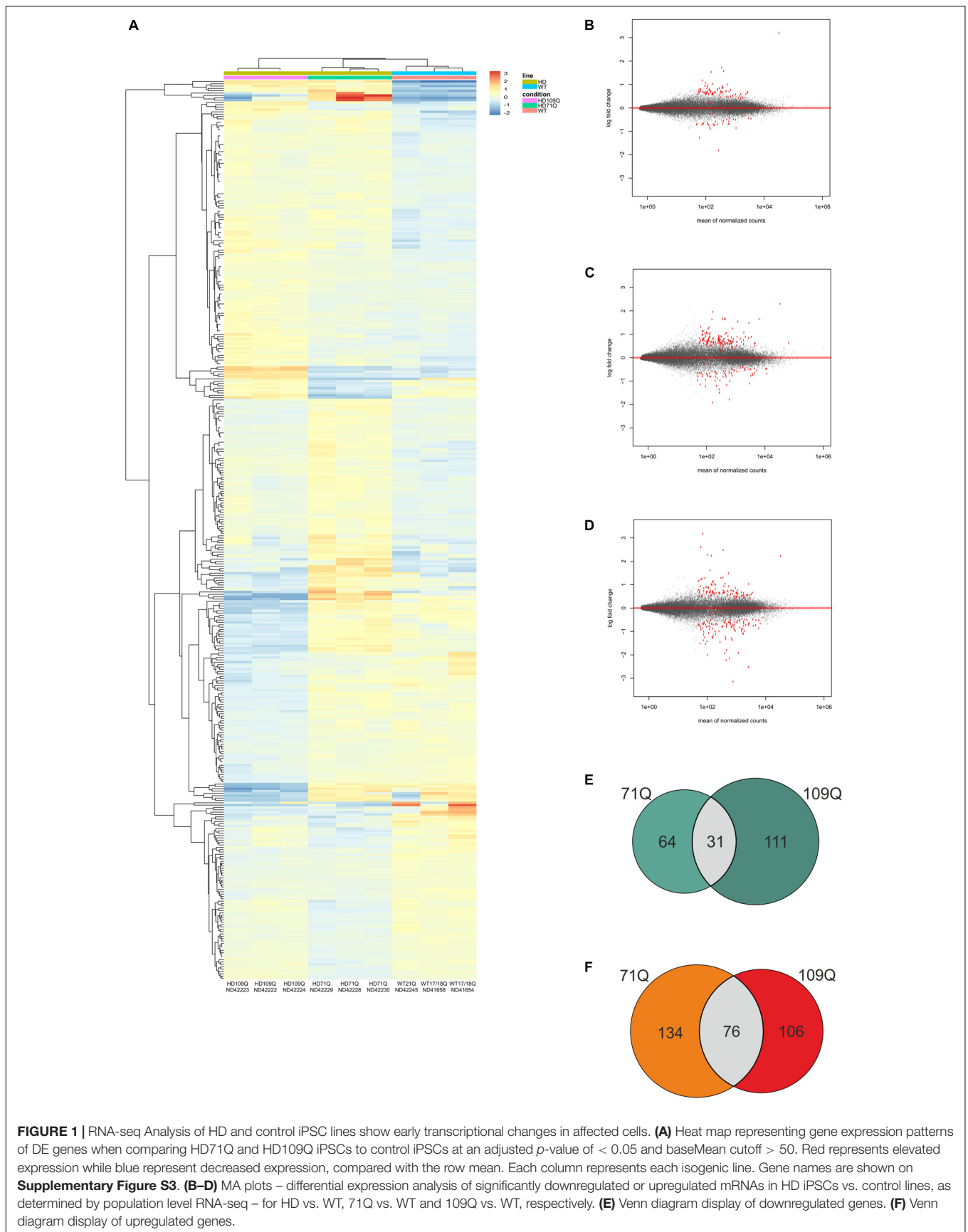


TABLE 2 | Top 30 the most dysregulated mRNAs in HD iPSC lines (71Q and 109Q) when compared to control lines.

Symbol	Ensembl gene	Log2FoldChange	p-value	padj
<i>U1</i>	ENSG00000277918	6.253425519	7.44E-118	1.60E-113
<i>NANOGP8</i>	ENSG00000255192	4.839594108	1.77E-30	1.90E-26
<i>ALG10B</i>	ENSG00000175548	3.418278891	4.27E-26	3.06E-22
<i>CBSL</i>	ENSG00000274276	-3.09690354	8.47E-23	4.55E-19
<i>OTOGL</i>	ENSG00000165899	3.170966795	9.53E-20	4.10E-16
<i>TRIM69</i>	ENSG00000185880	1.140358901	1.69E-17	6.07E-14
<i>CNTNAP3B</i>	ENSG00000154529	-2.300972053	6.27E-12	1.93E-08
<i>TAS2R64P</i>	ENSG00000256274	1.893607772	1.09E-11	2.93E-08
<i>AC005276.1</i>	ENSG00000197462	4.247092094	1.45E-10	3.11E-07
<i>MEIOB</i>	ENSG00000162039	1.950419866	1.92E-09	2.96E-06
<i>LINC00649</i>	ENSG00000237945	1.07452898	2.69E-09	3.85E-06
<i>C3</i>	ENSG00000125730	1.347898641	6.03E-09	8.11E-06
<i>AC003973.3</i>	ENSG00000279377	11.45502355	2.81E-08	3.55E-05
<i>AC009005.2</i>	ENSG00000267751	1.298509518	6.23E-08	7.45E-05
<i>ZFP30</i>	ENSG00000120784	0.952711732	7.25E-08	7.80E-05
<i>RP11-78F17.1</i>	ENSG00000263551	1.583170794	6.94E-08	7.80E-05
<i>PARP12</i>	ENSG00000059378	0.870056271	8.53E-08	8.73E-05
<i>XDH</i>	ENSG00000158125	1.073538005	1.12E-07	0.000109785
<i>ZNF208</i>	ENSG00000160321	9.248212473	1.24E-07	0.000111532
<i>ZNF257</i>	ENSG00000197134	7.158769565	1.23E-07	0.000111532
<i>RP11-343H5.4</i>	ENSG00000224114	2.502023616	1.68E-07	0.000144269
<i>ACTA1</i>	ENSG00000143632	-2.644830326	4.07E-07	0.000316863
<i>RPL13P12</i>	ENSG00000215030	-2.978270182	4.10E-07	0.000316863
<i>RP11-114H24.2</i>	ENSG00000260776	1.437940024	4.12E-07	0.000316863
<i>RDM1</i>	ENSG00000278023	0.980241441	8.83E-07	0.000633438
<i>FAM86B3P</i>	ENSG00000173295	1.56869681	1.02E-06	0.000709353
<i>SLC24A3</i>	ENSG00000185052	-0.952696056	1.76E-06	0.001115434

Table S3). Lists of 30 the most dysregulated transcripts for each group were shown in **Tables 2–4**.

A total of 17 differentially expressed mRNAs were selected to verify RNA-seq data by quantitative real-time PCR (qPCR) (**Figure 2**). We have selected 10 mRNAs which were differentially expressed in both HD iPSC lines (*OTOGL*, *TRIM69*, *CNTNAP3B*, *MEIOB*, *C3*, *PARP12*, *XDH*, *CDKN1A*, *ZFP30*, *WDR72*), 4 mRNAs which were differentially expressed in HD71Q iPSC lines (*PIWIL2*, *HIST1H3C*, *FAM65B*, *PDGFB*) and 3 mRNAs differentially expressed in HD109Q iPSC line (*TP53*, *PHLDA3*, *TRIM22*). Validation of transcripts dysregulated in both HD lines confirmed results obtained from the RNA-seq analysis for 7 out of 10 analyzed mRNAs. Validation of chosen transcripts dysregulated only in HD71Q lines was completely consistent with up- and downregulation in RNA-seq data. Last experimental analysis, considering mRNAs dysregulated only in HD109Q lines also showed consistency with RNA-seq (**Figure 2**).

Altered Levels of Proteins Overlap With Several Dysregulated Transcripts in HD iPSC

We performed a mass spectrometry analysis to validate dysregulated transcripts at the protein level (**Figure 3** and **Supplementary Table S4**). As a result, we identified

65 differentiating proteins, however, the proteins from chromosomes X and Y were excluded. Among the proteins which demonstrated statistically significant change, there were TP53 and ZFP30 which were also found in the pool of dysregulated transcripts and which showed the same direction of the level change. These proteins are connected with intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage (TP53) and DNA binding transcription factor activity (ZFP30). Moreover, in support of our transcriptional changes, we found that many of the non-statistically significant proteins demonstrated dysregulation pattern similar to significantly dysregulated transcripts.

Interaction Analysis of HD-iPS Dysregulated Genes Identifies a Network Rich in Transcription Regulators in 71Q Lines, Whereas a Network of TP53-Dependent Genes in 109Q Lines

Using the web interface of CPDB we conducted the interaction- and pathway-centric analysis of list of differentially expressed mRNAs in each comparison group. Induced network modules analysis generates network in which genetic, biochemical and protein interactions between given genes are shown. It also includes genes that are not in the submitted list but connect two

TABLE 3 | List of 30 the most dysregulated mRNAs in HD71Q iPSC lines compared to control lines.

Symbol	Ensembl gene	Log2FoldChange	p-value	padj
<i>U1</i>	ENSG00000277918	6.286072251	7.79E-87	1.68E-82
<i>NANOGP8</i>	ENSG00000255192	5.161894598	1.44E-32	1.55E-28
<i>ALG10B</i>	ENSG00000175548	2.883022339	3.12E-31	2.24E-27
<i>RNF20</i>	ENSG00000155827	-1.182765532	5.15E-25	2.77E-21
<i>PIWIL2</i>	ENSG00000197181	3.194234427	8.65E-23	3.73E-19
<i>OTOGL</i>	ENSG00000165899	3.434955786	1.73E-22	6.20E-19
<i>FAM65B</i>	ENSG00000111913	-2.775405407	8.52E-17	2.62E-13
<i>CBSL</i>	ENSG00000274276	-3.102564495	1.93E-16	5.20E-13
<i>APOBEC3B</i>	ENSG00000179750	-3.283380768	3.00E-16	7.19E-13
<i>MATN2</i>	ENSG00000132561	-1.152507133	5.20E-15	1.12E-11
<i>HIST1H3C</i>	ENSG00000278272	2.979803376	6.11E-15	1.20E-11
<i>ZNF257</i>	ENSG00000197134	8.043476357	4.82E-13	7.99E-10
<i>TRIM69</i>	ENSG00000185880	1.129527997	3.03E-12	4.35E-09
<i>HERC2P9</i>	ENSG00000206149	-1.392763638	4.07E-12	5.48E-09
<i>HIST1H2BB</i>	ENSG00000276410	2.83218348	6.10E-12	7.73E-09
<i>AC003973.3</i>	ENSG00000279377	12.38024867	9.33E-12	1.06E-08
<i>TAS2R64P</i>	ENSG00000256274	2.045242418	3.95E-11	4.25E-08
<i>GOLGA8B</i>	ENSG00000215252	-1.916866228	1.03E-10	1.05E-07
<i>CDKN1A</i>	ENSG00000124762	1.161235447	4.51E-10	4.22E-07
<i>CDH7</i>	ENSG00000081138	-1.86720424	4.50E-10	4.22E-07
<i>ZNF208</i>	ENSG00000160321	10.17366602	4.94E-10	4.43E-07
<i>LINC01535</i>	ENSG00000226686	3.470961414	8.70E-10	6.88E-07
<i>RP11-350D17.3</i>	ENSG00000271369	2.194112973	8.34E-10	6.88E-07
<i>CNTNAP3B</i>	ENSG00000154529	-2.50348849	8.95E-10	6.88E-07
<i>TTC13</i>	ENSG00000143643	-0.888229847	1.24E-09	9.21E-07
<i>ALS2</i>	ENSG00000003393	-0.742660378	2.71E-09	1.95E-06
<i>SULT1A1</i>	ENSG00000196502	-1.632429581	5.08E-09	3.53E-06
<i>AC016582.2</i>	ENSG00000225868	1.648898784	5.67E-09	3.82E-06
<i>MT-ND3</i>	ENSG00000198840	1.052399972	1.94E-08	1.23E-05
<i>THNSL2</i>	ENSG00000144115	-1.443657812	2.46E-08	1.51E-05

or more seed genes with each other and have many connections within the induced network module. Such bioinformatics approach helped us with visualizing biological associations between dysregulated transcripts and their connections with other genes, which may have an impact on HD pathogenesis.

Our first analysis considered mRNAs differentially expressed in both iPSC lines (**Figure 4A**). Proteins for 25 out of 107 dysregulated transcripts were assigned to the generated network. Main observation from the visualized protein complex is that most of seed genes are associated with each other through intermediate nodes which were not present in the input list. Although no obvious center node can be distinguished, *PARK2* seems to be crucial for the whole network as it unites all of the other protein complexes. *PARK2* gene is associated with synaptic vesicle exocytosis and central nervous system development. Among other interesting proteins highlighted in the network, there is *PIK3R1* whose gene is strongly upregulated in both HD iPSC lines and necessary for the insulin-stimulated increase in glucose uptake, but it is also connected with axon guidance and negative regulation of the apoptotic process. Different proteins in the generated network are also involved in signal transduction and nervous system development, like

ARHGAP8, *DPYSL4*, and *FLRT2*. Other biological processes in which visualized proteins are involved are RNA splicing and cell motility.

Second analysis considered mRNAs differentially expressed only in HD71Q iPSC lines (**Figure 4B**). Proteins for 37 out of 198 seed genes were visualized during the analysis. The analysis shows the presence of histones (*HIST1H3C*, *HIST1H2BB*, *HIST1H1A*) and other transcription regulators (*ZNF257*, *BCAS3*) in the network. All of the downregulated genes for which proteins are present in the main network are also connected with transcription regulation, like *MCM5* and *RNF20*. Almost all of the upregulated nodes mentioned above are associated with positive regulation of transcription.

The third analysis, considering mRNAs differentially expressed in HD109Q iPSC lines (**Figure 4C**), shows the crucial role of downregulated transcripts and gene regulatory interactions. Proteins for 41 out of 217 genes from the input list were visualized in the network. The most important protein present in the generated network, with the highest number of edges, is *TP53*. Many of its interactors are, like *TP53* itself, associated with apoptotic signaling, such as tumor necrosis factor receptor superfamily members, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10C*, and

TABLE 4 | List of 30 the most dysregulated mRNAs in HD109Q iPSC lines compared to control lines.

Symbol	Ensembl gene	Log2FoldChange	p-value	padj
<i>U1</i>	ENSG00000277918	6.219895444	4.67E-85	1.09E-80
<i>CDKN1A</i>	ENSG00000124762	-3.933483105	3.37E-73	3.93E-69
<i>PHLDA3</i>	ENSG00000174307	-2.551015174	3.38E-56	2.62E-52
<i>ALG10B</i>	ENSG00000175548	3.802701616	5.17E-54	3.01E-50
<i>TP53</i>	ENSG00000141510	-3.274551066	3.91E-48	1.82E-44
<i>EIF2S3L</i>	ENSG00000180574	3.037222044	6.21E-33	2.41E-29
<i>ASNSP1</i>	ENSG00000248498	5.965875222	4.48E-29	1.49E-25
<i>CDC20P1</i>	ENSG00000231007	4.12484708	6.13E-28	1.79E-24
<i>SNORD3B-1</i>	ENSG00000265185	-3.685369931	2.56E-27	6.64E-24
<i>INPP5D</i>	ENSG00000168918	-2.188602587	4.32E-27	1.01E-23
<i>MIR34A</i>	ENSG00000228526	-2.523159497	5.26E-26	1.11E-22
<i>NANOCP8</i>	ENSG00000255192	4.417935163	2.97E-24	5.77E-21
<i>MUC19</i>	ENSG00000205592	-3.336959246	3.06E-22	5.49E-19
<i>RP11-958N24.2</i>	ENSG00000227827	3.589013767	3.18E-21	5.30E-18
<i>BAX</i>	ENSG00000087088	-1.204461789	2.10E-20	3.26E-17
<i>LINC01021</i>	ENSG00000250337	-3.135350542	2.96E-18	4.31E-15
<i>CRYGEP</i>	ENSG00000229150	2.387074711	4.44E-18	6.10E-15
<i>CBSL</i>	ENSG00000274276	-3.091183178	1.72E-16	2.22E-13
<i>TEC</i>	ENSG00000135605	1.639741292	3.30E-16	4.05E-13
<i>OTOGL</i>	ENSG00000165899	2.83934664	8.89E-16	1.04E-12
<i>FAM86B3P</i>	ENSG00000173295	1.951641415	8.99E-14	9.98E-11
<i>RP11-366M4.11</i>	ENSG00000248632	-4.56130814	4.33E-13	4.59E-10
<i>RP11-632K20.7</i>	ENSG00000223509	1.925042321	8.28E-13	8.40E-10
<i>TRIM69</i>	ENSG00000185880	1.151508188	9.51E-13	9.24E-10
<i>SPATA18</i>	ENSG00000163071	-2.328900814	1.84E-12	1.72E-09
<i>RP11-115D19.1</i>	ENSG00000251095	-3.099666004	1.34E-11	1.11E-08
<i>AEN</i>	ENSG00000181026	-0.980726499	1.71E-11	1.38E-08
<i>HIST3H2BA</i>	ENSG00000181201	-1.810817061	3.56E-11	2.77E-08
<i>LIMCH1</i>	ENSG00000064042	2.500401748	3.98E-11	3.00E-08

TNFRSF10D but also BAX, CDKN1A, PLK2, HSPA1A, and others.

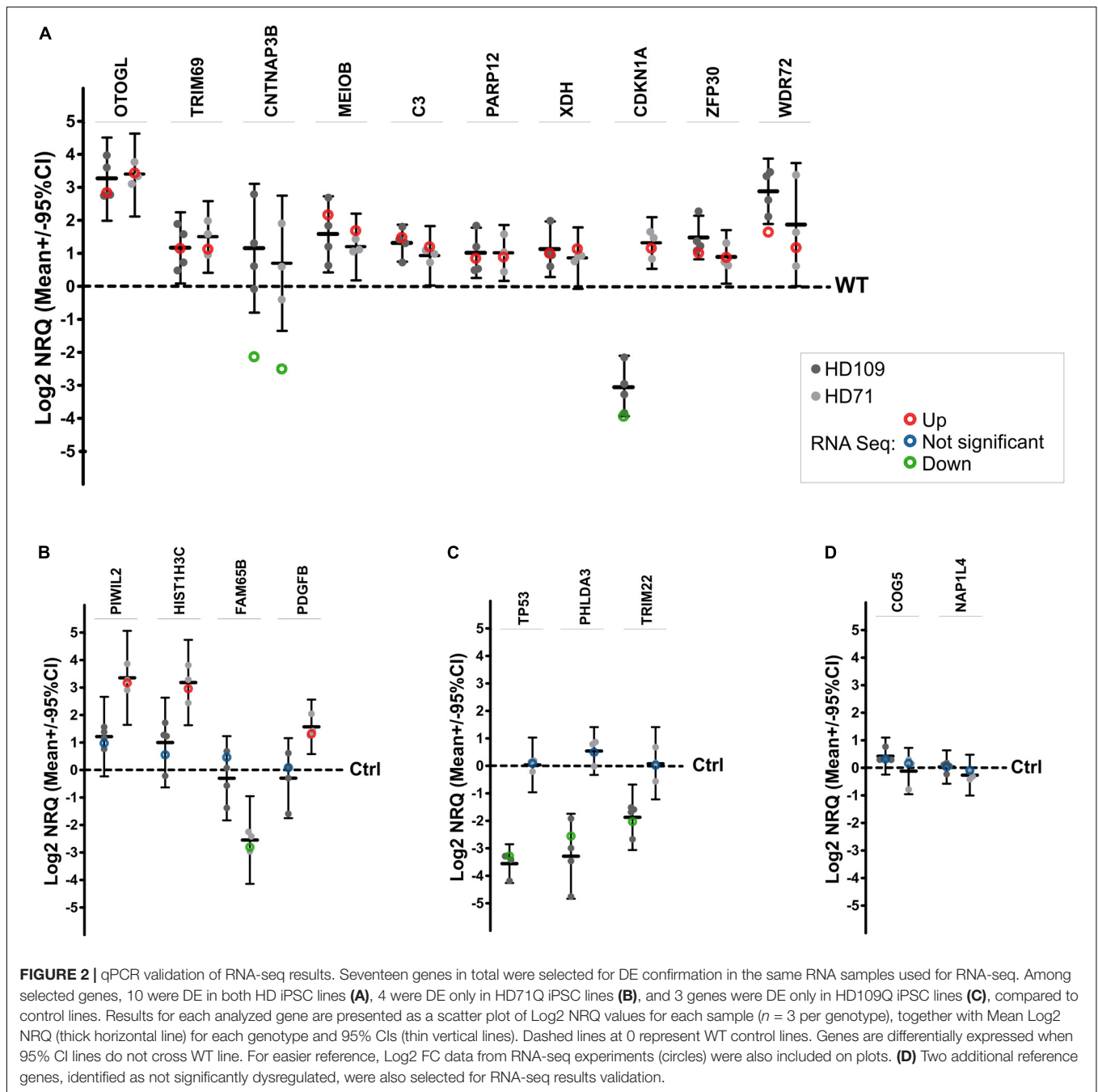
Over-Representation and Enrichment Analyses Based on the Most Differentially Expressed Transcripts

Over-representation and enrichment analyses were performed with significantly dysregulated mRNAs for each comparison group. We used two bioinformatics tools to identify overrepresented gene ontology and pathway-based terms – CPDB and ClueGO.

