

STRESZCZENIE

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy choroby poliglutaminowe są poważnym i rosnącym obciążeniem dla współczesnych społeczeństw. Charakteryzują się ciężkimi zaburzeniami motorycznymi i/lub poznawczymi wynikającymi z postępujących uszkodzeń specyficznych populacji neuronów oraz połączeń nerwowych w mózgu, co ostatecznie skutkuje kalectwem i utratą samodzielności pacjentów. Co więcej, choroby neurodegeneracyjne występują coraz częściej w związku z wydłużającą się średnią długością życia. Pomimo, że mają pewne elementy wspólne, ich dokładny patomechanizm wciąż nie jest poznany i dlatego nie istnieje żadna skuteczna terapia. W odróżnieniu od choroby Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych o niedostatecznie zdefiniowanej etiologii, choroby poliglutaminowe (polyQ) są skutkiem dominującej mutacji - ekspansji powtórzeń CAG w pojedynczych genach. Do chorób tych należy również ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3), wywołana przez ekspansję CAG w egzonie 10 genu *ATXN3* kodującego białko ataksynę-3.

Głównym celem badań prowadzonych przeze mnie w ramach pracy doktorskiej było poznanie patomechanizmu, który prowadzi do rozwoju ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Aby zrealizować cel główny pracy, sformulowałam także cele szczegółowe. Pierwszym z nich była charakterystyka fenotypu homozygotycznego modelu knock-in SCA3 Ki91 oraz wyróżnienie fazy pre-symptomatycznej i symptomatycznej SCA3 poprzez szereg testów behawioralnych i komórkowych. Drugi istotny cel moich badań stanowiła identyfikacja procesów molekularnych, które powodują powstanie choroby neurodegeneracyjnej (faza pre-symptomatyczna), a następnie procesów kluczowych dla patogenezы SCA3 w czasie progresji choroby w modelu Ki91. Cel ten realizowałam poprzez wielkoskalową analizę zmian w poziomie białek w 2 regionach mózgu: korze mózgowej i mózdku w poszczególnych fazach SCA3 w modelu Ki91. Kolejne cele obejmowały wytypowanie białek, mogących posłużyć jako biomarkery SCA3 oraz szczegółowe zbadanie procesów molekularnych, które mogą być zmienione w modelu SCA3 Ki91 przy pomocy testów funkcjonalnych i mikroskopii. W badaniach w ramach mojej pracy doktorskiej wykorzystywałam myszy modelu Ki91 typu knock-in ze wstawioną ludzką sekwencją egzonów 7-11, zawierającą 91 powtórzeń CAG w mysim genie *Atxn3*. Model ten zaprojektowany został w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN (Switonski et al., 2015). Testy behawioralne objęły zwierzęta 2-miesięczne aż do ukończenia 18 miesiąca życia w wygenerowanej przeze mnie kohorcie myszy (n=18 na genotyp). Różnice w poziomie białek analizowałam wysokoprzepustową metodą spektrometrii mas LC-MS/MS w wiekach myszy, które uznałam za ważne punkty czasowe w przebiegu SCA3 na podstawie testów behawioralnych. Następnie, przeprowadziłam analizę procesów komórkowych i ścieżek molekularnych z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych na podstawie białek o zmienionym poziomie w poszczególnych wiekach.

Po analizie otrzymanych wyników wyróżniłam 4 fazy choroby, a wśród nich fazę pre-symptomatyczną, w której nie obserwowałam żadnych objawów motorycznych i innych, co zostało opisane w publikacji (Wiatr et al., 2019). Wyodrębnienie stadium pre-symptomatycznego w modelu choroby jest ważne, ponieważ umożliwia precyzyjne odróżnienie procesów, które są przyczyną neurodegeneracji od tych, które są skutkiem progresji choroby lub naturalnego starzenia. Ustaliłam, że białka o zmienionym poziomie w fazie pre-symptomatycznej SCA3 zaangażowane były w translację, naprawę uszkodzeń DNA, neurogenezę i tworzenie struktur neuronalnych, oraz metabolizm energetyczny i transport komórkowy. Dodatkowo analizowałam również poziom fosforylacji białek i odkryłam globalne obniżenie fosforylacji w korze mózgowej i mózdku Ki91 oraz zmieniony poziom i fosforylację kilku kinaz, jak Pak1. Dużą grupę białek o obniżonej fosforylacji stanowiły ważne regulatory funkcji cytoszkieletu i transportu w aksonach. Druga publikacja zebrała wyniki stanowiące kontynuację moich badań w kolejnych stadiach choroby, począwszy od utraty przyrostu masy ciała u młodych zwierząt do poważnych zaburzeń motorycznych u myszy 18-miesięcznych (Wiatr et al., 2021). Białka o zmienionym poziomie w kolejnych wiekach zaangażowane są w takie procesy jak metabolizm energetyczny,

formowanie cytoszkieletu, transport wzdłuż aksonu, przekaznictwo synaptyczne, a także degradacja w proteasomie i apoptoza. W późniejszych fazach zwiększa się ilość białek, które lokalizują w lizosomach, a także w pęcherzykach synaptycznych i synapsach i które związane są z metabolizmem. Na podstawie wyników otrzymanych w analizie zmienionych białek i procesów molekularnych opracowałam model patogenezy SCA3 składający się z zaburzeń w transporcie pęcherzyków synaptycznych, mitochondriów i autofagosomów wzdłuż aksonu SCA3. Dlatego w następnym etapie przeprowadziłam eksperymenty mających na celu wykazanie, że wczesne patogenne procesy SCA3 zachodzą w aksonach. Wykazałam deficyt w metabolizmie energetycznym neuronów mózdkowych Ki91 w teście funkcjonalnym, w którym mierzona była szybkość zakwaszania komórki (tempo glikolizy) i pomiar zużycia tlenu. Zademonstrowałam akumulację neurofilamentów i pęcherzyków (znakowanych Rab7) w ciałach i aksonach neuronów mózdkowych Ki91. Następnie, wyprowadziłam kulturę hodowli neuronów korykalnych i mózdkowych *in vitro*, z których izolowałam osobno aksony i część somatodendrytyczną. W tym celu wykorzystałam zmodyfikowane komory Boydena, które separują aksony od ciał komórek nerwowych poprzez porowaty filtr. Następnie analizowałam, które białka lokalizują w zmienionej ilości w aksonach w stosunku do części somatodendrytycznej neuronów pochodzących z modelu SCA3 Ki91 w porównaniu do kontroli (C57). Analiza białek, które znajdują się w aksonach w zmienionej ilości pozwoliła na wstępną ocenę czy w modelu SCA3 Ki91 występuje zaburzenie transportu aksonalnego i których organelli lub białek dotyczy. Białka wzbogacone w aksonach SCA3 to przede wszystkim białka maszynery translacyjnej, podczas gdy białka zubożone w aksonach SCA3 to m.in. białka cytoszkieletarne, regulujące transport i budujące pęcherzyki.

Podsumowując, zidentyfikowałam wiele zmian na poziomie białek w modelu SCA3, które wskazują na zaburzenie procesów i ścieżek molekularnych takich jak metabolizm energetyczny i transport w aksonach. Wytacza to nowe kierunki badań, które przybliżą zrozumienie patomechanizmu SCA3 będącego podstawą neurodegeneracji.