In each analysis, we have focused on identifying pathway and gene ontology-based gene sets considering molecular functions, biological processes and cellular components (Figure 5). First analysis included the list of differentially expressed mRNAs in both HD iPSC lines. The most overrepresented GO terms, with the biggest number of genes associated with the term were metal ion binding, regulation of cytokine production and GTPase activator activity (Figure 5A). As for the pathway-based analysis, phospholipase c signaling pathway was distinguished as the one with the lowest *p*-value (Supplementary Table S5). Phospholipase-C is known to be key signaling proteins in the cellular action of many hormones, neurotransmitters, growth

factors, and other extracellular stimuli. The input overlap members in this pathway are *PLCB1* and *PIK3R1*. These two genes are also members of pathways associated with Joubert syndrome, a brain development disorder characterized by the agenesis or underdevelopment of the cerebellar vermis and also by the malformed brain stem. Other identified pathways include selective serotonin reuptake inhibitor pathway, reelin signaling pathway, Beta2 integrin cell surface interactions, downstream signaling of activated FGFR1 and apoptosis.

The most overrepresented GO terms obtained due to the analysis of significantly dysregulated transcripts in HD71Q iPSC line included positive regulation of cellular process, metal ion binding and regulation of cellular component organization (Figure 5B). Cellular components with the lowest *p*-value and the higher number of submitted transcripts at the same time referred to ruffle, germ plasm and chromatoid body. As for the pathway-based analysis, transcriptional regulation of white adipocyte differentiation is the one with the lowest *p*-value (Supplementary Table S5). The input overlap members in this pathway are *LPL*, *CEBPA*, and *ANGPTL4*. Other identified pathways are p73 transcription factor network, inflammatory mediator regulation of TRP channels, DNA damage response and lncRNA mediated mechanisms of therapeutic resistance.



Last analysis, which focused on differentially expressed mRNAs in HD109Q iPSC line, revealed the regulation of biological and cellular process and a great number of apoptosis-related terms (Figure 5C). As for the pathway-based analysis, direct p53 effectors and p53 signaling pathway are the most significant among identified pathways (Supplementary Table S5). Other include terms like validated transcriptional targets of TAp63 isoforms, DNA damage response, signaling pathways in glioblastoma, apoptosis modulation and signaling, Wnt signaling pathway and pluripotency and a few viral infection pathways.

Protein complex-based sets of mRNAs, whose protein products are members of the same annotated protein complex, are shown in Supplementary Table S6.

ClueGO overrepresentation and enrichment analysis of transcripts significantly dysregulated in both HD iPSC lines revealed positive regulation of humoral immune response and ion transport by P-type ATPases as GO terms with the lowest p value (Figure 6 and Supplementary Table S7) C3 gene, which is highlighted as associated with the first biological process, is in the top 10 dysregulated transcripts in both HD iPSC lines. Next to C3, there are few other genes that are present in many

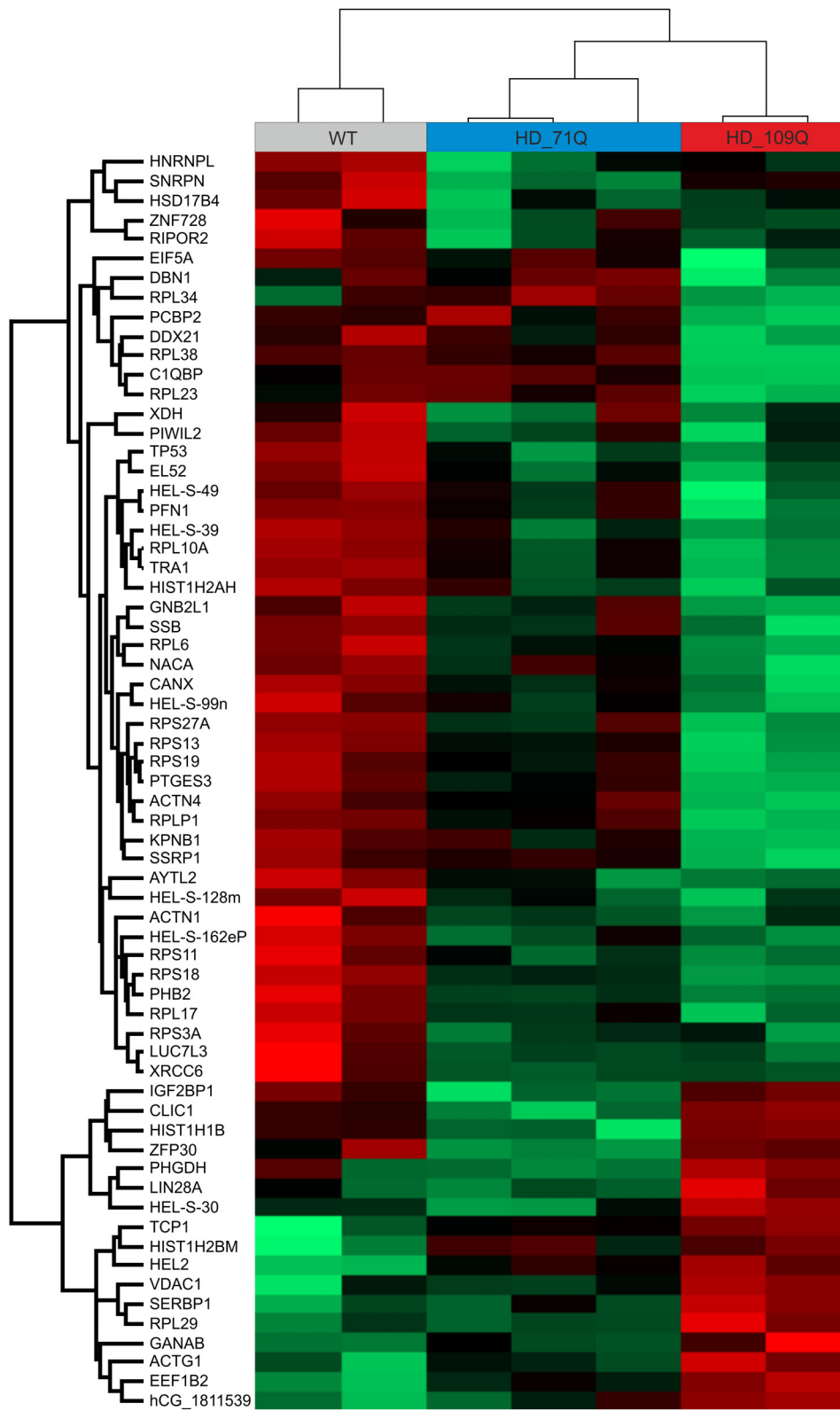


FIGURE 3 | Mass spectrometry analysis of HD and control iPSC lines show early proteomic changes in affected cells. Heat map representing all differentiating proteins identified after comparing HD71Q and HD109Q iPSC lines to control iPSC lines. Red represents elevated level of protein while green represents decreased level of protein. Each column represents each isogenic line. Protein names are shown on the left side.

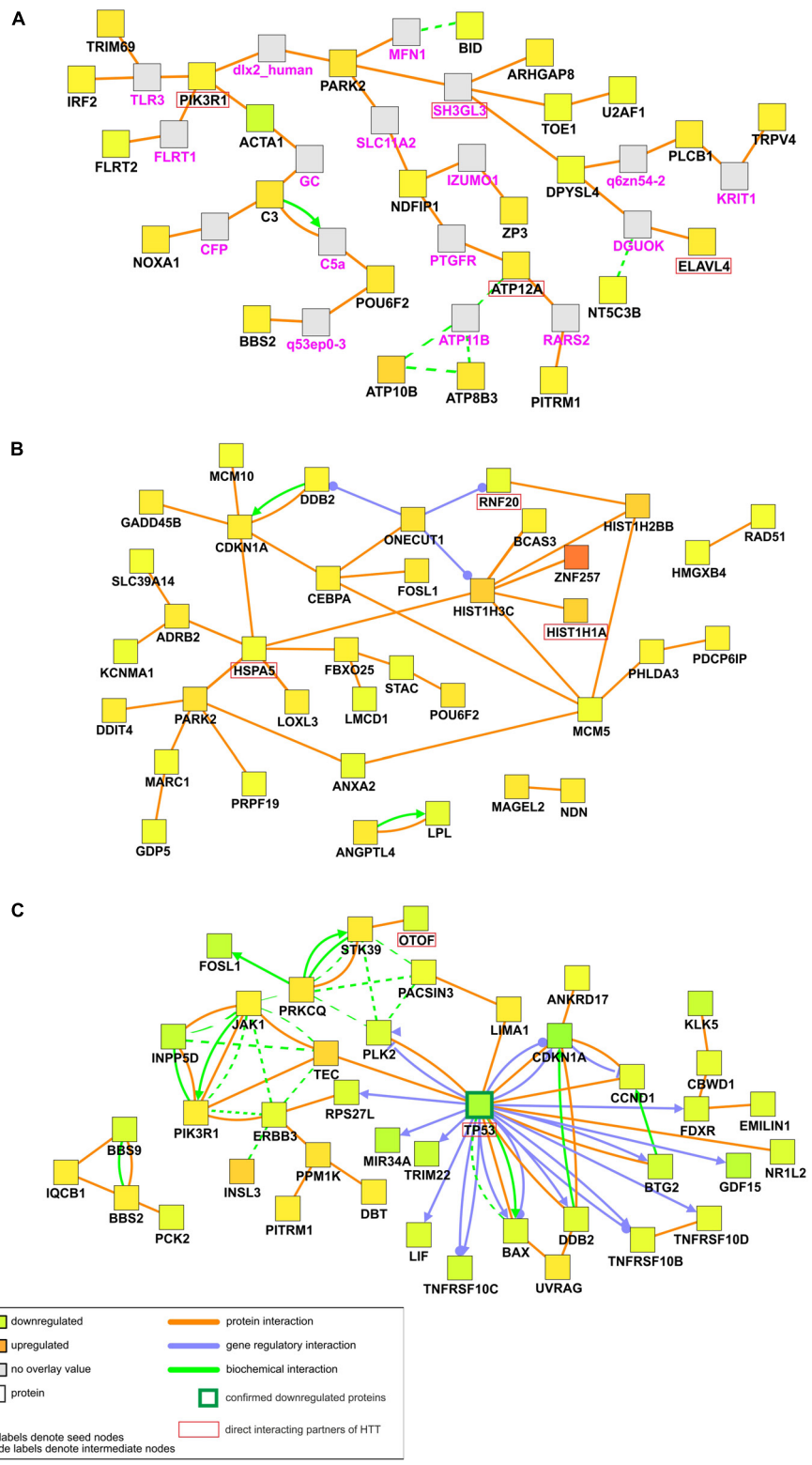


FIGURE 4 | Induced network modules analysis of DE transcripts in HD iPSC lines. CPDB induced network modules aims to connect a list of seed genes via different types of interactions (protein interactions, biochemical interactions, or gene regulatory interactions). Connections are made directly, or via an intermediate node (shown in gray). As considered to be significantly dysregulated, transcripts with adjusted p value of < 0.05 were submitted to the analysis. As genes identifier types, HGNC symbols were chosen. **(A)** Network plot for significantly dysregulated transcripts in both HD iPSC lines vs. control. **(B)** Network plot for significantly dysregulated transcripts only in HD71Q iPSC lines. **(C)** Network plot for significantly dysregulated transcripts only in HD71Q iPSC lines. Proteins confirmed after proteomic analysis were pinpointed by a green border of the certain nodes. Names of direct interacting partners of the HTT protein were highlighted with red border.

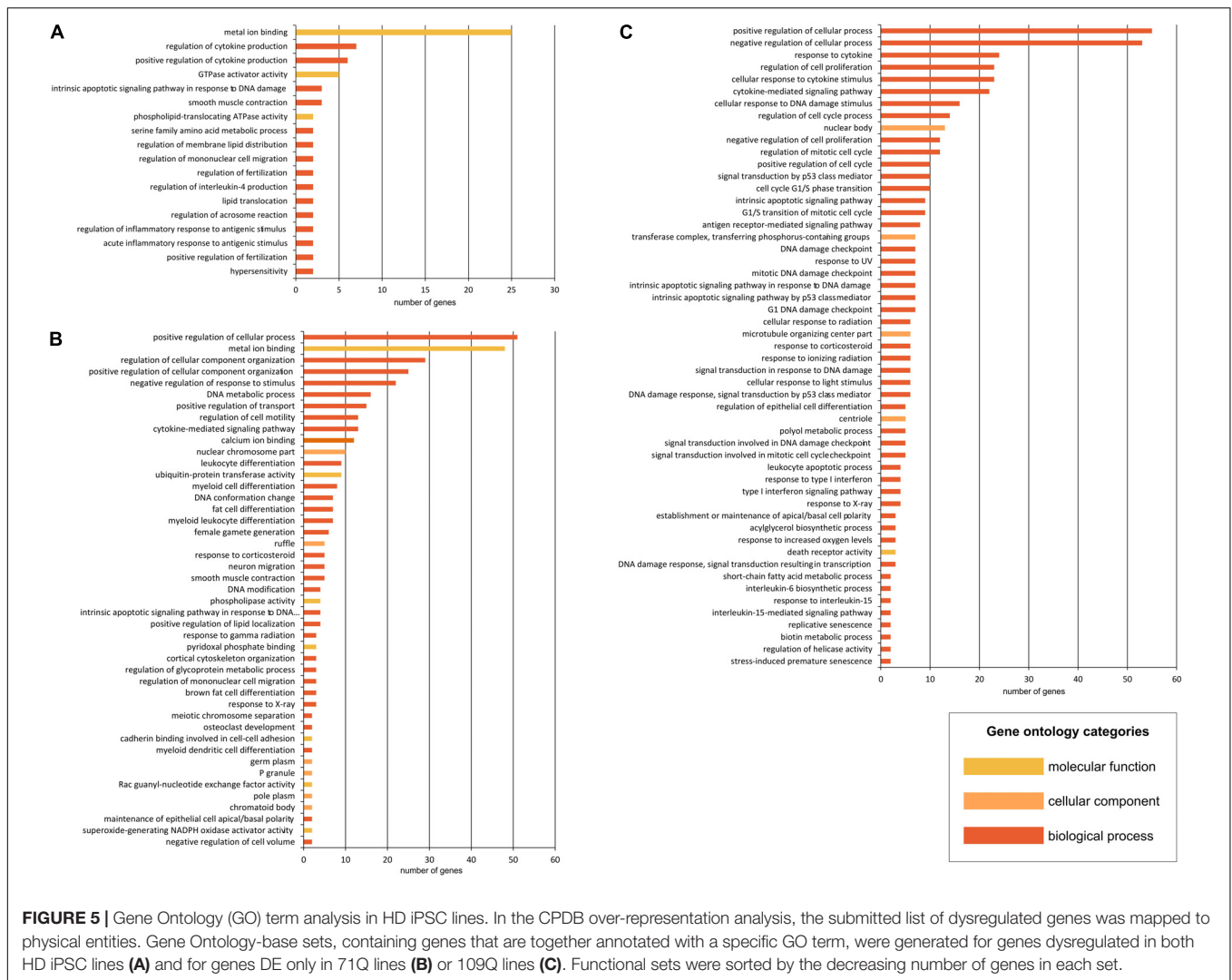


FIGURE 5 | Gene Ontology (GO) term analysis in HD iPSC lines. In the CPDB over-representation analysis, the submitted list of dysregulated genes was mapped to physical entities. Gene Ontology-base sets, containing genes that are together annotated with a specific GO term, were generated for genes dysregulated in both HD iPSC lines (A) and for genes DE only in 71Q lines (B) or 109Q lines (C). Functional sets were sorted by the decreasing number of genes in each set.

generated clusters, such as *ZP3*, *KLK5*, *ATP10B*, *ATP8B3*, and *ATP12A*.

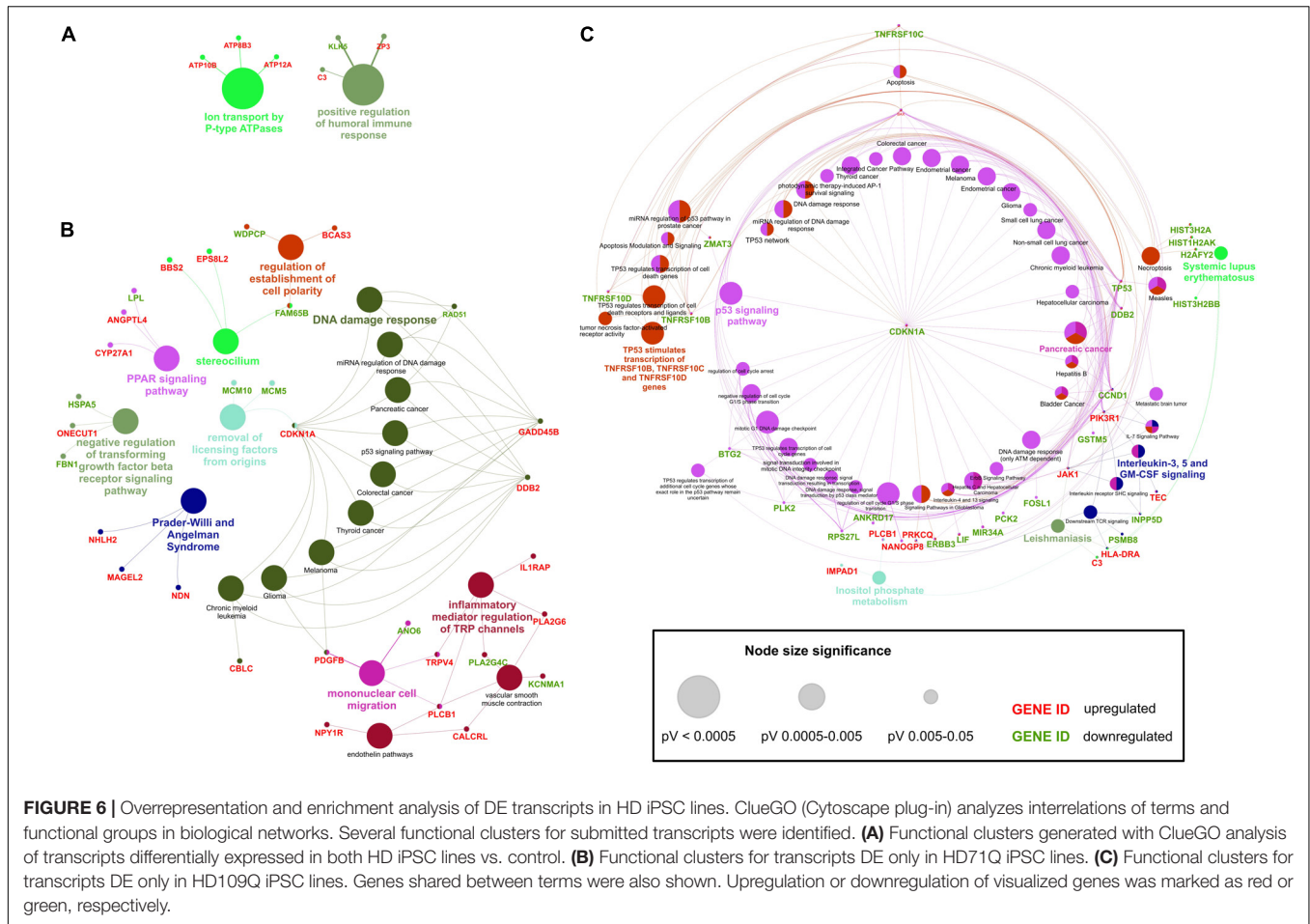
Analysis of transcripts differentially expressed in HD71Q iPSC lines showed the presence of processes connected with DNA damage response among which *CDKN1A*, *GADD45B*, *DDB2*, and *RAD51* play major roles (Figure 6 and Supplementary Table S8). Other annotations included regulation of establishment of cell polarity, PPAR signaling pathway, negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway, Prader-Willi and Angelman Syndrome, removal of licensing factors from origins, mononuclear cell migration and inflammatory mediator regulation of TRP channels.

The last ClueGO analysis, considered transcripts significantly dysregulated in HD109Q iPSC lines, generated a large cluster connected with p53 signaling pathway (Figure 6 and Supplementary Table S9). Six genes associated with these processes are also in the list of the top 30 dysregulated transcripts in HD109Q iPSC lines. Different processes highlighted during the analysis, which were specific to HD109Q iPSC lines, included Pancreatic cancer, interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling,

Leishmaniasis, Systemic lupus erythematosus and a large cluster associated to TNF-related factors activation by TP53.

Genes Dysregulated in 71Q and 109Q HD iPSC Lines Are Also Shared With ESCs, iPSCs, NSCs, and Neurons Obtained in Other Studies

The performed meta-analysis showed that among genes significantly dysregulated in HD iPSC lines several are shared with iPS-derived or ES-derived NSCs and/or neurons (Figures 7A–D and Supplementary Table S10). Five out of 107 genes found to be altered in both HD lines overlap with genes from neurons. Two of them, *LHFP* and *FLRT2* are strongly downregulated in both HD lines, with $\log_2\text{FoldChange} = -4$. Among 16 genes which overlap between HD109Q lines and neurons 9 are strongly downregulated in our work, with *TP53* on top of the list. Names of genes overlapping between all three comparison groups were listed in Figure 7D.



The meta-analysis was also performed to establish whether genes altered in our study are also shared with iPSCs obtained in other studies (Figures 7E–G). The analysis revealed that 8, 15, and 14 genes dysregulated in both HD, 71Q and 109Q lines are shared with iPSCs, respectively. Among eight genes which overlap between both HD lines and iPSCs from other studies, *ZNF208* and *ZNF257* were the most dysregulated in our analyses with log2FoldChange 9,24 and 7,15, respectively. Lists of overlapping genes created during the analysis included also those associated with HD-altered neurodevelopmental pathways, like TGFβ (*TGFBI*), as well as p53 pathway (*CDKN1A*, *GADD45B*), cell adhesion (*ANK1*) and calcium signaling (*CALCL*, *ANXA2*). Lists of overlapping genes are included in **Supplementary Table S10**. Only four genes overlap between all HD lines and ESCs, including *ACTA1*, *DPYSL4*, *HSPA5*, and *PCK2*.

DISCUSSION

A crucial role of HTT in embryogenesis and nervous system development has been well established (Schulte and Littleton, 2011; Saudou and Humbert, 2016). What is more, an increasing number of reports have begun to assess differential roles of HTT and mHTT during embryogenesis and early neural development

processes (Nguyen et al., 2013b), proving molecular changes that occur in HD brains long before the clinical onset of disease symptoms (Wiatr et al., 2018). The reports pointed out several developmental impairments which are due to mHTT, such as the integrity of germ layer specification disruption, precocious oligodendrocyte over neurons maturation, striatal cells vulnerability to death, and dysregulation of Notch signaling pathways (Nguyen et al., 2013b; Molero et al., 2016; Yu and Tanese, 2017). Here, we analyzed iPSC lines from HD patients and unaffected subjects with RNA sequencing and bioinformatics tools. In our study, we aimed to identify alterations in genes and subsequently in biological processes that might be associated with a pathological CAG repeat length. We performed high-throughput analyses of three isogenic iPSC lines from a patient with 71 CAG repeats, three isogenic cell lines from a patient with 109 CAG repeats, and three control lines from two healthy individuals. According to a recent report, the HD109 lines may correspond to ultra juvenile HD and HD71 lines may represent the juvenile HD manifestation (Fusilli et al., 2018). We compared all 6 HD lines to 3 control lines but also each set of 3 isogenic lines to control lines separately to evaluate HD gene expression and to identify early transcriptional changes that occur due to the different range of CAG repeats. As a result, we identified 107 (6 HD lines), 198 (3 HD71Q lines), and 217 (3 HD109Q



lines) significantly dysregulated mRNAs in each comparison group. Moreover, we asked the question whether the observed alterations at the mRNA level led to the corresponding changes at the protein level, thereby whether mRNA changes reflect on the functionality of HD stem cells. Our proteomic analyses confirmed similar directionality in dysregulation of protein expression of ZFP30 and TP53. We have previously reported such changes of TP53 protein expression which was highly downregulated in HD109 ultra juvenile HD iPSC lines (Szlachcic et al., 2015, 2017). Bioinformatics analyses of the dysregulated mRNAs and proteins revealed alterations of biological pathways and processes in HD iPSC lines which may have an impact on later neuropathology of Huntington's disease. These processes related to DNA damage response, p53 signaling pathway, regulation of establishment of cell polarity, and negative regulation of TGF β signaling pathway.

In previous reports investigating human HD iPSC by RNA-seq the main focus in research on human HD iPSC-derived cells has been put in later differentiation steps, e.g., NSC, however, dysregulated genes in 71Q HD iPSC lines were identified (Ring et al., 2015). In line with the previous report we found a similar number of dysregulated genes and among these genes, 14 have shown dysregulation similarly to Ring et al. (2015) (**Supplementary Table S11**). Moreover we identified genes associated with HD-altered neurodevelopmental pathways which were dysregulated in human NSCs, like TGF β (*TGFBI*) and REST (*BDNF*), as well as p53 pathway (*CDKN1A*, *GADD45B*), cell adhesion (*TMEM132C*, *ANK1*) and calcium signaling (*CALCRL*, *ANXA2*) (Ring et al., 2015; HD iPSC Consortium, 2017; Xu et al., 2017). However, BDNF transcript in pluripotent 71Q cells is slightly upregulated, whereas it is depleted at later stages in 71Q (Ring et al., 2015) and other human NSC and neurons (HD iPSC Consortium, 2012) and patients (Zuccato and Cattaneo, 2014). This depletion may be associated with abnormal striatal development and later degeneration. The early upregulation identified in our 71Q iPSC could be the result of the preference of HD pluripotent cells toward differentiation to neural lineages, which was also observed in mouse cells (Nguyen et al., 2013a). However, the majority of identified common genes has not been previously examined in HD. For instance, noteworthy may be the *ZFP57* transcription factor which is the controller of CpG methylation during embryonic development (Strogantsev et al., 2015; Riso et al., 2016; Mohammed et al., 2017).

ClueGO overrepresentation and enrichment analyses for this study showed that many of dysregulated transcripts in HD109Q iPSC lines are involved in DNA damage response and apoptosis, such as *CCND1*, *CDKN1A*, *TP53*, *BAX*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10C*, *TNFRSF10D*, *DDB2*, *PLCB1*, *PRKCQ*, *HSH2D*, *ZMAT3*, *PLK2*, and *RPS27L*. Most of the transcripts were downregulated and their proteins were also showed as direct interactors with TP53 in Induced Network Modules analysis. This may indicate that mHTT interacts with TP53 to alter the level of several TP53 interactors (shown in **Figure 4C**) influencing the apoptosis. Such disruption in the apoptotic pathway can lead to accumulation of an excessive number of progenitor cells and potential disruption of cell differentiation and production of mature neurons (Pfisterer and Khodosevich, 2017). In addition, HTT effects on cell polarization may result in the generation of

incorrect progenitors which need to undergo apoptosis (Godin and Humbert, 2011).

Bioinformatics analysis of transcripts dysregulated in HD71Q iPSC lines revealed that several of them act as transcription regulators during the early multicellular stages of development, such as *ZFP57*, *PIWIL2*, *HIST1H3C*, and *HIST1H2BB*. Significant upregulation of most of these transcripts may lead to a global increase in expression level of genes involved in pathways critical for embryogenesis and early neural development. Interestingly, the mutation in the *HTT* gene may cause precocious neurogenesis, which can lead to subsequent neuropathology (Nguyen et al., 2013a). The analysis of induced network modules (CPDB) in dysregulated mRNAs in both HD lines revealed interactions between genes associated with central nervous system development, axon guidance, signal transduction and migration of cortical neurons during brain development (*BBS2*, *POU6F2*, and *PARK2*). In addition, in all 6 HD lines we found genes such as *DBX2*, *FAM72C*, *TRIM69*, *FLRT2* that were recently reported (still absent annotation as GO terms) as controllers of neuronal development or were found to be enriched in neuronal progenitor cells. *DBX2* gene is associated with embryonic and adult neurogenesis while high expression level of this gene can suppress adult neurogenesis (Karaz et al., 2016, p. 2; Lupo et al., 2018). *FAM72C* is one of the human-specific genes enriched in cortical neural progenitor cells (Florio et al., 2018). *TRIM69* is the regulator of brain development demonstrated in zebrafish (Han et al., 2016). What is more, cortical pathology present in Huntington's disease, may have its molecular onset in downregulation of *FLRT2* gene, which is one of the neural development regulators (Seiradake et al., 2014) and is responsible for regulation of cortical neurons migration during brain development (van Roon-Mom et al., 2008). Furthermore, *FLRT2* is one of the genes which was revealed by our meta-analysis of 9 HD research works (An et al., 2012; Chae et al., 2012; Feyeux et al., 2012; HD iPSC Consortium, 2012, 2017; McQuade et al., 2014; Chiu et al., 2015; Ring et al., 2015; Nekrasov et al., 2016). It overlaps between the analyzed HD iPSC lines and previously reported iPS- or ES-derived NSCs and neurons. Besides the above-mentioned functions of this gene, it has been also reported as one of the potential regulators of rosette neural stem cells (Zhao et al., 2014). Other genes which overlap between the analyzed HD iPSC lines and previously reported NSCs and neurons included *LHFP*, *ATP8B3*, *MATN2*, *TRPV4*, *ANGPTL4*, *ANXA2*, *CA12*, *GDPD5*, *CALCRL*, *FBN1*, *PDGFB*, *S100A11*, *CEBPA*, *EPS8L2*, *FBXL16*, *ONECUT1*, *SLC1A6*, *TMEM64*, *ADAMTS1*, *ZNF471*, *EMILIN1*, *LIMA1*, *MEST*, *PHYHIP*, *RCN3*, *H2AFY2*, and *TP53*. Except for *TP53*, the gene known to be involved in neurodegenerative disorders, *H2AFY2* seems to be another valuable gene for further studies. *H2AFY2*, gene encoding histone macroH2A, has been recently linked to Friedrich's ataxia (Soragni et al., 2015) because of its involvement in *FXN* gene silencing.

Moreover, ClueGO overrepresentation and enrichment analysis identified processes connected with the ErbB signaling pathway. *ERBB3* and *CDKN1A*, genes associated with that GO term, are significantly downregulated in HD109Q iPSC lines.

Our findings, along with other recent studies strongly suggest that HD-associated impairments in adult life may result from very early and cumulative embryogenic abnormalities. Studying such early transcriptional changes may help to discover key molecular alterations occurring in HD-affected cells and can thus provide new possibilities for therapeutic and preventive strategies for Huntington's disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

McF and MrF conceived and designed the RNA-seq experiments. McF and PW analyzed the RNA-seq data. KŚ performed all bioinformatics associated with CPDB and ClueGO analyses of data. KŚ and WS designed and performed the qPCR experiments. MS performed the RNA isolation and assessment. LH was responsible for library preparation. ŁM performed the mass spectrometry analysis of proteins and analysis of proteomic data. WS critically revised the article. KŚ and McF wrote the article. McF and MrF was responsible for concept and obtaining funding.

FUNDING

This work was supported by the grant from the National Science Centre (Grant No. 2013/10/E/NZ4/00621) and the Polish Ministry of Science and Higher Education, under the KNOW program (01/KNOW2/2014).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Gabriela Bindea, from Laboratory of Integrative Cancer Immunology INSERM UMRS1138, Cordeliers Research Center, Paris, France, for kindly providing an academic license key for ClueGO for Cytoscape. We also thank Prof. R. Kierzek for granting access to real time quantitative PCR machine. Cell cultures were conducted in Cell and Tissue Culture Laboratory, IBCh, PAS, Poland. Proteomic mass spectrometry analyses were performed in Laboratory of mass spectrometry and the library synthesis was performed in Laboratory of Genomics (European Centre for Bioinformatics and Genomics; ECBiG; IBCh, PAS, Poznań, Poland).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00528/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Graph representing number of reads collected per library during RNA-seq analysis. Each column represents each HD iPSC line.

REFERENCES

An, M. C., Zhang, N., Scott, G., Montoro, D., Wittkop, T., Mooney, S., et al. (2012). Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 253–263. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.026

FIGURE S2 | (A) Detection of pluripotency markers in HD iPSC lines (numbered clonal lines: 2, 22, 32 – ND42245; 3, 23, 33 – ND41654; 4, 24, 34 – ND41658; 5, 25, 35 – ND42228; 6, 26, 36 – ND42229; 7, 27, 37 – ND42230; 8, 28, 38 – ND42222; 9, 29, 39 – ND42223; 10, 30, 40 – ND42224). Following markers were selected for the validation: *SOX2* (2–10; product size 338 bp), *NANOG* (12–20; product size 294 bp), *OCT4* (22–30; product size 273 bp) and *LIN28A* (32–40; product size 382 bp). (B) Validation of RT-PCR products of all HD lines for reference gene, *GAPDH*. 42–50 – HD iPSC lines in the same order as in (A). (C) List of primers used for the detection of pluripotency markers in HD iPSC lines. Primers sequence for *GAPDH* is already in **Supplementary Table S1**.

FIGURE S3 | (A) Heat map representing gene expression patterns of DE genes when comparing HD71Q and HD109Q iPSCs to control iPSCs at an adjusted p -value of < 0.05 and baseMean cutoff > 50 . Red represents elevated expression while blue represent decreased expression, compared with the row mean. Each column represents each isogenic line. Gene names are shown on the right side of the heat map. As genes identifier type, HGNC symbols were chosen. Heat map clearly shows clusters of genes with the same level of dysregulation in both HD lines and also clusters of genes with the opposite type of dysregulation in HD lines from each patient.

FIGURE S4 | Principal component analysis (PCA) of RNA-seq on HD71Q iPSCs (green), HD109Q iPSCs (red) and unaffected iPSCs (blue).

TABLE S1 | A list of primers used for qPCR validation of RNA-seq results. All primer pairs were designed in Primer3Plus web program.

TABLE S2 | Identifiers from the submitted list of dysregulated genes which were not mapped to distinct proteins in CPDB induced network modules analysis.

TABLE S3 | Lists of transcripts obtained from RNA-seq analysis on 71Q and 109Q HD iPSC lines. Lists contain statistical values for three comparison groups, both HD lines vs. control, HD71Q vs. control, and HD109Q vs. control.

TABLE S4 | Data from proteomic analysis.

TABLE S5 | A list of pathway-based sets containing all the genes, from the submitted list, involved in a specific biochemical pathway. Genes DE in both HD iPSC lines or only in 71Q or 109Q lines were submitted to the analysis.

TABLE S6 | A list of complex-based sets containing sets of genes whose protein products are over-represented in the same protein complex. Genes DE in both HD iPSC lines or only in 71Q or 109Q lines were submitted to the analysis.

TABLE S7 | GO/pathway terms specific for genes dysregulated in both HD iPSC lines. Number of genes associated with the term and the percentage of genes per term are included. Colors of each functional set corresponds with colors of functional clusters shown in **Figure 4A**.

TABLE S8 | GO/pathway terms specific for genes dysregulated only in 71Q HD iPSC lines. Number of genes associated with the term and the percentage of genes per term are included. Colors of each functional set corresponds with colors of functional clusters shown in **Figure 4B**.

TABLE S9 | GO/pathway terms specific for genes dysregulated only in 109Q HD iPSC lines. Number of genes associated with the term and the percentage of genes per term are included. Colors of each functional set corresponds with colors of functional clusters shown in **Figure 4C**.

TABLE S10 | Lists of genes used for and generated from the meta-analysis of differences in genes expression. Genes overlapping between lists, and the genes reported in more than one of the 9 studies included in the meta-analysis, were identified using MS Excel formulas and are shown in properly entitled columns.

TABLE S11 | List of genes similarly dysregulated in Ring et al. publication (Ring et al., 2015).

Bindea, G., Galon, J., and Mlecnik, B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinform. Oxf. Engl.* 29, 661–663. doi: 10.1093/bioinformatics/btt019

Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., et al. (2009). ClueGO: a cytoscape plug-in to decipher functionally grouped

- gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093. doi: 10.1093/bioinformatics/btp101
- Chae, J.-I., Kim, D.-W., Lee, N., Jeon, Y.-J., Jeon, I., Kwon, J., et al. (2012). Quantitative proteomic analysis of induced pluripotent stem cells derived from a human Huntington's disease patient. *Biochem. J.* 446, 359–371. doi: 10.1042/BJ20111495
- Chiu, F.-L., Lin, J.-T., Chuang, C.-Y., Chien, T., Chen, C.-M., Chen, K.-H., et al. (2015). Elucidating the role of the A2A adenosine receptor in neurodegeneration using neurons derived from Huntington's disease iPSCs. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6066–6079. doi: 10.1093/hmg/ddv318
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. doi: 10.1038/nbt.1511
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinform. Oxf. Engl.* 29, 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
- Feyoux, M., Bourgeois-Rocha, F., Redfern, A., Giles, P., Lefort, N., Aubert, S., et al. (2012). Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3883–3895. doi: 10.1093/hmg/ddc216
- Florio, M., Heide, M., Pinson, A., Brandl, H., Albert, M., Winkler, S., et al. (2018). Evolution and cell-type specificity of human-specific genes preferentially expressed in progenitors of fetal neocortex. *eLife* 7:e32332. doi: 10.7554/eLife.32332
- Fusilli, C., Migliore, S., Mazza, T., Consoli, F., De Luca, A., Barbagallo, G., et al. (2018). Biological and clinical manifestations of juvenile Huntington's disease: a retrospective analysis. *Lancet Neurol.* 17, 986–993. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30294-1
- Godin, J. D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B. C., et al. (2010). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392–406. doi: 10.1016/j.neuron.2010.06.027
- Godin, J. D., and Humbert, S. (2011). Mitotic spindle: focus on the function of huntingtin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 852–856. doi: 10.1016/j.biocel.2011.03.009
- Han, R., Wang, R., Zhao, Q., Han, Y., Zong, S., Miao, S., et al. (2016). Trim69 regulates zebrafish brain development by ap-1 pathway. *Sci. Rep.* 6:24034. doi: 10.1038/srep24034
- Hartley, S. W., and Mullikin, J. C. (2015). QoRTs: a comprehensive toolset for quality control and data processing of RNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 16:224. doi: 10.1186/s12859-015-0670-5
- HD iPSC Consortium. (2012). Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* 11, 264–278. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.027
- HD iPSC Consortium. (2017). Developmental alterations in Huntington's disease neural cells and pharmacological rescue in cells and mice. *Nat. Neurosci.* 20, 648–660. doi: 10.1038/nn.4532
- Herwig, R., Hardt, C., Lienhard, M., and Kamburov, A. (2016). Analyzing and interpreting genome data at the network level with ConsensusPathDB. *Nat. Protoc.* 11, 1889–1907. doi: 10.1038/nprot.2016.117
- Jimenez-Sanchez, M., Licitra, F., Underwood, B. R., and Rubinsztein, D. C. (2017). Huntington's disease: mechanisms of pathogenesis and therapeutic strategies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7:a024240. doi: 10.1101/cshperspect.a024240
- Karaz, S., Courgeon, M., Lepetit, H., Bruno, E., Pannone, R., Tarallo, A., et al. (2016). Neuronal fate specification by the Dbx1 transcription factor is linked to the evolutionary acquisition of a novel functional domain. *EvoDevo* 7:18. doi: 10.1186/s13227-016-0055-5
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Lupo, G., Nisi, P. S., Esteve, P., Paul, Y., Novo, C. L., Sidders, B., et al. (2018). Molecular profiling of aged neural progenitors identifies Dbx2 as a candidate regulator of age-associated neurogenic decline. *Aging Cell* 17, e12745. doi: 10.1111/acel.12745
- MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., et al. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983. doi: 10.1016/0092-8674(93)90585-E
- McQuade, L. R., Balachandran, A., Scott, H. A., Khaira, S., Baker, M. S., and Schmidt, U. (2014). Proteomics of Huntington's disease-affected human embryonic stem cells reveals an evolving pathology involving mitochondrial dysfunction and metabolic disturbances. *J. Proteome Res.* 13, 5648–5659. doi: 10.1021/pr500649m
- Mohammed, H., Hernando-Herraez, I., Savino, A., Scialdone, A., Macaulay, I., Mulas, C., et al. (2017). Single-cell landscape of transcriptional heterogeneity and cell fate decisions during mouse early gastrulation. *Cell Rep.* 20, 1215–1228. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.009
- Molero, A. E., Arteaga-Bracho, E. E., Chen, C. H., Gulinello, M., Winchester, M. L., Pichamoorthy, N., et al. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 5736–5741. doi: 10.1073/pnas.1603871113
- Nekrasov, E. D., Vigont, V. A., Klyushnikov, S. A., Lebedeva, O. S., Vassina, E. M., Bogomazova, A. N., et al. (2016). Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol. Neurodegener.* 11:27. doi: 10.1186/s13024-016-0092-5
- Nguyen, G. D., Gokhan, S., Molero, A. E., and Mehler, M. F. (2013a). Selective roles of normal and mutant huntingtin in neural induction and early neurogenesis. *PLoS One* 8:e64368. doi: 10.1371/journal.pone.0064368
- Nguyen, G. D., Molero, A. E., Gokhan, S., and Mehler, M. F. (2013b). Functions of Huntingtin in germ layer specification and organogenesis. *PLoS One* 8:e72698. doi: 10.1371/journal.pone.0072698
- Patel, R. K., and Jain, M. (2012). NGS QC toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One* 7:e30619. doi: 10.1371/journal.pone.0030619
- Pfisterer, U., and Khodosevich, K. (2017). Neuronal survival in the brain: neuron type-specific mechanisms. *Cell Death Dis.* 8:e2643. doi: 10.1038/cddis.2017.64
- Quarrell, O. W. J., Nance, M. A., Nopoulos, P., Paulsen, J. S., Smith, J. A., and Squitieri, F. (2013). Managing juvenile Huntington's disease. *Neurodegener. Dis. Manag.* 3, 267–276. doi: 10.2217/nmt.13.18
- Ring, K. L., An, M. C., Zhang, N., O'Brien, R. N., Ramos, E. M., Gao, F., et al. (2015). Genomic analysis reveals disruption of striatal neuronal development and therapeutic targets in human huntington's disease neural stem cells. *Stem Cell Rep.* 5, 1023–1038. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.005
- Riso, V., Cammisia, M., Kukreja, H., Anvar, Z., Verde, G., Sparago, A., et al. (2016). ZFP57 maintains the parent-of-origin-specific expression of the imprinted genes and differentially affects non-imprinted targets in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 44, 8165–8178. doi: 10.1093/nar/gkw505
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The biology of huntingtin. *Neuron* 89, 910–926. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.003
- Schulte, J., and Littleton, J. T. (2011). The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Curr. Trends Neurol.* 5, 65–78.
- Seiradake, E., del Toro, D., Nagel, D., Cop, F., Härtl, R., Ruff, T., et al. (2014). FLRT structure: balancing repulsion and cell adhesion in cortical and vascular development. *Neuron* 84, 370–385. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.008
- Soragni, E., Chou, C. J., Rusche, J. R., and Gottesfeld, J. M. (2015). Mechanism of action of 2-aminobenzamide HDAC inhibitors in reversing gene silencing in Friedreich's ataxia. *Front. Neurol.* 6:44. doi: 10.3389/fneur.2015.00044
- Strogantsev, R., Krueger, F., Yamazawa, K., Shi, H., Gould, P., Goldman-Roberts, M., et al. (2015). Allele-specific binding of ZFP57 in the epigenetic regulation of imprinted and non-imprinted monoallelic expression. *Genome Biol.* 16:112. doi: 10.1186/s13059-015-0672-7
- Szlachcic, W. J., Switonski, P. M., Krzyzosiak, W. J., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2015). Huntington disease iPSCs show early molecular changes in intracellular signaling, the expression of oxidative stress proteins and the p53 pathway. *Dis. Model. Mech.* 8, 1047–1057. doi: 10.1242/dmm.019406
- Szlachcic, W. J., Wiater, K., Trzeciak, M., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2017). The generation of mouse and human huntington disease iPSCs suitable for in vitro studies on huntingtin function. *Front. Mol. Neurosci.* 10:253. doi: 10.3389/fnmol.2017.00253
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., et al. (2016). The perseus computational platform for comprehensive analysis of (pro)teomics data. *Nat. Methods* 13, 731–740. doi: 10.1038/nmeth.3901
- van Roon-Mom, W. M., Peppers, B. A., 't Hoen, P. A., Verwijmeren, C. A., den Dunnen, J. T., Dorsman, J. C., et al. (2008). Mutant huntingtin activates

- Nrf2-responsive genes and impairs dopamine synthesis in a PC12 model of Huntington's disease. *BMC Mol. Biol.* 9:84. doi: 10.1186/1471-2199-9-84
- Victorson, D., Carlozzi, N. E., Frank, S., Beaumont, J. L., Cheng, W., Gorin, B., et al. (2014). Identifying motor, emotional-behavioral, and cognitive deficits that comprise the triad of HD symptoms from patient, caregiver, and provider perspectives. *Tremor Other Hyperkinetic Mov.* 4:224. doi: 10.7916/D8JW8BWS
- Wiatr, K., Szlachcic, W. J., Trzeciak, M., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2018). Huntington disease as a neurodevelopmental disorder and early signs of the disease in stem cells. *Mol. Neurobiol.* 55, 3351–3371. doi: 10.1007/s12035-017-0477-7
- Xu, X., Tay, Y., Sim, B., Yoon, S.-I., Huang, Y., Ooi, J., et al. (2017). Reversal of phenotypic abnormalities by CRISPR/Cas9-mediated gene correction in Huntington disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* 8, 619–633. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.022
- Yu, M. S., and Tanese, N. (2017). Huntingtin is required for neural but not cardiac/pancreatic progenitor differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Front. Cell. Neurosci.* 11:33. doi: 10.3389/fncel.2017.00033
- Zhao, Y., Ji, S., Wang, J., Huang, J., and Zheng, P. (2014). mRNA-Seq and MicroRNA-Seq whole-transcriptome analyses of rhesus monkey embryonic stem cell neural differentiation revealed the potential regulators of rosette neural stem cells. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 21, 541–554. doi: 10.1093/dnares/dsu019
- Zuccato, C., and Cattaneo, E. (2014). Huntington's disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220, 357–409. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_14

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Świtońska, Szlachcic, Handschuh, Wojciechowski, Marczak, Stelmaszczuk, Figlerowicz and Figiel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Juvenile Huntington's Disease and Other PolyQ Diseases, Update on Neurodevelopmental Character and Comparative Bioinformatic Review of Transcriptomic and Proteomic Data

Karolina Świtońska-Kurkowska, Bart Krist, Joanna Delimata and Maciej Figiel*

Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:

Andreas Hermann,
University Hospital Rostock, Germany

Reviewed by:

Dan Lindholm,
University of Helsinki, Finland
Chandrasekar Raman,
Joslin Diabetes Center, Harvard
Medical School, United States

*Correspondence:

Maciej Figiel
mfigiel@ibch.poznan.pl

Specialty section:

This article was submitted to
Stem Cell Research,
a section of the journal
*Frontiers in Cell and Developmental
Biology*

Received: 16 December 2020

Accepted: 10 June 2021

Published: 01 July 2021

Citation:

Świtońska-Kurkowska K, Krist B,
Delimata J and Figiel M (2021)
Juvenile Huntington's Disease
and Other PolyQ Diseases, Update
on Neurodevelopmental Character
and Comparative Bioinformatic
Review of Transcriptomic
and Proteomic Data.
Front. Cell Dev. Biol. 9:642773.
doi: 10.3389/fcell.2021.642773

Polyglutamine (PolyQ) diseases are neurodegenerative disorders caused by the CAG repeat expansion mutation in affected genes resulting in toxic proteins containing a long chain of glutamines. There are nine PolyQ diseases: Huntington's disease (HD), spinocerebellar ataxias (types 1, 2, 3, 6, 7, and 17), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), and spinal bulbar muscular atrophy (SBMA). In general, longer CAG expansions and longer glutamine tracts lead to earlier disease presentations in PolyQ patients. Rarely, cases of extremely long expansions are identified for PolyQ diseases, and they consistently lead to juvenile or sometimes very severe infantile-onset polyQ syndromes. In apparent contrast to the very long CAG tracts, shorter CAGs and PolyQs in proteins seems to be the evolutionary factor enhancing human cognition. Therefore, polyQ tracts in proteins can be modifiers of brain development and disease drivers, which contribute neurodevelopmental phenotypes in juvenile- and adult-onset PolyQ diseases. Therefore we performed a bioinformatics review of published RNAseq polyQ expression data resulting from the presence of polyQ genes in search of neurodevelopmental expression patterns and comparison between diseases. The expression data were collected from cell types reflecting stages of development such as iPSC, neuronal stem cell, neurons, but also the adult patients and models for PolyQ disease. In addition, we extended our bioinformatic transcriptomic analysis by proteomics data. We identified a group of 13 commonly downregulated genes and proteins in HD mouse models. Our comparative bioinformatic review highlighted several (neuro)developmental pathways and genes identified within PolyQ diseases and mouse models responsible for neural growth, synaptogenesis, and synaptic plasticity.

Keywords: Huntington's disease, juvenile, spinocerebellar ataxia, DRPLA, transcriptomics, neurodevelopment, bioinformatic review, proteomics

EARLY BRAIN DEVELOPMENT IN HEALTH AND POLYQ DISEASE

Normal brain development consists of cellular processes such as cell division, cell migration, cell differentiation, maturation, synaptogenesis, and apoptosis, which are precisely orchestrated by a molecular network of signaling pathways. Such orchestration is crucial for the correct generation of cellular layers, specialized neural regions, and the generation of complex neuronal wiring between brain structures. In brief, during the formation of the neural tube (neurulation) in the embryo, the neuroepithelial cells (NECs) perform symmetric cell divisions producing progenitors of different brain regions (Paridaen and Huttner, 2014). Pax6 and Emx2 signaling molecules expressed in opposing gradients from the anterior to posterior regions of the proliferative zone function as a primitive blueprint for the dividing NECs to give rise to the early structures of the forebrain, midbrain, and hindbrain (Stiles and Jernigan, 2010; Gibb and Kolb, 2018). Among others, neurulation gives rise to neural progenitors, neural crest, sensory placodes, and epidermis, all ectodermal derivatives (Haremake et al., 2019). The appearance of these four lineages results from complex morphogenetic processes and several signaling activities, such as TGF- β inhibition and BMP4, Wnt, and FGF signaling pathways. The signaling molecules are represented already in non-lineage committed iPSC from Huntington's disease juvenile patients and mouse models, which show a range of molecular phenotypes such as MAPK, Wnt, and p53 pathways (Szlachcic et al., 2015, 2017).

Early human neurulation can be recapitulated *in vitro* by self-organizing neuruloids, containing cell populations present at the stage of neural tube closure in human development (days 21–25 post-fertilization; Haremake et al., 2019). Interestingly such neuruloids generated from Huntington's disease hESC demonstrated impaired neurogenesis resulting in aberrant rosette formation. In detail, HD 56Q neuruloids showed altered levels of Wnt/PCP pathway downregulation (for example, WNT5B, and RSPO3 specific in neuroepithelium) and RHOB and RAB5C in the neural crest. In addition, decreased expression of cytoskeleton-associated genes and actin-myosin contraction (*EVL*, *MID1*, *RHOQ*, and *TMEM47*) could be observed and hint toward an impairment in the actin-mediated tissue organization mechanism during neurulation (Haremake et al., 2019). In another recent study, one-third of gene changes in RNA-seq analysis on HD patient-derived iPSCs were involved in pathways regulating neuronal development and maturation. When these dysregulated genes were mapped to stages of mouse striatal development, the profiles aligned mainly with earlier embryonic stages of neuronal differentiation (The HD iPSC Consortium, 2017). Moreover, sensory-motor network connectivity changes can be observed in the brains of HD patients, hinting at an effect of this PolyQ disease on brain connectivity (Pini et al., 2020).

During brain development, in a process called interkinetic nuclear migration coupled to the cell cycle, neural progenitors keep the balance between the cell renewal of progenitors and their differentiation. Their role is to control when and how many apical progenitor nuclei are exposed to proliferative versus

neurogenic signals. Apical progenitors maintain their polarity through endocytosis and trafficking of glycans from the Golgi apparatus to the plasma membrane at the apical endfeet (Arai and Taverna, 2017). Interestingly, mislocalized expression of mHTT hinders both endosomal trafficking in apical progenitors, as well as the normal progression of cell cycle stages. Leading to a shift toward more neural differentiation and away from proliferation (Barnat et al., 2020). Afterward, neuroepithelial cells start expressing glial genes and thereby begin a differentiation process into radial glial cells (RGCs). At this stage, cell migration starts to play a decisive role. Neuronal cells originating from the ventricular and subventricular zones start migrating outward in a radial fashion, using the RGCs as guideposts. Some subsets of RDGs eventually differentiate into intermediate, immature, and finally into mature neurons or astrocytes (Franco and Müller, 2013; Gibb and Kolb, 2018). Other cell populations migrate to the cortex during later developmental stages and include the microglia, which mostly use vessels for guidance into the forebrain. Recent reports point toward glia, particularly microglia, as essential players for cortical morphogenesis via regulation of brain wiring and interneuronal migration in the cortical wall (Silva et al., 2019).

Over time, successive layers of the cortical mantle form, and the progenitor cells are becoming more restricted in the cell types that they can construct. Furthermore, in this cellular maturation process, neural cells start to extend dendrites and an axon to form connections with other cells and become an integral part of a communication network (Gibb and Kolb, 2018).

In the prenatal stage of life, the further development of the brain also starts to depend on degenerative processes such as programmed cell death or apoptosis. These processes are initiated to remove the brain cells which have failed to make connections or have underutilized connections (Chan et al., 2002). Also, the underused synapses are eliminated in a process called synaptic pruning. In these stages of brain development, a transcriptional repressor complex of Ataxin1 and Capicua (ATXN1-CIC) regulates cell lineage specification and is involved in the regulation of cell proliferation (Ahmad et al., 2019). Loss of the ATXN1-CIC complex may have severe neurodevelopmental consequences. Conditional knockout of either *Atxn1-Atxn1l* or *Cic* in mice leads to a decrease of cortical thickness, hyperactivity and memory deficits (Lu et al., 2017). Indeed, loss or reduction of functional ATXN1 has been observed in patients with autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder (Celestino-Soper et al., 2012; Di Benedetto et al., 2013), suggesting that loss of ATXN1-CIC complexes causes a spectrum of neurobehavioral phenotypes (Lu et al., 2017). Expanded CAG tracts in ATXN1 have been shown to stimulate the proliferation of postnatal cerebellar stem cells in SCA1 mice, which tend to differentiate into GABAergic inhibitory interneurons rather than astrocytes (Edamakanti et al., 2018). These hyperproliferating cells lead to a significantly increased number of GABAergic inhibitory interneuron synaptic connections, which in turn disrupt the proper cerebellar Purkinje cell function (Edamakanti et al., 2018). On the other hand, SCA2 patient fibroblast cells exhibit higher levels of caspase-8- and caspase-9-mediated apoptotic activation than those of healthy

controls, which contributes to the pathophysiology of SCA2 (Wardman et al., 2020). Also, the normal function of atrophin-1 and atrophin-2 proteins are related to the development and may be associated with regulation of cell polarity and transcriptional control of progenitors, which was reviewed previously (Shen and Peterson, 2009; Mannervik, 2014). Knockdown of *Atn1* in neuronal progenitor cells (NPCs) in a rat led to severe aberrations in brain development. The study also highlighted *ATN1* role as a direct target of the lysine-specific histone demethylase 1A (*LSD1*). *LSD1* is known to have crucial developmental roles such as cortical neuronal migration or adult NPC proliferation (Zhang et al., 2014). Similarly, TATA Binding protein as part of the TFIID complexes may control promoter elements that can regulate developmental transcription (Ohler and Wassarman, 2010). As a general transcription factor, TBP is, directly and indirectly involved in numerous biological pathways. Studies confirmed many cellular processes impaired by mutant TBP via either gain of function or loss of function mechanisms, such as Notch signaling, TrkA signaling, Chaperone system, ER stress response, and muscle function (Yang et al., 2016).

Combined with the previously mentioned roles of *HTT*, *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *ATN1*, and TBP in transcription, translation, RNA metabolism, and ubiquitin-dependent protein quality control processes, a case can be made for the adverse effect of CAG tract extension on normal gene expression and protein regulation during neural development. Therefore, it can be proposed that other late-onset degenerative diseases may also be rooted in subtle developmental derailments. Deregulation of genes involved in cell migration, cell differentiation, maturation, synaptogenesis, and apoptosis can lead to severe neurodevelopmental disorders and may also contribute to the disease pathology of PolyQ diseases.

POLYQ DISEASES AND JUVENILE CASES

Polyglutamine (PolyQ) diseases are neurodegenerative disorders caused by expansion mutations giving rise to abnormally long CAG tri-nucleotide repeat tracts in affected, otherwise unrelated genes. PolyQ disorders are dominantly inherited and autosomal, except for SBMA, which is X-linked. The expanded polyQ repeats disturb the function of the proteins encoded by the genes with CAG expansion, leading to loss or gain of function (Lim et al., 2008). To date, nine PolyQ diseases were identified; namely Huntington's disease (HD), spinocerebellar ataxia (SCA) types 1, 2, 3, 6, 7, and 17, dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), and spinal bulbar muscular atrophy (SBMA) (Zoghbi and Orr, 2009).

Several PolyQ diseases may occur in younger patients, and in such cases, symptom presentation in juvenile disease usually differs from the adult form. Although the juvenile and infantile forms make up a minority of instances, the early onset and polyQ protein domains, usually much longer than in the adult forms, hint at the developmental nature of these cases. Since the etiology of the diseases is genetic and more defined, they may help to better understand the brain development in health

and disease. The first aim of this work is to obtain a broader literature overview of the juvenile and infantile PolyQ disease cases, with very long CAG repeats, in the context of early brain development. Since brain development is primarily related to the forming of new cell populations, differentiation, and wiring of the brain, we also looked at what is known about these processes in the context of juvenile polyQ cases. In the second part of the work, we performed a bioinformatics analysis of RNAseq and proteomics data from polyQ patients and models in search of neurodevelopmental expression patterns and comparison between diseases. The expression data were collected from cell types reflecting stages of development such as iPSC, neuronal stem cell (NSCs), neural precursor cells (NPCs), and neurons, but also the adult patients and models for PolyQ disease. In addition, thanks to a broader selection of transcriptomic data in mice containing longer CAG tracts, we were able to compare gene expression profiles between different PolyQ diseases. Still, the bias toward HD in this work results from the available data sources. However, another aim of our work is the focus on juvenile cases of polyQ disorders other than HD, possible neurodevelopmental signs in the diseases, and what we could still learn from the juvenile forms about diseased brain development.

Juvenile and Infantile Huntington's Disease

In HD, the CAG expansion mutation is located in the Huntington (*HTT*) gene (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), which is crucial for neural development [reviewed in Saudou and Humbert (2016) and Wiatr et al. (2018)]. The adult HD is a neurodegenerative choreic movement disorder characterized by motor disturbance, cognitive loss, and psychiatric manifestations that typically starts in the third to fifth decade of life and gradually worsens over the course of 10 to 20 years until death. Adult HD is characteristic for individuals who usually harbor over 39 trinucleotide repeats in *HTT*, but rarely more than 60 (Martin and Gusella, 1986; Latimer et al., 2017). The juvenile form of HD (Juvenile onset Huntington's disease; JOHD) is defined as disease onset before the age of 20 with the number of CAG repeats between 60 (Quarrell et al., 2013) and 89 (Nance and Myers, 2001; Ribaï et al., 2007), and infantile HD with very rapid onset with number of CAG repeats above 90 and more (Fusilli et al., 2018; Stout, 2018). JOHD is also marked by a more rapid disease progression, leading to an earlier death (Fusilli et al., 2018). In JOHD, the symptoms are typically seizures, rigidity, and severe cognitive dysfunction (Nance and Myers, 2001; Vargas et al., 2003; Squitieri et al., 2006; Ribaï et al., 2007). In cases where the onset is very early (before 10 years of age, sometimes also referred to as "infantile-" or "ultra-juvenile HD"), epilepsy is also frequent (Barbeau, 1970). One of the youngest onset of JOHD and also one of the most severe presentations which have been described to date was a girl who had healthy development until 18 months of age and later at the age of 3,5 years, showed marked cerebellar atrophy. The patient was diagnosed to have 265 triplet repeats on the mutant *HTT* allele and 14 on the other (Milunsky et al., 2003). Other reports have described frequent speech difficulties as

early symptoms before motor problems arise (Yoon et al., 2006; Sakazume et al., 2009). Behavioral problems, such as aggression, irritability, and hyperactivity, which are often reported signs of disturbed brain development, were also reported for juvenile HD (Yoon et al., 2006). In both juvenile- and adult-onset HD, the most affected cell types in the brain are striatal neurons (Tereshchenko et al., 2019). MRI data from JOHD cases show mostly cerebellar atrophy. The most substantial reduction in brain volume is observed in the caudate, putamen, as well as in globus pallidus and thalamus. Amygdala, hippocampus, and brainstem are slightly enlarged in HD patients (Hedjoudje et al., 2018). The significant difference between HD adults and children is seen in the cerebral cortex, which is mainly unaffected in children. Histopathological findings (Latimer et al., 2017) showed mild to moderate neuron loss in the brain tissue of adult-onset patients, while no significant loss of neocortical neurons was observed in JOHD. However, in JOHD patients, a significant neostriatal neuron loss and associated astrogliosis in the striatum were observed. In both disease onsets, HTT positive intranuclear and cytoplasmic neuronal inclusions can be found in the cerebral and striatum cortex.

Early Onset in PolyQ Spinocerebellar Ataxias

Most severe cases of juvenile or infantile-onset were reported for SCA2 (*ATXN2* gene; ataxin-2 protein), SCA7 (*ATXN7*; Ataxin-7 protein), SCA17 (*TBP* gene; TATA Binding protein), and DRPLA (*ATN1* gene; atrophin-1 protein). Juvenile-onsets were also reported for SCA3/MJD with more severe presentation compared to adult forms. One of the reasons for the occurrence of very severe developmental signs may be the function of *ATXN2*, *ATXN7*, *TBP*, and *ATN1*, which can be summarized as a very pleiotropic and broad influence on transcriptional regulation. The function of the genes, including their impact on transcription, has been well-reviewed previously (Shen and Peterson, 2009; Yang et al., 2016; Lee J. et al., 2018; Niewiadomska-Cimicka and Trottier, 2019). In SCA1 (*ATXN1* gene; Ataxin-1 protein), SCA3/MJD (*ATXN3* gene; ataxin-3), and SCA6 (*CACNA1A* gene; $\alpha 1A$ subunit of the voltage-gated P/Q type channel), the cases with the earliest reported onset were mostly showing signs shortly before adolescence.

In SCA2, the CAG repeat in affected adults varies in length from 34 to 59 CAG repeats. The expansion mutation in *ATXN2* in infantile cases can be very severe, reaching the range of 124 and 750 CAGs, and the range between 62 and 92 defines onset in early childhood. Typically, SCA2 presents with progressive involuntary movements of the limbs, sensorimotor neuropathy, and slowed eye movements. The abnormal eye movements and myoclonic jerks are generally the first symptoms seen in infantile and early childhood cases, with the onset of disease as early as 2 months of age (Moretti et al., 2004; Vinther-Jensen et al., 2013; Singh et al., 2014; Sánchez-Corona et al., 2020). Besides these, pigmentary retinopathy, seizures, dysphagia, and early death are unfortunately also standard features of juvenile SCA2 (Babovic-Vuksanovic et al., 1998; Mao et al., 2002). The MRI of children with very early-onset SCA2 (age from 7 to 17 months)

revealed enlarged lateral ventricles, markedly small cerebellum and vermis, and associated atrophy involving the brainstem and both cerebral hemispheres. Moreover, increasing cerebral white matter loss, dysmyelination, pontocerebellar atrophy, and thinning of the corpus callosum was observed during SCA2 disease progression (Moretti et al., 2004; Ramocki et al., 2008; Paciorkowski et al., 2011; Vinther-Jensen et al., 2013; Singh et al., 2014). Histopathology findings in the cerebellar cortex showed a profound loss of Purkinje and granular neurons with severe attenuation of the molecular layer (Paciorkowski et al., 2011).

Abnormally long polyQ tract in the ataxin 7 (*ATXN7*) gene primarily manifests as cerebellar ataxia in SCA7. Healthy alleles of this gene contain up to 35 CAG repeats, whereas SCA7 affected individuals have more than 39 repeats (David et al., 1997; Stevanin et al., 1998). The childhood-onset of SCA7 is the consequence of more than 100 CAG repeats in the *ATXN7* gene (La Spada, 2020). It is a severe developmental syndrome with patient death reported as early as 6 weeks of age (Neetens et al., 1990). The unique symptom is retinal degeneration, which often is the first presenting symptom (Niewiadomska-Cimicka and Trottier, 2019). Besides the classic symptoms of progressive cerebellar ataxia and retinal degeneration, the juvenile cases of SCA7 presented with absent or depressed deep tendon reflexes, which is not the case in the adult-onset type of the disease (Enevoldson et al., 1994). Other studies reported symptoms such as seizures, dysphagia, myoclonus, head lag, the absence of cough reflex, and severe hypotonia, but also symptoms more uncommon for PolyQ diseases such as cardiac involvement, hepatomegaly, multiple hemangiomas, atrial septum defect, patent ductus arteriosus, and congestive heart failure accompany ataxia (Benton et al., 1998; Johansson et al., 1998; van de Warrenburg et al., 2001; Ansorge et al., 2004). Concerning histopathology, adult SCA7 is characterized by neural loss, mainly in the cerebellum and regions of the brainstem, particularly the inferior olivary complex (Holmberg, 1998). Juvenile cases present marked atrophy of both the cerebrum and cerebellum, ventricular dilation, as well as delayed myelination (Benton et al., 1998). Other reports show diffuse brain volume reduction and increased atrophy of the brainstem and cerebellum during SCA7 disease progression (Donis et al., 2015). The most affected cell types in SCA7 are retinal, cerebellar, and medullar neurons (Naphade et al., 2019).

In DRPLA, the affected gene is *ATN1* (Koide et al., 1994), a transcriptional regulator involved in the brain and other organ development (Palmer et al., 2019). In the case of the *ATN1* gene, CAG repeat sizes can vary between 6 and 35 in healthy individuals, while the expansion of more than 48 repeats results in full penetrance and gives rise to the disease (Nagafuchi et al., 1994). Patients with juvenile-onset DRPLA often have progressive myoclonic epilepsy as one of the first symptoms (Tomoda et al., 1991), and the onset in the first years of life with CAG repeats between 70 and 80 (Veneziano and Frontali, 1993; Hasegawa et al., 2010). Disease onset could occur as early as 6 months of age (with an extreme number of CAG repeats of 90 and 93), when hyperkinetic and involuntary movements, the difficulty of controlling head movements, and seizures developed (Shimojo et al., 2001). In general, DRPLA is

characterized by severe neuronal loss in the dentatorubral and pallidal-subthalamic nucleus (corpus Luysii). Juvenile-onset can be characterized by more marked pallidolusian degeneration than dentatorubral degeneration, which is opposite to late-adult onset degeneration pattern (Yamada, 2010). MRI data of children with DRPLA showed severe atrophy of the cerebrum and cerebellum, delayed myelination, and thin corpus callosum (Shimojo et al., 2001). However, atrophy of the brainstem and spinal cord was noticed as mild (Takeda and Takahashi, 1996). Histochemistry revealed mild neuronal loss with gliosis in the cerebral cortex (Hayashi et al., 1998; Tsuchiya et al., 1998). The most affected cell types in DRPLA are striatal medium spiny neurons and pallidal neurons (Naphade et al., 2019).

SCA17 is caused by an abnormal number (more than 45–47) of CAG or CAA repeats in the TATA box-binding protein (TBP) (Gao et al., 2008; Toyoshima and Takahashi, 2018). In SCA17, a small gain in CAG number in the TBP gene results in a very severe level of genetic anticipation (Maltecca et al., 2003; Rasmussen et al., 2007). For instance, CAG repeats in the range of 55–58 may cause the disease onset at age 20, 61 CAG was associated with onset at age 11, while 66 CAGs resulted in onset at the age of 3 years (Koide et al., 1999; Maltecca et al., 2003; Rasmussen et al., 2007). Common features of the disease are ataxic gait, dysarthria, loss of muscle control, seizures, spasticity, tremor, and intellectual disability. Given the strong anticipation resulting from only low intergenerational expansion, SCA17 and TBP may strongly influence the brain development and transcriptional control of developmental genes. MRI data of 14 years old female with SCA17 showed prominent cerebellar atrophy accompanied by a dilatation of the fourth ventricle and mild cerebral atrophy as well as dilatation of the lateral ventricles (Koide et al., 1999). It is familiar with neuroimaging studies of a family with age at onset range from very early to adult-onset that showed cerebral and cerebellar atrophy in all patients (Maltecca et al., 2003). The most affected cell types in SCA17 are Purkinje, medium spiny cortical, and dopaminergic neurons (Naphade et al., 2019).

In SCA3, disease occurs above 51 or more CAG repeats in ATXN3, while healthy individuals have 12–43 repeats. SCA3 early childhood-onset, described in 2016, involved the range of CAG repeat between 80 and 91 (Donis et al., 2016). The progression of the disease was faster compared to adolescent cases and the signs observed were ataxia, pyramidal findings, and dystonia. In previous SCA3/MJD cohorts, the maximal number of CAGs was 86 (Todd and Paulson, 2010; Tezenas du Montcel et al., 2014). Pathological examination of juvenile SCA3 patients has shown degeneration and mild gliosis of the substantia nigra, dentate, pontine and cranial nerve nuclei, anterior horns, and Clarke's columns, with the consequent loss of fibers of the superior and middle cerebellar peduncles and spinocerebellar tracts (Coutinho et al., 1982). The most affected cells in adult SCA3 are motor neurons (Naphade et al., 2019). However, in juvenile cases of SCA3 severe nerve cell loss was observed in the dorsal root and trigeminal ganglia (Coutinho et al., 1982).

SCA6 is caused by a polyQ mutation in the calcium channel gene *CACNA1A* (Zhuchenko et al., 1997). SCA6 develops due to a relatively low number of CAG repeats, with 5 to 20 repeats

being considered healthy and 21 repeats and above giving rise to the disease (Ishikawa et al., 1997). A study by Wang et al. (2010) showed that neurodegeneration in SCA6 also occurs in the spinal cord. Results of an autopsy of siblings with early-onset SCA6 revealed severe neurodegeneration in the cerebellum, dentate nucleus, and olivary nuclei (Wang et al., 2010). The most affected cell type in both adult and juvenile SCA6 are Purkinje cells (Wang et al., 2010; Naphade et al., 2019).

The length of CAG repeats in infantile or childhood PolyQ diseases highly influences the onset and severity of the disease. Moreover, genetic anticipation, earlier (and more severe) disease onset in successive generations, is playing a crucial role in the majority of these disorders (Jones et al., 2017).

Spinal bulbar muscular atrophy, also referred to as Kennedy disease, is a form of spinal muscular atrophy that is recessive and X-linked, and therefore only occurs in males. The cause of SBMA is a CAG repeat expansion in exon one of the androgen receptor gene, and the CAG triplet number is mostly in the range of 38 to 62. Unlike in other PolyQ diseases discussed here, the number of CAG repeats only poorly predicts the age of onset (muscle weakness) (Sperfeld et al., 2002; Echaniz-Laguna et al., 2005). Grunseich (Grunseich et al., 2014) presents juvenile onset with 68 CAG repeats. Juvenile onset commonly manifests itself with limb atrophy and gynecomastia between 8 to 15 years of age (Echaniz-Laguna et al., 2005). Neurodegeneration in adult SBMA is mainly characterized by loss of motor neurons in the spinal cord and brainstem, white matter atrophy, and partial androgen insensitivity (Arnold and Merry, 2019). Quantitative brain imaging studies of SBMA patients demonstrated white matter alterations in the corticospinal tracts (CST), limbic system (Kassubek et al., 2007; Unrath et al., 2010), and cerebellum (Pieper et al., 2013). Likewise degeneration of the dorsal root ganglia, loss of lower motor neurons in the anterior horn of the spinal cord as well as in the brainstem motor nuclei except for the third, fourth and sixth cranial nerves. On a cellular level, there is a presence of nuclear inclusions, especially in residual motor neurons in the brainstem, spinal cord, and non-neuronal tissues such as the prostate, testes, and skin (Naphade et al., 2019).

REVIEW OF JUVENILE- AND ADULT-ONSET HD AND OTHER POLYQ DISEASES TRANSCRIPTOMIC DATA: DYSREGULATED GENES OVERLAP AND GO TERMS OVER-REPRESENTATION ANALYSIS

To obtain a broader view of the role of the very long CAG repeats and very long polyQ tracts in proteins in early brain development, we collected published transcriptomic data from human juvenile- and adult-onset HD (An et al., 2012; Feyeux et al., 2012; HD iPSC Consortium, 2012; Chiu et al., 2015; Ring et al., 2015; Nekrasov et al., 2016; The HD iPSC Consortium, 2017; Mehta et al., 2018; Świtońska et al., 2019; Al-Dalahmah et al., 2020; Smith-Geater et al., 2020) and also published RNAseq or microarray data from different PolyQ mouse models (Suzuki et al., 2012;

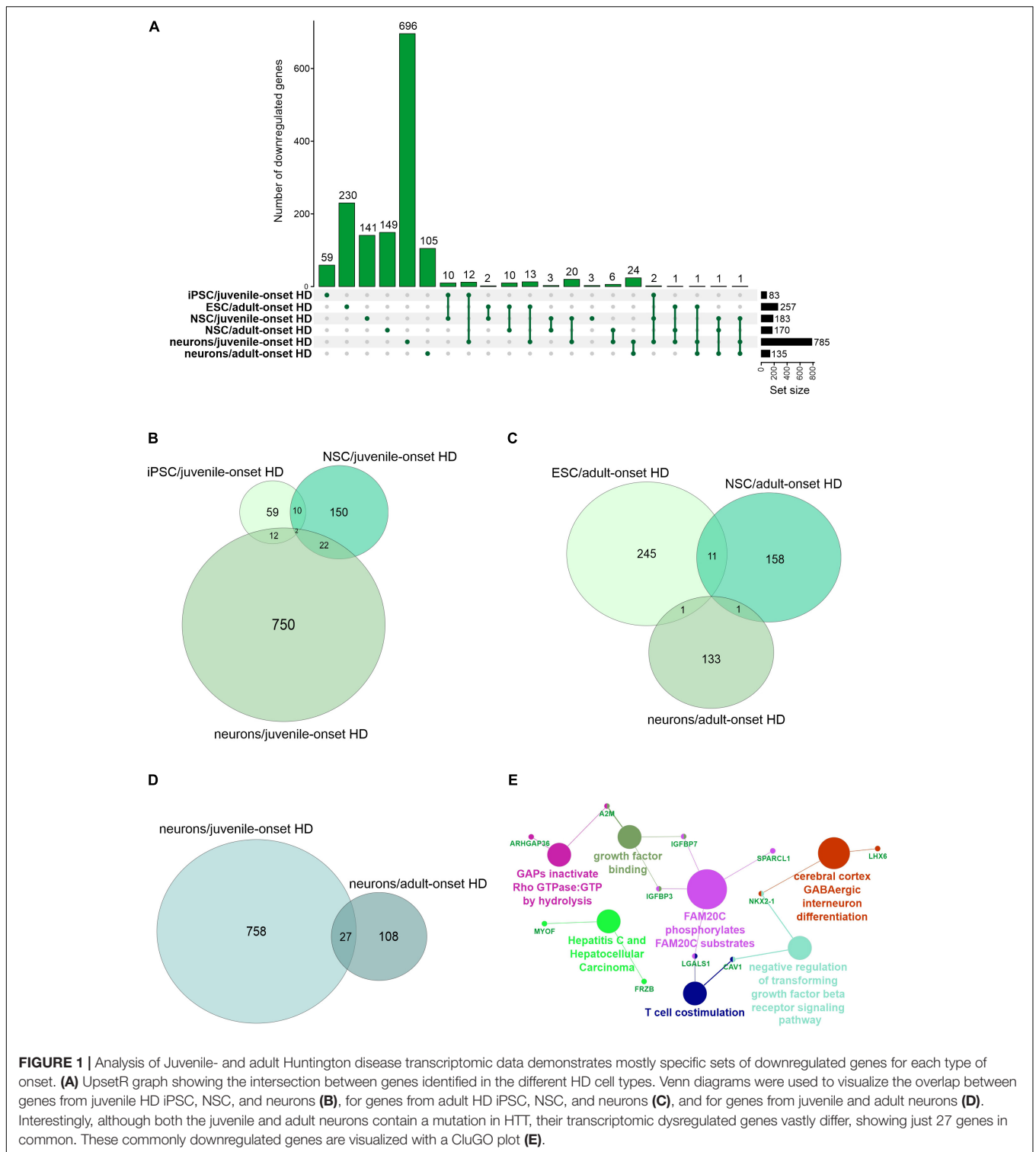
Aikawa et al., 2015; Agostoni et al., 2016; Pflieger et al., 2017; Driessen et al., 2018; Hervás-Corpión et al., 2018; Malik et al., 2019; Liu et al., 2020; Stoyas et al., 2020). The published mouse data from SCA1, SCA2, SCA6, SCA7, SCA17, and DRPLA were originally collected from different brain regions, however, data from SBMA mice were collected from primary motor neurons in the spinal cord. An overview of data from all papers included in the analysis can be found in **Supplementary Table 1**. Transcriptomic data were retrieved from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository, if possible, or from the **Supplementary Material** provided with the original publication. A cut-off of p -value < 0.05 was considered as significant. In papers with much higher number of identified genes, we set a cut-off of p -value < 0.001 (HD iPSC Consortium, 2012; The HD iPSC Consortium, 2017). The analysis of overlapping dysregulated genes (DEGs) between diseases was created and visualized with R software 3.6.3 (R Core Team, 2018) and its three packages: UpSetR (Conway et al., 2017), ComplexHeatmap (Gu et al., 2016), and VennDiagram (Chen and Boutros, 2011). GO terms over-representation analysis was conducted in Cytoscape (Shannon et al., 2003) and its ClueGO app (Bindea et al., 2009, 2013). In order to conduct a thorough comparative study, and look separately into up- and downregulation in various cell populations, we had to combine data identified by several different methods, such as RNAseq and microarrays. In the summary table, we added a short note about the type of method used in each publication for obtaining the transcriptomic data (**Supplementary Table 1**).

Previously Published Transcriptomic Data Show Molecular Downregulation in Juvenile-Onset Human HD and Highlights Organism Morphogenesis, Neurodevelopment and Synaptic Transmission

We first focused on the publications with human data where the main aim was to compare genes dysregulated in two types of HD onset in a more detailed way. We assessed the overlap of DEGs between different cell types and between different types of HD disease onset (**Figures 1, 2**). We focused on data from embryonic stem cells (ESC), induced pluripotent stem cells (iPSC), neural stem cells (NSC), and neurons. With such a collection, we were able to check whether there are genes downregulated in HD from the very beginning and at the same time through the whole “neurodifferentiation axis”. The analyses revealed two genes shared between iPSC, NSC, and neurons in data from JOHD, *TBX15*, and *HOXB6* (**Figures 1A,B** and **Supplementary Table 1**). These two genes encode transcription factors that regulate a variety of developmental processes. We identified 12 and 22 genes shared between iPSC and NSC with neurons, respectively, in JOHD (**Figures 1A,B** and **Supplementary Table 1**). The firstly mentioned 12 genes are again connected in the majority with the regulation of transcription. The NSC/neurons shared genes are involved in developmental biology and particularly

on embryonic skeletal system morphogenesis. Regarding adult-onset HD, we did not identify genes commonly downregulated in every cell type and only identified a group of 11 genes shared between ESC and NSC (**Figure 1C** and **Supplementary Table 1**). Altogether, the created Venn diagrams highlight the fact that in JOHD, molecular processes and genes downregulated on very early stages of organism development may have a direct impact on the later brain and neuronal formation, hence resulting in a much earlier disease onset. The UpSetR diagram did not show much of an overlap of downregulated genes between juvenile and adult HD (**Figure 1A**). Nonetheless, 27 significantly dysregulated genes were identified in neurons obtained from both the adult and juvenile disease types (**Figures 1D–E**). Those are involved, among others, in the cerebral cortex GABAergic interneuron differentiation, which aberration leads to an imbalance between excitatory and inhibitory signaling, affecting motor and cognitive processes during HD pathogenesis (Hsu et al., 2018). We also analyzed which biological processes include genes downregulated only in juvenile or only in adult HD. This resulted in a big cluster of various early neurodevelopmental processes, organism morphogenesis, and signal transduction for JOHD (**Figure 3**), which was not the case for adult HD. Besides some neuronal GO terms connected with genes downregulated in adult HD, no obvious cluster of connected processes was identified. Particularly interesting were the four papers with transcriptomic data on human juvenile-onset HD neurons and four articles concerning human adult-onset HD neurons, which we compared (HD iPSC Consortium, 2012; Chiu et al., 2015; Nekrasov et al., 2016; Mehta et al., 2018; Świtońska et al., 2019; Al-Dalahmah et al., 2020; Smith-Geater et al., 2020). A total of 27 downregulated and 48 upregulated genes in neurons were found to be shared between juvenile-onset and adult-onset HD (**Figures 1D, 2D**). A total of 758 downregulated and 632 upregulated genes in neurons were found to be unique for juvenile-onset HD, and an additional 108 downregulated, and 451 upregulated genes in neurons were unique to adult-onset HD (**Figures 1D, 2D**). A complete list of common and uniquely dysregulated genes can be found in the **Supplementary Data** of this work (**Supplementary Table 1**).

After the assessment of gene overlaps, we performed pathway analysis with ClueGO app (Cytoscape). We found that the DEGs uniquely downregulated in juvenile-onset HD neurons are significantly involved in developmental processes, such as Dopaminergic Neurogenesis (PW:0000394), Differentiation Pathway (WP2848), spinal cord development (GO:0021510), Neuronal System (R-HSA-112316.7), Neural Crest Differentiation (WP2064), presynaptic active zone assembly (GO:1904071), anterior/posterior axon guidance (GO:0033564), metencephalon development (GO:0022037), Potassium Channels (WP2669), and DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific (GO:0001228). Besides developmental processes, a substantial subset of the uniquely downregulated genes in JOHD-derived neurons is involved in synaptic processes, regulation of synaptic transmission, glutamatergic (GO:0051967 and GO:0051968), Cholinergic synapse (GO:0098981), neurotransmitter secretion (GO:0007269), axon terminus (GO:0043679), positive regulation of dopamine secretion (GO:0033603), regulation of neuronal



synaptic plasticity (GO:0048168), and regulation of dendrite morphogenesis (GO:0048814). In **Supplementary Table 2**, we present a list of the most significantly involved pathways in uniquely downregulated DEGs in JOHD or adult-onset HD, grouped by biological processes, and highlight the input genes

found in those pathways. The GO terms unique to neurons of adult-onset HD patients suggest a more developed, more mature cellular expression pattern compared to the juvenile-onset HD.

Inspired by transcriptomic data generated by Haremaiki and colleagues (Haremaiki et al., 2019) we decided to extend our

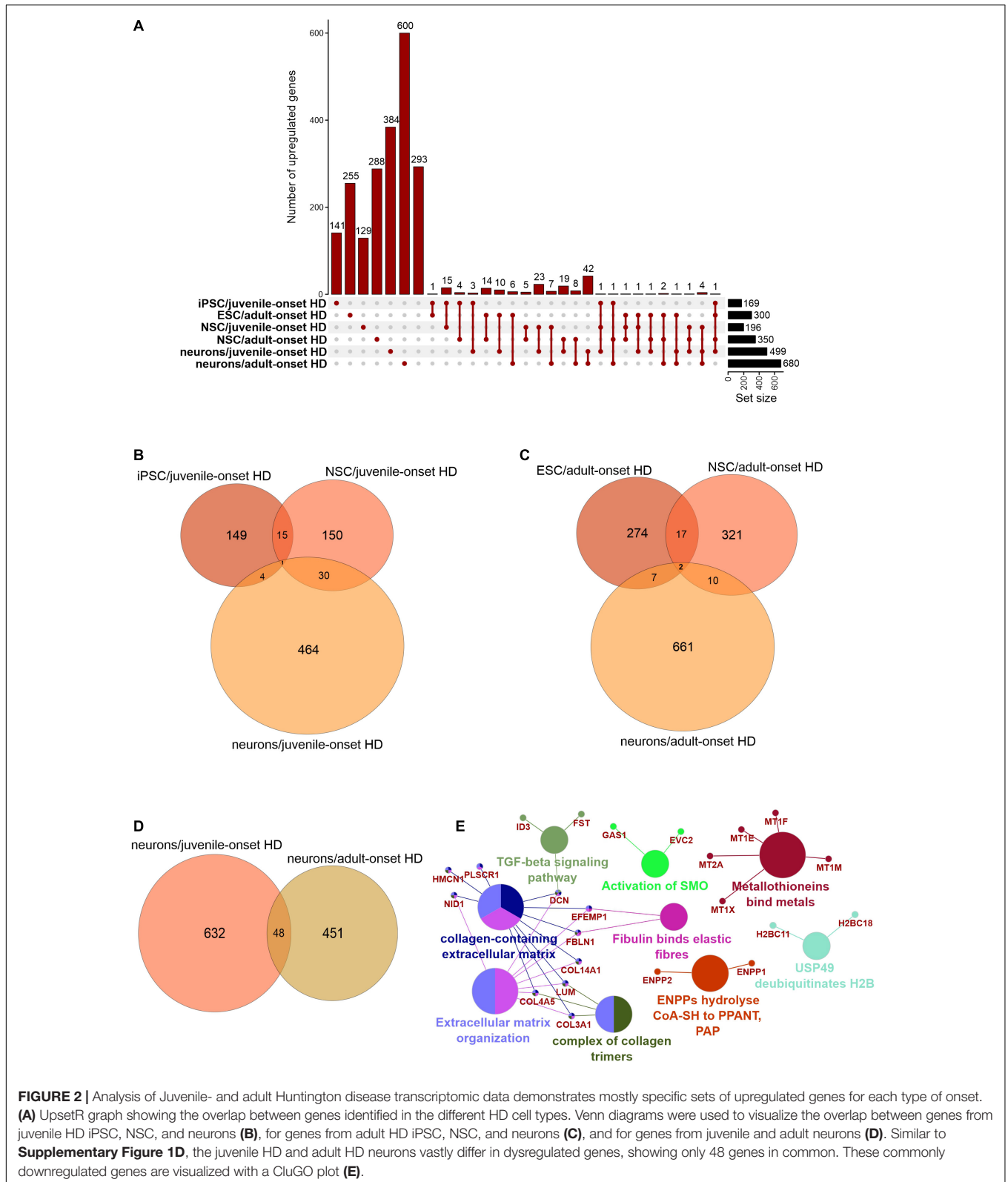
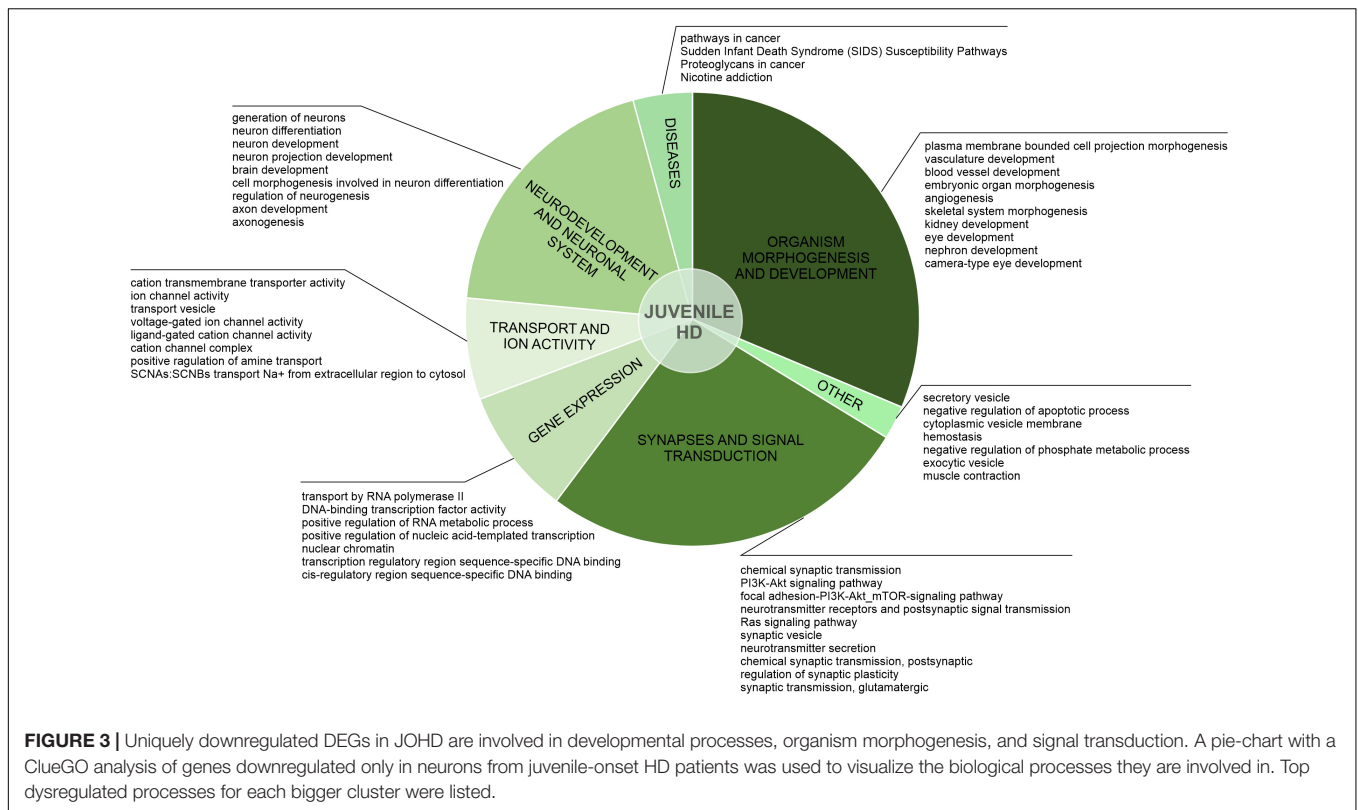


FIGURE 2 | Analysis of Juvenile- and adult Huntington disease transcriptomic data demonstrates mostly specific sets of upregulated genes for each type of onset. **(A)** UpsetR graph showing the overlap between genes identified in the different HD cell types. Venn diagrams were used to visualize the overlap between genes from juvenile HD iPSC, NSC, and neurons **(B)**, for genes from adult HD iPSC, NSC, and neurons **(C)**, and for genes from juvenile and adult neurons **(D)**. Similar to **Supplementary Figure 1D**, the juvenile HD and adult HD neurons vastly differ in dysregulated genes, showing only 48 genes in common. These commonly downregulated genes are visualized with a CluGO plot **(E)**.

bioinformatic study with one additional comparative analysis. As previously mentioned, Haremakei and colleagues succeeded in recapitulating human neurulation by generating neuruloids

harboring neural progenitors, neural crest, sensory placode, and epidermis. These self-organizing structures provide a great opportunity to study the developmental aspects of many human



diseases, especially HD. Having the insight into single-cell transcriptomics from healthy and HD neuruloids, we decided to compare these data with the ones collected for our comparative study. We compared down- and upregulated genes from our cohort to each group of markers specific to a particular cell population identified in scRNA-seq of healthy neuruloids, neuroepithelial identity NE1 and NE2, neurons, skin, neural crest (NC), placode and U1 neurons, and also to a list of differentially expressed genes in NE and NC populations in HD neuruloids (Supplementary Table 4). We identified a significant number of genes shared between markers for neuruloid neurons population and downregulated genes in stem cell-derived neurons in juvenile-onset HD (Supplementary Table 4). This is coherent with GO term over-representation analysis and again highlights the significant downregulation of crucial genes and thus many biological processes during the very early neurogenesis.

HD and SCA1 Seems to Have More Common Transcriptionally Dysregulated Genes Than Other PolyQ Diseases in Mice

In rare PolyQ diseases availability of patient samples and RNAseq data is limited. Therefore, more data can be acquired from mouse models of PolyQ diseases. An extensive review of polyQ mouse models can be found in the works of Figiel et al. (2012) and Switonski et al. (2012). The high CAG repeat numbers are needed in polyQ mouse models to express a disease phenotype; therefore, they may be considered as polyQ models

of juvenile-onset type. Therefore, the second data collection for this bioinformatic review was from nine publications concerning mouse brain transcriptomics in several PolyQ diseases, such as HD, SCA1, SCA2, SCA6, SCA7, SCA17, DRPLA, and SBMA (Suzuki et al., 2012; Aikawa et al., 2015; Agostoni et al., 2016; Pflieger et al., 2017; Driessen et al., 2018; Hervás-Corpión et al., 2018; Malik et al., 2019; Liu et al., 2020; Stoyas et al., 2020) (Supplementary Table 1). After adjusting *p-value* cut-off, the following number of genes was collected: 697 downregulated and 167 upregulated DEGs in HD and, respectively, 643 and 144 in SCA1, 134 and 80 in SCA2, 493 and 349 in SCA6, 64 and 27 in SCA7, 246 and 187 in SCA17, 250 and 162 in SBMA, 225 and 318 in DRPLA (Figures 4, 5 and Supplementary Table 1). The most significant subset of commonly shared DEGs were 87 downregulated genes common between HD and SCA1 (Figure 4B and Supplementary Table 3). ClueGo analysis revealed the involvement of DEGs in Amphetamine addiction (KEGG hsa05031), Opioid signaling (WP1978), neuronal cell body membrane (GO:0032809), and integrin cell surface markers (WP1833) (Figure 4C and Supplementary Table 5). SBMA stood out as the least common of the PolyQ diseases, with 235 out of 250 downregulated and 152 out of 162 upregulated genes being uniquely expressed in SBMA only (Figures 4A, 5A).

Two genes were shared between five of the PolyQ diseases (G Protein Subunit Gamma 13 (*Gng13*) in SCA1, 2, 7, 17, and DRPLA, and Glutamate receptor delta two interacting protein (*Grid2ip*) in HD, Sca1, 2, 7, and 17). *Gng13* encodes the gamma subunit of heterotrimeric G proteins, which are

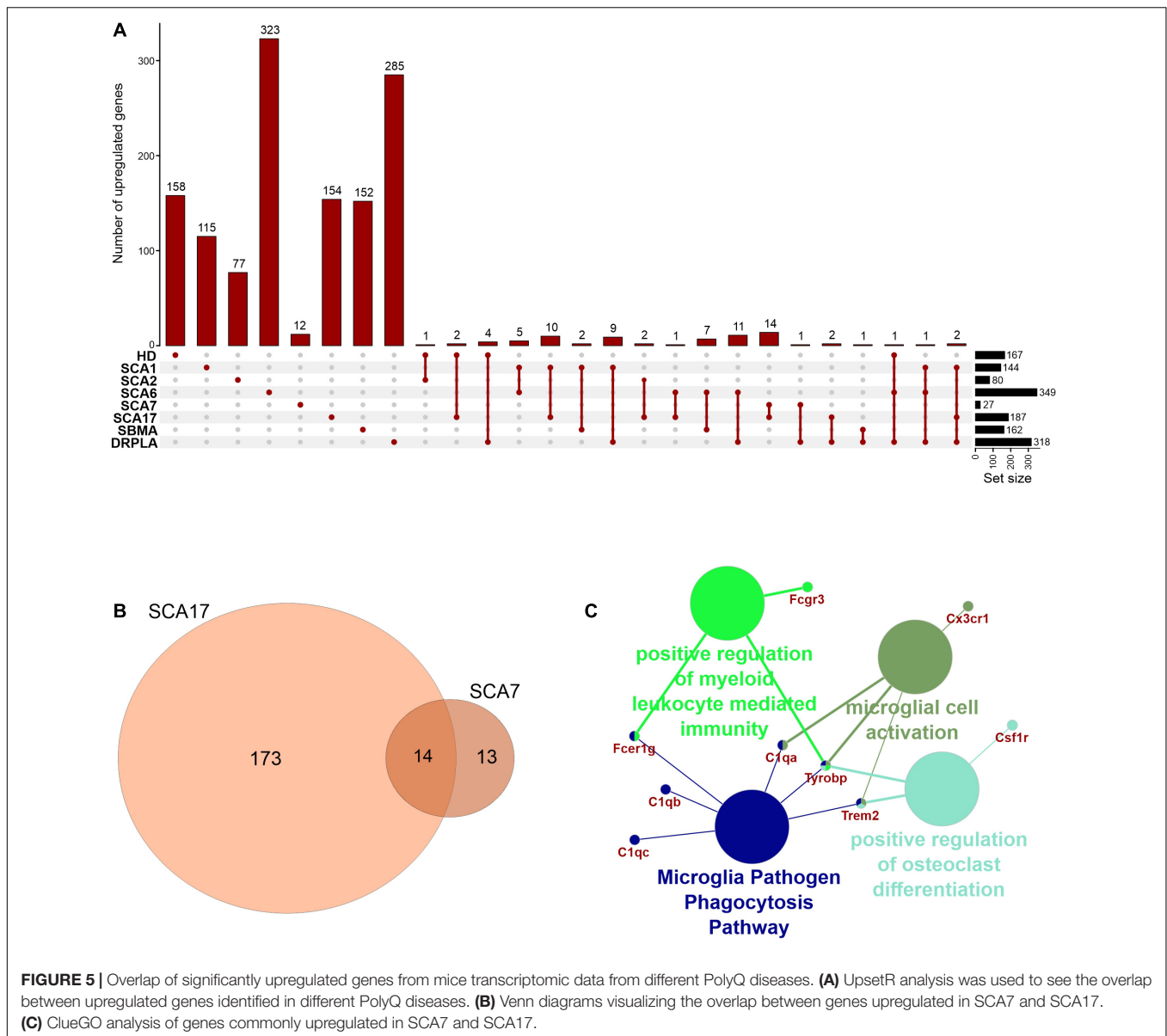


FIGURE 5 | Overlap of significantly upregulated genes from mice transcriptomic data from different PolyQ diseases. **(A)** UpsetR analysis was used to see the overlap between upregulated genes identified in different PolyQ diseases. **(B)** Venn diagrams visualizing the overlap between genes upregulated in SCA7 and SCA17. **(C)** ClueGO analysis of genes commonly upregulated in SCA7 and SCA17.

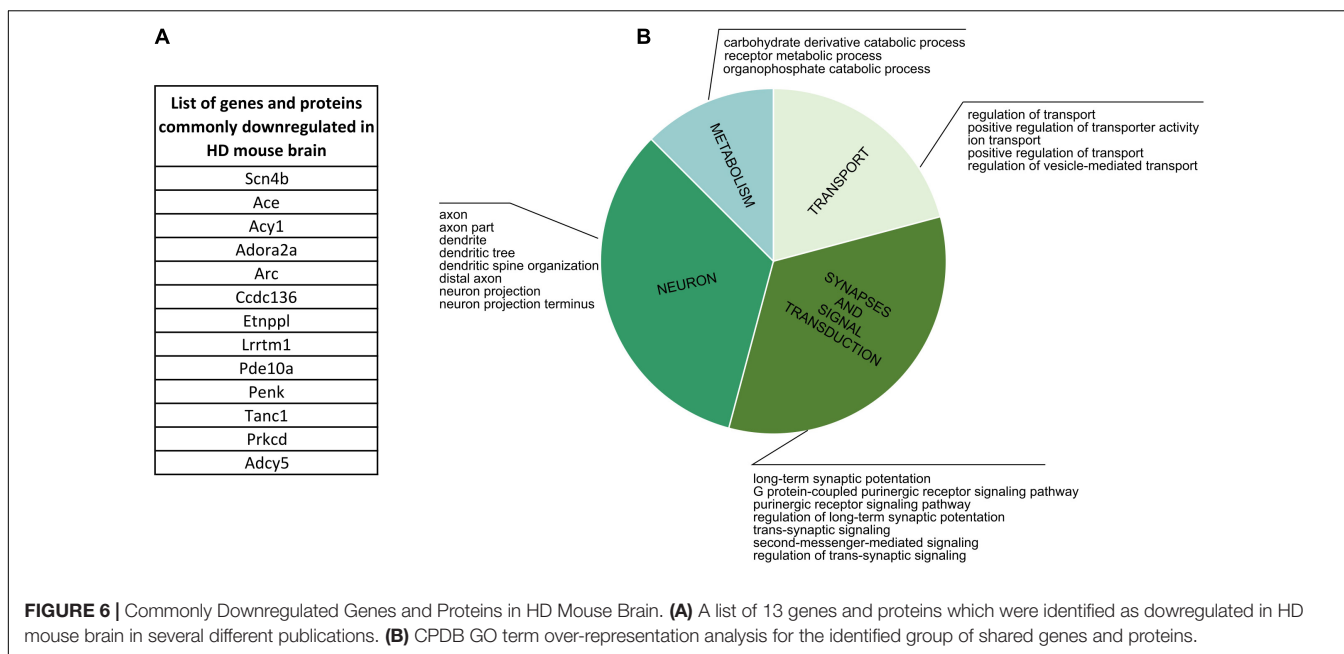
8 (*Rgs8*), Regulator Of G Protein Signaling 16 (*Rgs16*), and Purkinje Cell Protein 4 (*Pcp4*), commonly dysregulated in HD, SCA1, DRPLA, and either SCA6 (*Rgs16*), or SCA7 (*Rgs8* and *Pcp4*). These DEGs are all involved in calmodulin-binding, which acts as part of a calcium signal transduction pathway and has roles in cellular mechanisms, including metabolism, synaptic plasticity, nerve growth, smooth muscle contraction (Hyman and Pfenninger, 1985; Xia and Storm, 2005; Kleerekoper and Putkey, 2009; Mouton-Liger et al., 2011; Wang and Putkey, 2016).

Finally, several Cerebellin (*Cbln1*, 2, 3, and 4), Matrix Metalloproteinases (*Mmp8*, 9, 16, 17, and 20), and Collagen (*Col5a1*, *Col6a4*, *Col11a1*, *Col18a1*, *Col20a1*, and *Col25a1*) isoforms are downregulated in compared PolyQ diseases. While no commonly dysregulated isoform was found, the downregulation of these proteins is important for synaptic activity and the modulation of the extracellular matrix,

further hinting to an important role of WM alterations in PolyQ diseases.

Commonly Downregulated Genes and Proteins in HD Mouse Brain Are Connected to Neuron Development, Synapses and Signal Transduction, and Cellular Transport

Additionally, we collected published proteomic data from human juvenile- and adult-onset HD (Chen et al., 2012; Schönberger et al., 2013; McQuade et al., 2014; Ratovitski et al., 2016; Ramdzan et al., 2017; Ooi et al., 2019; Świtońska et al., 2019), mice HD models (Deschepper et al., 2012; Skotte et al., 2018; Sap et al., 2019; Sapp et al., 2020) and SCA1 mouse model (Stucki et al., 2016). No data from SCA2, SCA6, SCA7, SCA17, DRPLA, and



SBMA were found. Since the availability of published proteomic data is very limited, our analysis of this data is also limited compared to the transcriptomic part. Therefore, we mainly focused on GO term analysis and searching for similarities between dysregulated genes and proteins in human and mouse HD. GO terms over-representation analysis was conducted in ConsensusPathDB (CPDB) (Herwig et al., 2016). An overview of collected data and all of the GO terms analyses for particular sets of proteins can be found in **Supplementary Table 5**.

Firstly, we focused on comparing proteins and genes dysregulated in the corresponding cell populations in human HD (**Supplementary Table 5**). The comparison didn't result in any bigger common group, but nonetheless we were able to identify three shared downregulated genes/proteins: TP53, ELAVL2, COL1A2, together connected with mRNA and protease binding, and four commonly upregulated genes/proteins: LAMB1, CD44, SPP1 and HIST1H1B, which are connected with cell morphogenesis and neuron development. Cell-specific CPDB GO term analysis of human HD proteomic data highlighted mainly neurodevelopment and organism morphogenesis, various metabolic processes, cellular transport, gene expression and DNA damage and apoptosis. Secondly, the comparative analysis of mouse data resulted in identifying an overlap between 13 genes and proteins significantly downregulated in HD mouse brain (**Figure 6** and **Supplementary Table 5**). GO term analysis highlighted four main clusters of biological processes to which the identified genes are connected, such as transport regulation, synapses and signaling, neuron development and metabolism.

Finally, we analyzed lists of dysregulated proteins from mouse HD brain to further characterize if there are specific clusters of biological processes connected uniquely with up- or downregulation of certain proteins. We identified two main groups of GO terms for downregulated proteins: transport and

ion activity and synapses and signal transduction, and two other main groups for upregulated proteins: DNA and nucleus, and neurodevelopment and organism morphogenesis.

CPDB over-representation analysis of proteins downregulated in SCA1 mouse brain also highlighted synapses and signal transduction and transport-related processes, while upregulation was more connected to metabolism and developmental aspects.

DISCUSSION AND CONCLUDING REMARKS

Although the juvenile and infantile forms make up a minority of PolyQ disease cases, the early onset makes these diseases an example of neurodevelopmental disorders. Indeed, the results of our bioinformatic study of the available transcriptomic data reveal that uniquely dysregulated genes in juvenile-onset HD neurons are involved in several (neuro)developmental pathways leading to early symptoms in patients. Our group and others have previously demonstrated a neurodevelopmental component in HD pathogenesis, and further exciting evidence was delivered only very recently (Kubera et al., 2019; Barnat et al., 2020). Moreover, HTT has an impact on the cortical volume and brain connections, leading to better general intelligence score (IQ) in people with larger (sub-disease) PolyQ repeats (Lee et al., 2017; Lee J. K. et al., 2018). An increasing number of studies created a body of evidence for transcriptional modulators of PolyQ tracts not only in HD but also in other PolyQ diseases, like SCAs, mentioned in this manuscript (Paulson et al., 2017; Buijsen et al., 2019).

Our analysis combines numerous data sets on polyQ transcriptomics into one collection and demonstrates several

neurodevelopmental transcriptomic commonalities to the diseases. There are genes unique in JOHD neurons and individual genes that are downregulated in four or more of the independent PolyQ diseases mouse models. The genes were involved in neural growth, synaptogenesis, and synaptic plasticity, and extracellular matrix remodeling, suggesting a critical role of brain connections and WM changes roles in PolyQ disease pathology. *HTT*, *ATN1*, *TBP*, and Ataxins have previously been identified as transcriptional regulators (Benn et al., 2008; Kumar et al., 2014; Gao et al., 2019) therefore, our results are in agreement with the previously formulated hypothesis that transcriptional dysregulation is a solid feature of several PolyQ diseases (Helmlinger et al., 2006). The addition of proteomic dataset further highlights neural growth and synaptogenesis and signal transduction as main biological processes in which dysregulated proteins are involved.

Polyglutamine diseases are relatively rare, thus, only a limited number of publications with transcriptomic data were available for our bioinformatic analysis. More research into PolyQ diseases is needed to understand better the mechanistic aspects of the disease pathology. Moreover, studies that will focus on the unique differences between juvenile- and adult-onset would be of interest, as the longer CAG repeat mutations augment the transcriptional potential of the affected protein, which may lead to compromised neurodevelopment.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KŚ-K, BK, JD, and MF wrote the manuscript. KŚ-K performed all bioinformatics associated with R software, ClueGO and CPDB analyzes of data. All authors read and approved the final manuscript. MF was responsible for the concept of this review and for obtaining funding.

REFERENCES

- Agostoni, E., Michelazzi, S., Maurutto, M., Carnemolla, A., Ciani, Y., Vatta, P., et al. (2016). Effects of Pin1 loss in Hdh(Q111) knock-in mice. *Front. Cell. Neurosci.* 10:110. doi: 10.3389/fncel.2016.00110
- Ahmad, S. T., Rogers, A. D., Chen, M. J., Dixit, R., Adnani, L., Frankiw, L. S., et al. (2019). Capicua regulates neural stem cell proliferation and lineage specification through control of Ets factors. *Nat. Commun.* 10:2000. doi: 10.1038/s41467-019-09949-6
- Aikawa, T., Mogushi, K., Iijima-Tsutsui, K., Ishikawa, K., Sakurai, M., Tanaka, H., et al. (2015). Loss of MyD88 alters neuroinflammatory response and attenuates early Purkinje cell loss in a spinocerebellar ataxia type 6 mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4780–4791. doi: 10.1093/hmg/ddv202
- Al-Dalahmah, O., Sosunov, A. A., Shaik, A., Ofori, K., Liu, Y., Vonsattel, J. P., et al. (2020). Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states. *Acta Neuropathol. Commun.* 8:19. doi: 10.1186/s40478-020-0880-6
- An, M. C., Zhang, N., Scott, G., Montoro, D., Wittkop, T., Mooney, S., et al. (2012). Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 253–263. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.026
- Ansorge, O., Giunti, P., Michalik, A., Van Broeckhoven, C., Harding, B., Wood, N., et al. (2004). Ataxin-7 aggregation and ubiquitination in infantile SCA7 with 180 CAG repeats. *Ann. Neurol.* 56, 448–452. doi: 10.1002/ana.20230
- Arai, Y., and Taverna, E. (2017). Neural progenitor cell polarity and cortical development. *Front. Cell. Neurosci.* 11:384. doi: 10.3389/fncel.2017.00384
- Arnold, F. J., and Merry, D. E. (2019). Molecular mechanisms and therapeutics for SBMA/Kennedy's disease. *Neurotherapeutics* 16, 928–947. doi: 10.1007/s13311-019-00790-9
- Babovic-Vuksanovic, D., Snow, K., Patterson, M. C., and Michels, V. V. (1998). Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA 2) in an infant with extreme CAG repeat expansion. *Am. J. Med. Genet.* 79, 383–387.
- Barbeau, A. (1970). Parental ascent in the juvenile form of Huntington's chorea. *Lancet* 2:937. doi: 10.1016/s0140-6736(70)92119-7
- Barnat, M., Capizzi, M., Aparicio, E., Boluda, S., Wennagel, D., Kacher, R., et al. (2020). Huntington's disease alters human neurodevelopment. *Science* 369, 787–793. doi: 10.1126/science.aax3338
- Benn, C. L., Sun, T., Sadri-Vakili, G., McFarland, K. N., DiRocco, D. P., Yohrling, G. J., et al. (2008). Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *J. Neurosci.* 28, 10720–10733. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2126-08.2008
- Benton, C. S., de Silva, R., Rutledge, S. L., Bohlega, S., Ashizawa, T., and Zoghbi, H. Y. (1998). Molecular and clinical studies in SCA-7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype. *Neurology* 51, 1081–1086. doi: 10.1212/wnl.51.4.1081
- Bindea, G., Galon, J., and Mlecnik, B. (2013). CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29, 661–663. doi: 10.1093/bioinformatics/btt019
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., et al. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped

FUNDING

This work was supported by the grant from the National Science Centre (grant number 2018/31/B/NZ3/03621).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.642773/full#supplementary-material>

Supplementary Table 1 | Transcriptomic data included in the comparative bioinformatic study. Data were retrieved from the Gene Expression Omnibus (GEO) repository, if possible, or from the **Supplementary Material** provided with the publication. A cut-off of p -value < 0.05 was considered as significant. In two publications, with a greater number of identified genes, we set a cut-off of p -value < 0.001.

Supplementary Table 2 | Biological processes, molecular function, and cellular components ClueGO analysis for genes downregulated in neurons from juvenile-onset HD patients (stem cell-derived or collected post-mortem). Top downregulated processes were visualized in **Figure 3**.

Supplementary Table 3 | Biological processes, molecular function, and cellular components ClueGO analysis for common transcriptionally downregulated genes in HD and SCA1 mice.

Supplementary Table 4 | Comparative analysis between scRNA-seq data from neuroloid paper (Haremakki et al., 2019) and human data collected for our comparative study. We compared down- and upregulated genes from our cohort to each group of markers specific to a particular cell population identified in scRNA-seq of healthy neuroloids, neuroepithelial identity NE1 and NE2, neurons, skin, neural crest (NC), placode and U1 neurons, and also to a list of differentially expressed genes in NE and NC populations in HD neuroloids.

Supplementary Table 5 | Proteomic data included in the bioinformatic comparative study and CPDB GO term over-representation analysis of collected data. Up- and downregulated proteins were retrieved from the main figures or tables or from **Supplementary Material** provided with the publications. A cut-off of p -value < 0.05 was generally considered as significant.

- gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093. doi: 10.1093/bioinformatics/btp101
- Buijssen, R. A. M., Toonen, L. J. A., Gardiner, S. L., and van Roon-Mom, W. M. C. (2019). Genetics, mechanisms, and therapeutic progress in polyglutamine spinocerebellar Ataxias. *Neurotherapeutics* 16, 263–286. doi: 10.1007/s13311-018-00696-y
- Celestino-Soper, P. B., Skinner, C., Schroer, R., Eng, P., Shenai, J., Nowaczyk, M. M., et al. (2012). Deletions in chromosome 6p22.3-p24.3, including ATXN1, are associated with developmental delay and autism spectrum disorders. *Mol. Cytogenet.* 5:17. doi: 10.1186/1755-8166-5-17
- Chan, W. Y., Lorke, D. E., Tiu, S. C., and Yew, D. T. (2002). Proliferation and apoptosis in the developing human neocortex. *Anat. Rec.* 267, 261–276. doi: 10.1002/ar.10100
- Chen, H., and Boutros, P. C. (2011). VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 12:35. doi: 10.1186/1471-2105-12-35
- Chen, S., Lu, F. F., Seeman, P., and Liu, F. (2012). Quantitative proteomic analysis of human substantia nigra in Alzheimer's Disease, Huntington's disease and multiple sclerosis. *Neurochem. Res.* 37, 2805–2813. doi: 10.1007/s11064-012-0874-2
- Chiu, F.-L., Lin, J.-T., Chuang, C.-Y., Chien, T., Chen, C.-M., Chen, K.-H., et al. (2015). Elucidating the role of the A2A adenosine receptor in neurodegeneration using neurons derived from Huntington's disease iPSCs. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6066–6079. doi: 10.1093/hmg/ddv318
- Conway, J. R., Lex, A., and Gehlenborg, N. (2017). UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics* 33, 2938–2940. doi: 10.1093/bioinformatics/btx364
- Coutinho, P., Guimarães, A., and Scaravilli, F. (1982). The pathology of Machado-Joseph disease. Report of a possible homozygous case. *Acta Neuropathol.* 58, 48–54. doi: 10.1007/BF00692697
- David, G., Abbas, N., Stevanin, G., Dürr, A., Yvert, G., Cancel, G., et al. (1997). Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat. Genet.* 17, 65–70. doi: 10.1038/ng0997-65
- Deschepper, M., Hoogendoorn, B., Brooks, S., Dunnett, S. B., and Jones, L. (2012). Proteomic changes in the brains of Huntington's disease mouse models reflect pathology and implicate mitochondrial changes. *Brain Res. Bull.* 88, 210–222. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.01.012
- Di Benedetto, D., Di Vita, G., Romano, C., Giudice, M. L., Vitello, G. A., Zingale, M., et al. (2013). 6p22.3 deletion: report of a patient with autism, severe intellectual disability and electroencephalographic anomalies. *Mol. Cytogenet.* 6:4. doi: 10.1186/1755-8166-6-4
- Donis, K. C., Mattos, E. P., Silva, A. A., Furtado, G. V., Saraiva-Pereira, M. L., Jardim, L. B., et al. (2015). Infantile spinocerebellar ataxia type 7: case report and a review of the literature. *J. Neurol. Sci.* 354, 118–121. doi: 10.1016/j.jns.2015.04.040
- Donis, K. C., Saute, J. A. M., Krum-Santos, A. C., Furtado, G. V., Mattos, E. P., Saraiva-Pereira, M. L., et al. (2016). Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease starting before adolescence. *Neurogenetics* 17, 107–113. doi: 10.1007/s10048-016-0473-5
- Driessen, T. M., Lee, P. J., and Lim, J. (2018). Molecular pathway analysis towards understanding tissue vulnerability in spinocerebellar ataxia type 1. *ELife* 7:e39981. doi: 10.7554/eLife.39981
- Echaniz-Laguna, A., Rousso, E., Anheim, M., Cossée, M., and Tranchant, C. (2005). A family with early-onset and rapidly progressive X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology* 64, 1458–1460. doi: 10.1212/01.WNL.0000158617.41819.F3
- Edamakanti, C. R., Do, J., Didonna, A., Martina, M., and Opal, P. (2018). Mutant ataxin1 disrupts cerebellar development in spinocerebellar ataxia type 1. *J. Clin. Invest.* 128, 2252–2265. doi: 10.1172/JCI96765
- Enevoldson, T. P., Sanders, M. D., and Harding, A. E. (1994). Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. A Clinical and genetic study of eight families. *Brain* 117(Pt 3), 445–460. doi: 10.1093/brain/117.3.445
- Feyoux, M., Bourgois-Rocha, F., Redfern, A., Giles, P., Lefort, N., Aubert, S., et al. (2012). Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3883–3895. doi: 10.1093/hmg/dds216
- Figiel, M., Szlachcic, W. J., Switonski, P. M., Gabka, A., and Krzyzosiak, W. J. (2012). Mouse models of polyglutamine diseases: review and data table. Part I. *Mol. Neurobiol.* 46, 393–429. doi: 10.1007/s12035-012-8315-4
- Franco, S. J., and Müller, U. (2013). Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* 77, 19–34. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.022
- Fusilli, C., Migliore, S., Mazza, T., Consoli, F., De Luca, A., Barbagallo, G., et al. (2018). Biological and clinical manifestations of juvenile Huntington's disease: a retrospective analysis. *Lancet Neurol.* 17, 986–993. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30294-1
- Gao, R., Chakraborty, A., Geater, C., Pradhan, S., Gordon, K. L., Snowden, J., et al. (2019). Mutant huntingtin impairs PNKP and ATXN3, disrupting DNA repair and transcription. *Elife* 8:e42988. doi: 10.7554/eLife.42988
- Gao, R., Matsuura, T., Coolbaugh, M., Zühlke, C., Nakamura, K., Rasmussen, A., et al. (2008). Instability of expanded CAG/CAA repeats in spinocerebellar ataxia type 17. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 215–222. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201954
- Gibb, R., and Kolb, B. (2018). *The Neurobiology of Brain and Behavioral Development*. London: Academic Press. doi: 10.1016/C2015-0-00695-5
- Grunseich, C., Kats, I. R., Bott, L. C., Rinaldi, C., Kokkinis, A., Fox, D., et al. (2014). Early onset and novel features in a spinal and bulbar muscular atrophy patient with a 68 CAG repeat. *Neuromuscul. Disord.* 24, 978–981. doi: 10.1016/j.nmd.2014.06.441
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847–2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313
- Haremaki, T., Metzger, J. J., Rito, T., Ozair, M. Z., Etoc, F., and Brivanlou, A. H. (2019). Self-organizing neurooids model developmental aspects of Huntington's disease in the ectodermal compartment. *Nat. Biotechnol.* 37, 1198–1208. doi: 10.1038/s41587-019-0237-5
- Hasegawa, A., Ikeuchi, T., Koike, R., Matsubara, N., Tsuchiya, M., Nozaki, H., et al. (2010). Long-term disability and prognosis in dentatorubral-pallidolusian atrophy: a correlation with CAG repeat length. *Mov. Disord.* 25, 1694–1700. doi: 10.1002/mds.23167
- Hayashi, Y., Kakita, A., Yamada, M., Egawa, S., Oyanagi, S., Naito, H., et al. (1998). "Hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy: ubiquitinated filamentous inclusions in the cerebellar dentate nucleus neurons. *Acta Neuropathologica* 95, 479–482. doi: 10.1007/s004010050828
- HD iPSC Consortium. (2012). Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* 11, 264–278. doi: 10.1016/j.stem.2012.04.027
- Hedjoudje, A., Nicolas, G., Goldenberg, A., Vanhulle, C., Dumant-Forrest, C., Deverrière, G., et al. (2018). Morphological features in juvenile Huntington disease associated with cerebellar atrophy — magnetic resonance imaging morphometric analysis. *Pediatr. Radiol.* 48, 1463–1471. doi: 10.1007/s00247-018-4167-z
- Helmlinger, D., Tora, L., and Devys, D. (2006). Transcriptional alterations and chromatin remodeling in polyglutamine diseases. *Trends Genet.* 22, 562–570. doi: 10.1016/j.tig.2006.07.010
- Hervás-Corpión, I., Guiretti, D., Alcaraz-Iborra, M., Olivares, R., Campos-Caro, A., Barco, Á, et al. (2018). Early alteration of epigenetic-related transcription in Huntington's disease mouse models. *Sci. Rep.* 8:9925. doi: 10.1038/s41598-018-28185-4
- Herwig, R., Hardt, C., Lienhard, M., and Kamburov, A. (2016). Analyzing and interpreting genome data at the network level with ConsensusPathDB. *Nat. Protoc.* 11, 1889–1907. doi: 10.1038/nprot.2016.117
- Holmberg, M. (1998). Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum. Mol. Genet.* 7, 913–918. doi: 10.1093/hmg/7.5.913
- Hsu, Y.-T., Chang, Y.-G., and Chern, Y. (2018). Insights into GABAergic system alteration in Huntington's disease. *Open Biol.* 8:180165. doi: 10.1098/rsob.180165
- Hyman, C., and Pfenninger, K. H. (1985). Intracellular regulators of neuronal sprouting: calmodulin-binding proteins of nerve growth cones. *J. Cell Biol.* 101, 1153–1160. doi: 10.1083/jcb.101.3.1153
- Ishikawa, K., Tanaka, H., Saito, M., Ohkoshi, N., Fujita, T., Yoshizawa, K., et al. (1997). Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG

- expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 336–346. doi: 10.1086/514867
- Johansson, J., Forsgren, L., Sandgren, O., Brice, A., Holmgren, G., and Holmberg, M. (1998). Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. *Hum. Mol. Genet.* 7, 171–176. doi: 10.1093/hmg/7.2.171
- Jones, L., Houlden, H., and Tabrizi, S. J. (2017). DNA repair in the trinucleotide repeat disorders. *Lancet Neurol.* 16, 88–96. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30350-7
- Kassubek, J., Juengling, F. D., and Sperfeld, A.-D. (2007). Widespread white matter changes in Kennedy disease: a voxel based morphometry study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78, 1209–1212. doi: 10.1136/jnnp.2006.112532
- Kleerekoper, Q. K., and Putkey, J. A. (2009). PEP-19, an intrinsically disordered regulator of calmodulin signaling. *J. Biol. Chem.* 284, 7455–7464. doi: 10.1074/jbc.M808067200
- Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., et al. (1994). Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nat. Genet.* 6, 9–13. doi: 10.1038/ng0194-9
- Koide, R., Kobayashi, S., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Maruyama, M., Saito, M., et al. (1999). A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum. Mol. Genet.* 8, 2047–2053. doi: 10.1093/hmg/8.11.2047
- Kubera, K. M., Schmitgen, M. M., Hirjak, D., Wolf, R. C., and Orth, M. (2019). Cortical neurodevelopment in pre-manifest Huntington's disease. *Neuroimage Clin.* 23:101913. doi: 10.1016/j.nicl.2019.101913
- Kumar, A., Vaish, M., and Ratan, R. R. (2014). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease: a failure of adaptive transcriptional homeostasis. *Drug Discov. Today* 19, 956–962. doi: 10.1016/j.drudis.2014.03.016
- La Spada, A. R. (2020). "Spinocerebellar Ataxia Type 7," in *GeneReviews®*, eds M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, et al. Seattle, WA: University of Washington, Seattle. Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1256/> (accessed November 23, 2020).
- Latimer, C. S., Flanagan, M. E., Cimino, P. J., Jayadev, S., Davis, M., Hoffer, Z. S., et al. (2017). Neuropathological comparison of adult onset and juvenile Huntington's disease with cerebellar atrophy: a report of a father and son. *J. Huntingtons Dis.* 6, 337–348. doi: 10.3233/JHD-170261
- Lee, J. K., Conrad, A., Epping, E., Mathews, K., Magnotta, V., Dawson, J. D., et al. (2018). Effect of trinucleotide repeats in the Huntington's gene on intelligence. *EBioMedicine* 31, 47–53. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.031
- Lee, J. K., Ding, Y., Conrad, A. L., Cattaneo, E., Epping, E., Mathews, K., et al. (2017). Sex-specific effects of the Huntington gene on normal neurodevelopment. *J. Neurosci. Res.* 95, 398–408. doi: 10.1002/jnr.23980
- Lee, J., Kim, M., Itoh, T. Q., and Lim, C. (2018). Ataxin-2: a versatile posttranscriptional regulator and its implication in neural function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 9:e1488. doi: 10.1002/wrna.1488
- Li, Z., Benard, O., and Margolske, R. F. (2006). Ggamma13 interacts with PDZ domain-containing proteins. *J. Biol. Chem.* 281, 11066–11073. doi: 10.1074/jbc.M600113200
- Lim, J., Crespo-Barreto, J., Jafar-Nejad, P., Bowman, A. B., Richman, R., Hill, D. E., et al. (2008). Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1. *Nature* 452, 713–718. doi: 10.1038/nature06731
- Liu, Q., Huang, S., Yin, P., Yang, S., Zhang, J., Jing, L., et al. (2020). Cerebellum-enriched protein INPP5A contributes to selective neuropathology in mouse model of spinocerebellar ataxias type 17. *Nat. Commun.* 11:1101. doi: 10.1038/s41467-020-14931-8
- Lu, H.-C., Tan, Q., Rousseaux, M. W. C., Wang, W., Kim, J.-Y., Richman, R., et al. (2017). Disruption of the ATXN1-CIC complex causes a spectrum of neurobehavioral phenotypes in mice and humans. *Nat. Genet.* 49, 527–536. doi: 10.1038/ng.3808
- Malik, B., Devine, H., Patani, R., La Spada, A. R., Hanna, M. G., and Greensmith, L. (2019). Gene expression analysis reveals early dysregulation of disease pathways and links Chmp7 to pathogenesis of spinal and bulbar muscular atrophy. *Sci. Rep.* 9:3539. doi: 10.1038/s41598-019-40118-3
- Maltecca, F., Filla, A., Castaldo, I., Coppola, G., Fragassi, N. A., Carella, M., et al. (2003). Intergenerational instability and marked anticipation in SCA-17. *Neurology* 61, 1441–1443. doi: 10.1212/01.wnl.0000094123.09098.a0
- Mannervik, M. (2014). Control of *Drosophila* embryo patterning by transcriptional co-regulators. *Exp. Cell Res.* 321, 47–57. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.10.010
- Mao, R., Aylsworth, A. S., Potter, N., Wilson, W. G., Breningstall, G., Wick, M. J., et al. (2002). Childhood-onset ataxia: testing for large CAG-repeats in SCA2 and SCA7. *Am. J. Med. Genet.* 110, 338–345. doi: 10.1002/ajmg.10467
- Martin, J. B., and Gusella, J. F. (1986). Huntingtons disease. *N. Engl. J. Med.* 315, 1267–1276. doi: 10.1056/NEJM198611133152006
- Matsuda, K., Matsuda, S., Gladding, C. M., and Yuzaki, M. (2006). Characterization of the delta2 glutamate receptor-binding protein delphilin: splicing variants with differential palmitoylation and an additional PDZ domain. *J. Biol. Chem.* 281, 25577–25587. doi: 10.1074/jbc.M602044200
- McQuade, L. R., Balachandran, A., Scott, H. A., Khaira, S., Baker, M. S., and Schmidt, U. (2014). Proteomics of Huntington's disease-affected human embryonic stem cells reveals an evolving pathology involving mitochondrial dysfunction and metabolic disturbances. *J. Proteome Res.* 13, 5648–5659. doi: 10.1021/pr500649m
- Mehta, S. R., Tom, C. M., Wang, Y., Bresee, C., Rushton, D., Mathkar, P. P., et al. (2018). Human Huntington's Disease iPSC-derived cortical neurons display altered transcriptomics, morphology, and maturation. *Cell Rep.* 25, 1081–1096.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.076
- Milunsky, J. M., Maher, T. A., Loose, B. A., Darras, B. T., and Ito, M. (2003). XL PCR for the detection of large trinucleotide expansions in juvenile Huntington's disease. *Clin. Genet.* 64, 70–73. doi: 10.1034/j.1399-0004.2003.00108.x
- Moretti, P., Blazo, M., Garcia, L., Armstrong, D., Lewis, R. A., Roa, B., et al. (2004). Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) presenting with ophthalmoplegia and developmental delay in infancy. *Am. J. Med. Genet. A* 124A, 392–396. doi: 10.1002/ajmg.a.20428
- Mouton-Liger, F., Thomas, S., Rattenbach, R., Magnol, L., Larigaldie, V., Ledru, A., et al. (2011). PCP4 (PEP19) overexpression induces premature neuronal differentiation associated with Ca(2+) /calmodulin-dependent kinase II- δ activation in mouse models of Down syndrome. *J. Comp. Neurol.* 519, 2779–2802. doi: 10.1002/cne.22651
- Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Sato, K., Shirayama, T., Ohsaki, E., Bundo, M., et al. (1994). Dentatorubral and pallidolusian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nat. Genet.* 6, 14–18. doi: 10.1038/ng0194-14
- Nance, M. A., and Myers, R. H. (2001). Juvenile onset Huntington's disease—clinical and research perspectives. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 7, 153–157. doi: 10.1002/mrdd.1022
- Naphade, S., Tshilenge, K.-T., and Ellerby, L. M. (2019). Modeling polyglutamine expansion diseases with induced pluripotent stem cells. *Neurotherapeutics* 16, 979–998. doi: 10.1007/s13311-019-00810-8
- Neetens, A., Martin, J. J., Libert, J., and Den Ende, P. V. (1990). Autosomal dominant cone dystrophy-cerebellar atrophy (ADCoCA) (modified ADCA Harding II). *Neuro Ophthalmol.* 10, 261–275. doi: 10.3109/01658109008997294
- Nekrasov, E. D., Vigont, V. A., Klyushnikov, S. A., Lebedeva, O. S., Vassina, E. M., Bogomazova, A. N., et al. (2016). Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol. Neurodegener.* 11:27. doi: 10.1186/s13024-016-0092-5
- Niewiadomska-Cimicka, A., and Trottier, Y. (2019). Molecular targets and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia Type 7. *Neurotherapeutics* 16, 1074–1096. doi: 10.1007/s13311-019-00778-5
- Ohler, U., and Wassarman, D. A. (2010). Promoting developmental transcription. *Development* 137, 15–26. doi: 10.1242/dev.035493
- Ooi, J., Langley, S. R., Xu, X., Utami, K. H., Sim, B., Huang, Y., et al. (2019). Unbiased profiling of isogenic huntington disease hPSC-Derived CNS and peripheral cells reveals strong cell-type specificity of CAG length effects. *Cell Rep.* 26, 2494–2508.e7.
- Paciorkowski, A. R., Shafir, Y., Hrivnak, J., Patterson, M. C., Tennison, M. B., Clark, H. B., et al. (2011). Massive expansion of SCA2 with autonomic dysfunction, retinitis pigmentosa, and infantile spasms. *Neurology* 77, 1055–1060. doi: 10.1212/WNL.0b013e31822e5627
- Palmer, E. E., Hong, S., Al Zahrani, F., Hashem, M. O., Aleisa, F. A., Ahmed, H. M. J., et al. (2019). De novo variants disrupting the HX repeat motif of ATN1 cause a recognizable non-progressive neurocognitive syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 104, 542–552. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.01.013
- Paridaen, J. T., and Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* 15, 351–364. doi: 10.1002/embr.201438447

- Paulson, H. L., Shakkottai, V. G., Clark, H. B., and Orr, H. T. (2017). Polyglutamine spinocerebellar ataxias — from genes to potential treatments. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 613–626. doi: 10.1038/nrn.2017.92
- Pflieger, L. T., Dansithong, W., Paul, S., Scoles, D. R., Figueroa, K. P., Meera, P., et al. (2017). Gene co-expression network analysis for identifying modules and functionally enriched pathways in SCA2. *Hum. Mol. Genet.* 26, 3069–3080. doi: 10.1093/hmg/ddx191
- Pieper, C. C., Konrad, C., Sommer, J., Teismann, I., and Schiffbauer, H. (2013). Structural changes of central white matter tracts in Kennedy's disease - a diffusion tensor imaging and voxel-based morphometry study. *Acta Neurol. Scand.* 127, 323–328. doi: 10.1111/ane.12018
- Pini, L., Jacquemot, C., Cagnin, A., Meneghello, F., Semenza, C., Mantini, D., et al. (2020). Aberrant brain network connectivity in presymptomatic and manifest Huntington's disease: a systematic review. *Hum. Brain Mapp.* 41, 256–269. doi: 10.1002/hbm.24790
- Quarrell, O. W. J., Nance, M. A., Nopoulos, P., Paulsen, J. S., Smith, J. A., and Squitieri, F. (2013). Managing juvenile Huntington's disease. *Neurodegener. Dis. Manag.* 3, 267–276. doi: 10.2217/nmt.13.18
- R Core Team (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available online at: <https://www.R-project.org>
- Ramdzan, Y. M., Trubetskoy, M. M., Ormsby, A. R., Newcombe, E. A., Sui, X., Tobin, M. J., et al. (2017). Huntingtin inclusions trigger cellular quiescence, deactivate apoptosis, and lead to delayed necrosis. *Cell Rep.* 19, 919–927. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.029
- Ramocki, M. B., Chapiński, L., McDonald, R. O., Fernandez, F., and Malphrus, A. D. (2008). Spinocerebellar Ataxia Type 2 presenting with cognitive regression in childhood. *J. Child Neurol.* 23, 999–1001. doi: 10.1177/0883073808315622
- Rasmussen, A., De Biase, I., Frago-Benítez, M., Macías-Flores, M. A., Yescas, P., Ochoa, A., et al. (2007). Anticipation and intergenerational repeat instability in spinocerebellar ataxia type 17: anticipation in SCA17. *Ann. Neurol.* 61, 607–610. doi: 10.1002/ana.21139
- Ratovitski, T., Chaerkady, R., Kammers, K., Stewart, J. C., Zavala, A., Pletnikova, O., et al. (2016). Quantitative proteomic analysis reveals similarities between Huntington's disease (HD) and Huntington's disease-like 2 (HDL2) human brains. *J. Proteome Res.* 15, 3266–3283. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00448
- Ribai, P., Nguyen, K., Hahn-Barma, V., Gourfinkel-An, I., Vidailhet, M., Legout, A., et al. (2007). Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile huntington disease onset in 29 patients. *Arch. Neurol.* 64, 813–819. doi: 10.1001/archneur.64.6.813
- Ring, K. L., An, M. C., Zhang, N., O'Brien, R. N., Ramos, E. M., Gao, F., et al. (2015). Genomic analysis reveals disruption of striatal neuronal development and therapeutic targets in human Huntington's disease neural stem cells. *Stem Cell Rep.* 5, 1023–1038. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.005
- Sakazume, S., Yoshinari, S., Oguma, E., Utsuno, E., Ishii, T., Narumi, Y., et al. (2009). A patient with early onset Huntington disease and severe cerebellar atrophy. *Am. J. Med. Genet. A* 149A, 598–601. doi: 10.1002/ajmg.a.32707
- Sánchez-Corona, J., Ramírez-García, S. A., Castañeda-Cisneros, G., Gutiérrez-Rubio, S. A., Volpini, V., Sánchez-García, D. M., et al. (2020). A clinical report of the massive CAG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 2: severe onset in a Mexican child and review previous cases. *Genet. Mol. Biol.* 43:e20190325. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2019-0325
- Sap, K. A., Guler, A. T., Bezstarosti, K., Bury, A. E., Juenemann, K., Demmers, J. A. A., et al. (2019). Global proteome and ubiquitinome changes in the soluble and insoluble fractions of Q175 Huntington mice brains. *Mol. Cell. Proteomics* 18, 1705–1720. doi: 10.1074/mcp.RA119.001486
- Sapp, E., Seeley, C., Iuliano, M., Weisman, E., Vodicka, P., DiFiglia, M., et al. (2020). Protein changes in synaptosomes of Huntington's disease knock-in mice are dependent on age and brain region. *Neurobiol. Dis.* 141:104950. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104950
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The biology of huntingtin. *Neuron* 89, 910–926. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.003
- Schönberger, S. J., Jezdic, D., Faull, R. L. M., and Cooper, G. J. S. (2013). Proteomic analysis of the human brain in Huntington's disease indicates pathogenesis by molecular processes linked to other neurodegenerative diseases and to Type-2 diabetes. *J. Huntingtons Dis.* 2, 89–99. doi: 10.3233/JHD-120044
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
- Shen, Y., and Peterson, A. S. (2009). Atrophins' emerging roles in development and neurodegenerative disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 437–446. doi: 10.1007/s00018-008-8403-9
- Shimojo, Y., Osawa, Y., Fukumizu, M., Hanaoka, S., Tanaka, H., Ogata, F., et al. (2001). Severe infantile dentatorubral pallidolysian atrophy with extreme expansion of CAG repeats. *Neurology* 56, 277–278. doi: 10.1212/wnl.56.2.277
- Silva, C. G., Peyre, E., and Nguyen, L. (2019). Cell migration promotes dynamic cellular interactions to control cerebral cortex morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 318–329. doi: 10.1038/s41583-019-0148-y
- Singh, A., Faruq, M., Mukerji, M., Dwivedi, M. K., Pruthi, S., and Kapoor, S. (2014). Infantile onset spinocerebellar Ataxia 2 (SCA2): a clinical report with review of previous cases. *J. Child Neurol.* 29, 139–144. doi: 10.1177/0883073813509015
- Skotte, N. H., Andersen, J. V., Santos, A., Aldana, B. I., Willert, C. W., Nørremølle, A., et al. (2018). Integrative characterization of the R6/2 mouse model of Huntington's disease reveals dysfunctional astrocyte metabolism. *Cell Rep.* 23, 2211–2224. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.052
- Smith-Geater, C., Hernandez, S. J., Lim, R. G., Adam, M., Wu, J., Stocksdale, J. T., et al. (2020). Aberrant development corrected in adult-onset Huntington's disease iPSC-derived neuronal cultures via WNT signaling modulation. *Stem Cell Rep.* 14, 406–419. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.01.015
- Sperfeld, A. D., Karitzky, J., Brummer, D., Schreiber, H., Häussler, J., Ludolph, A. C., et al. (2002). X-linked bulbospinal neuronopathy: kennedy disease. *Arch. Neurol.* 59:1921. doi: 10.1001/archneur.59.12.1921
- Squitieri, F., Frati, L., Ciarmiello, A., Latoria, S., and Quarrell, O. (2006). Juvenile Huntington's disease: does a dosage-effect pathogenic mechanism differ from the classical adult disease? *Mech. Ageing Dev.* 127, 208–212. doi: 10.1016/j.mad.2005.09.012
- Stevanin, G., Giunti, P., Belal, G. D., Dürr, A., Ruberg, M., Wood, N., et al. (1998). De novo expansion of intermediate alleles in spinocerebellar ataxia 7. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1809–1813. doi: 10.1093/hmg/7.11.1809
- Stiles, J., and Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* 20, 327–348. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4
- Stout, J. C. (2018). Juvenile Huntington's disease: left behind? *Lancet Neurol.* 17, 932–933. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30334-X
- Stoyas, C. A., Bushart, D. D., Switonski, P. M., Ward, J. M., Alaghata, A., Tang, M., et al. (2020). Nicotinamide pathway-dependent sirt1 activation restores calcium homeostasis to achieve neuroprotection in spinocerebellar ataxia type 7. *Neuron* 105, 630–644.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2019.11.019
- Stucki, D. M., Rueggsegger, C., Steiner, S., Radecke, J., Murphy, M. P., Zuber, B., et al. (2016). Mitochondrial impairments contribute to Spinocerebellar ataxia type 1 progression and can be ameliorated by the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Free Radic. Biol. Med.* 97, 427–440. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.005
- Suzuki, K., Zhou, J., Sato, T., Takao, K., Miyagawa, T., Oyake, M., et al. (2012). DRPLA transgenic mouse substrains carrying single copy of full-length mutant human DRPLA gene with variable sizes of expanded CAG repeats exhibit CAG repeat length- and age-dependent changes in behavioral abnormalities and gene expression profiles. *Neurobiol. Dis.* 46, 336–350. doi: 10.1016/j.nbd.2012.01.014
- Świtońska, K., Szlachcic, W. J., Handschuh, L., Wojciechowski, P., Marczak, Ł., Stelmaszczuk, M., et al. (2019). Identification of altered developmental pathways in human juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q using transcriptome profiling. *Front. Cell. Neurosci.* 12:528. doi: 10.3389/fncel.2018.00528
- Switonski, P. M., Szlachcic, W. J., Gabka, A., Krzyzosiak, W. J., and Figiel, M. (2012). Mouse models of polyglutamine diseases in therapeutic approaches: review and data table. Part II. *Mol. Neurobiol.* 46, 430–466. doi: 10.1007/s12035-012-8316-3
- Szlachcic, W. J., Switonski, P. M., Krzyzosiak, W. J., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2015). Huntington disease iPSCs show early molecular changes in intracellular signaling, the expression of oxidative stress proteins and the p53 pathway. *Dis. Model. Mech.* 8, 1047–1057. doi: 10.1242/dmm.019406
- Szlachcic, W. J., Wiatr, K., Trzeciak, M., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2017). The generation of mouse and human huntington disease iPSC cells suitable for in vitro studies on huntingtin function. *Front. Mol. Neurosci.* 10:253. doi: 10.3389/fnmol.2017.00253

- Takeda, S., and Takahashi, H. (1996). Neuropathology of dentatorubropallidolusian atrophy. *Neuropathology* 16, 48–55. doi: 10.1111/j.1440-1789.1996.tb00155.x
- Tereshchenko, A., Magnotta, V., Epping, E., Mathews, K., Espe-Pfeifer, P., Martin, E., et al. (2019). Brain structure in juvenile-onset Huntington disease. *Neurology* 92, e1939–e1947. doi: 10.1212/WNL.00000000000007355
- Tezenas du Montcel, S., Durr, A., Bauer, P., Figueroa, K. P., Ichikawa, Y., Brunsino, A., et al. (2014). Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain* 137, 2444–2455. doi: 10.1093/brain/awu174
- The HD iPSC Consortium (2017). Developmental alterations in Huntington's disease neural cells and pharmacological rescue in cells and mice. *Nat. Neurosci.* 20, 648–660. doi: 10.1038/nn.4532
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971–983.
- Todd, P. K., and Paulson, H. L. (2010). RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders. *Ann. Neurol.* 67, 291–300. doi: 10.1002/ana.21948
- Tomoda, A., Ikezawa, M., Ohtani, Y., Miike, T., and Kumamoto, T. (1991). Progressive myoclonus epilepsy: dentato-rubro-pallidolusian atrophy (DRPLA) in childhood. *Brain Dev.* 13, 266–269. doi: 10.1016/s0387-7604(12)80061-1
- Toyoshima, Y., and Takahashi, H. (2018). "Spinocerebellar Ataxia Type 17 (SCA17)," in *Polyglutamine Disorders Advances in Experimental Medicine and Biology*, eds C. Nóbrega and L. Pereira de Almeida (Cham: Springer International Publishing), 219–231. doi: 10.1007/978-3-319-71779-1_10
- Tsuchiya, K., Oyanagi, S., Arima, K., Ikeda, K., Akashi, T., Ando, S., et al. (1998). Dentatorubropallidolusian atrophy: clinicopathological study of dementia and involvement of the nucleus basalis of meynert in seven autopsy cases. *Acta Neuropathol.* 96, 502–508. doi: 10.1007/s004010050925
- Unrath, A., Müller, H.-P., Riecker, A., Ludolph, A. C., Sperfeld, A.-D., and Kassubek, J. (2010). Whole brain-based analysis of regional white matter tract alterations in rare motor neuron diseases by diffusion tensor imaging. *Hum. Brain Mapp.* 31, 1727–1740. doi: 10.1002/hbm.20971
- van de Warrenburg, B. P., Frenken, C. W., Aulsems, M. G., Kleefstra, T., Sinke, R. J., Knoers, N. V., et al. (2001). Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype. *J. Neurol.* 248, 911–914. doi: 10.1007/s004150170082
- Vargas, A. P., Carod-Artal, F. J., Bomfim, D., Vázquez-Cabrera, C., and Dantas-Barbosa, C. (2003). Unusual early-onset Huntington's disease. *J. Child Neurol.* 18, 429–432. doi: 10.1177/08830738030180061301
- Veneziano, L., and Frontali, M. (1993). "DRPLA," in *GeneReviews®*, eds M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, et al. (Seattle, WA: University of Washington, Seattle). Available online at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1491/> (accessed November 24, 2020).
- Vinther-Jensen, T., Ek, J., Duno, M., Skovby, F., Hjerminde, L. E., Nielsen, J. E., et al. (2013). Germ-line CAG repeat instability causes extreme CAG repeat expansion with infantile-onset spinocerebellar ataxia type 2. *Eur. J. Hum. Genet.* 21, 626–629. doi: 10.1038/ejhg.2012.231
- Wang, X., and Putkey, J. A. (2016). PEP-19 modulates calcium binding to calmodulin by electrostatic steering. *Nat. Commun.* 7:13583. doi: 10.1038/ncomms13583
- Wang, X., Wang, H., Xia, Y., Jiang, H., Shen, L., Wang, S., et al. (2010). A neuropathological study at autopsy of early onset spinocerebellar ataxia 6. *J. Clin. Neurosci.* 17, 751–755. doi: 10.1016/j.jocn.2009.10.007
- Wardman, J. H., Henriksen, E. E., Marthaler, A. G., Nielsen, J. E., and Nielsen, T. T. (2020). Enhancement of autophagy and solubilization of ataxin-2 alleviate apoptosis in spinocerebellar ataxia type 2 patient cells. *The Cerebellum* 19, 165–181. doi: 10.1007/s12311-019-01092-8
- Wiatr, K., Szlachcic, W. J., Trzeciak, M., Figlerowicz, M., and Figiel, M. (2018). Huntington disease as a neurodevelopmental disorder and early signs of the disease in stem cells. *Mol. Neurobiol.* 55, 3351–3371. doi: 10.1007/s12035-017-0477-7
- Xia, Z., and Storm, D. R. (2005). The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 267–276. doi: 10.1038/nrn1647
- Yamada, M. (2010). Dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA): the 50th Anniversary of Japanese Society of Neuropathology. *Neuropathology* 30, 453–457. doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01120.x
- Yang, S., Li, X.-J., and Li, S. (2016). Molecular mechanisms underlying Spinocerebellar Ataxia 17 (SCA17) pathogenesis. *Rare Dis.* 4:e1223580. doi: 10.1080/21675511.2016.1223580
- Yoon, G., Kramer, J., Zanko, A., Guzijan, M., Lin, S., Foster-Barber, A., et al. (2006). Speech and language delay are early manifestations of juvenile-onset Huntington disease. *Neurology* 67, 1265–1267. doi: 10.1212/01.wnl.0000238390.86304.4e
- Zhang, F., Xu, D., Yuan, L., Sun, Y., and Xu, Z. (2014). Epigenetic regulation of Atrophen1 by lysine-specific demethylase 1 is required for cortical progenitor maintenance. *Nat. Commun.* 5:5815. doi: 10.1038/ncomms6815
- Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., et al. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat. Genet.* 15, 62–69. doi: 10.1038/ng0197-62
- Zoghbi, H. Y., and Orr, H. T. (2009). Pathogenic mechanisms of a polyglutamine-mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1. *J. Biol. Chem.* 284, 7425–7429. doi: 10.1074/jbc.R800041200

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Świtońska-Kurkowska, Krist, Delimata and Figiel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.