

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk W Poznaniu

Zakład Neurobiologii Molekularnej

mgr Piotr Tomasz Piasecki

**CHARAKTERYSTYKA MYSICH MODELI SCA3/MJD KI91 I
KI150 ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM
PATOGENEZY W TKANCE, INTERAKCJI ZMUTOWANEJ
ATAKSYNY 3 I ZMIAN TRANSKRYPCYJNYCH W MÓZGU**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Maciej Figiel prof. ICHB

POZNAŃ, 2022

Najserdeczniejsze podziękowania składam mojemu promotorowi,
dr hab. Maciejowi Figlowi za bezcenne rady, nieustającą motywację oraz
merytoryczne wsparcie.

Dziękuję Kolegom i Koleżankom z Zakładu Neurobiologii Molekularnej za
współtworzenie niepowtarzalnego zespołu i atmosfery, dzięki której
realizacja pracy doktorskiej była przyjemnością.

Dziękuję moim koleżankom, Karolinie Świtońskiej-Kurkowskiej oraz
Agnieszce Szczepańskiej, za wsparcie merytoryczne oraz mentalne podczas
finalizowania pracy doktorskiej.

Dziękuję wszystkim Kolegom i Koleżankom z Instytutu Chemii Bioorganicznej
za bezinteresowną pomoc merytoryczną oraz wspianą atmosferę w pracy.

Spis treści

Streszczenie.....	9
Abstract	11
1. Wstęp	13
1.1. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3)	13
1.2. Objawy SCA3.....	13
1.3. Patogeneza SCA3	14
1.3.1. Agregaty białkowe w komórkach	14
1.3.2. Zmiany w tkance mózgowej, neuronach i gleju	15
1.3.3. Stan zapalny	15
1.3.4. Patogeneza obwodowa	16
1.4. Białko ATXN3	17
1.4.1. Struktura.....	17
1.4.2. Funkcja ATXN3.....	19
1.4.3. Rola zmienionej homeostazy białek.....	20
1.4.4. Rola ubikwityny i proteasomu w patogenezie SCA3.....	21
1.4.1. Modyfikacje potranslacyjne ATXN3	21
1.4.2. Udział ATXN3 w autofagii	22
1.4.3. Interakcje normalnej i zmutowanej ATXN3	22
1.5. Modele zwierzęce SCA3.....	23
1.5.1. Modele transgeniczne (indukowalne).....	24
1.5.2. Model 84, MJD	24
1.5.3. Modele knock-in.....	25
1.6. Terapie eksperymentalne w leczeniu SCA3.....	25
1.6.1. Terapia genowa	26

1.6.2.	Modulatory neurotransmiterów	27
1.6.3.	Terapie nakierowane na autofagię	28
1.6.4.	Terapie nakierowane na proteasom	29
1.6.5.	Regulacja transkrypcji	30
1.6.6.	Inhibicja stanu zapalnego	31
2.	Cel pracy	35
3.	Materiały i metody	36
3.1.	Ważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne	36
3.2.	Enzymy	37
3.3.	Przeciwciała	37
3.4.	Zestawy komercyjne	38
3.5.	Roztwory i bufory	38
3.6.	Bufory dostępne komercyjnie	39
3.7.	Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych i białek	40
3.8.	Żele	40
3.9.	Oligonukleotydy	40
3.10.	Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe	42
3.11.	Myszy	43
3.11.1.	Hodowla	43
3.11.1.	Tkanki	43
3.12.	Hodowle komórkowe	43
3.12.1.	Hodowle neuronalne od pacjentów z SCA3 iPSC	43
3.12.2.	Hodowle fibroblastów od pacjentów SCA3	44
3.13.	Izolacja RNA	44
3.14.	Synteza cDNA	44
3.15.	Analiza RNAseq	44

3.16.	Standardowy PCR.....	45
3.17.	Genotypowanie myszy.....	45
3.18.	PCR w czasie rzeczywistym	46
3.19.	Barwienia immunofluorescencyjne	46
3.20.	Analiza poziomu białek metodą Western blot	47
3.21.	Frakcjonowanie mysich mózgów	47
3.22.	Spektrometria mas wybranych frakcji białkowych.....	48
3.23.	Koimmunoprecypitacja	49
3.24.	Spektrometria masowa.....	49
3.25.	Badania behawioralne	50
3.25.1.	Analiza Rotarod.....	50
3.25.2.	Test prętów statycznych.....	50
3.25.3.	Test punktowy	51
3.26.	Traktowanie hodowli fibroblastów SCA3 związkami niskocząsteczkowymi	51
3.27.	Analizy statystyczne	52
3.28.	Programy komputerowe i bazy danych	52
4.	Wyniki.....	53
4.1.	Wstęp.....	53
4.2.	Analiza transkryptomyczna mózgów myszy SCA3 w fazie presymptomatycznej i symptomatycznej	53
4.2.1.	RNAseq	53
4.2.2.	Walidacja zmian RNAseq z użyciem qPCR.....	55
4.2.3.	Zmiany splicingowe w modelu Ki91	58
4.2.4.	Zmiany transkrypcyjne, symptomatycznych zwierząt Ki91 SCA3/MJD wskazują na zaburzenia w populacjach komórek w mózgu	61

4.2.5.	Zmiany transkrypcyjne zachodzące u objawowych myszy Ki91 SCA3/MJD występują również w neuronach pacjentów z SCA3/MJD.....	63
4.2.1.	Mózdzek i kora mózgowa przedobjawowych myszy Ki91 SCA3/MJD wykazują występowanie komórek z akumulacją mikroagregatów białka ATXN3 w jądrach komórkowych.....	64
4.3.	Mysi model SCA3 Ki150	65
4.3.1.	Poziom zmutowanego białka ATXN3 w mysim modelu SCA3 Ki150 w korze mózgowej.....	67
4.3.2.	Charakterystyka behawioralna nowego mysiego modelu SCA3 Ki150.....	67
4.3.3.	Lokalizacja tkankowa, komórkowa i subkomórkowa zmutowanej ATXN3 w mózgu mysiego modelu SCA3 Ki150	69
4.3.4.	Mikroglejoza i zapalenie mysiego modelu SCA3 Ki150.....	70
4.3.5.	Zmienione białka związane z translacją w mysim modelu SCA3 Ki150	70
4.4.	Określenie interakcji normalnej i zmutowanej ATXN3 w modelu KI150	72
4.4.1.	Analiza proteomiczna kompleksów białkowych	72
4.4.2.	Fracje zawierające tylko zmutowaną i tylko normalną ATXN3 wykazują zmieniony poziom białek tworzących wielkocząsteczkowe kompleksy	77
4.5.	Interaktory zmutowanej ATXN3 można przyporządkować do funkcjonalnych grup białek związanych z mitochondriami i translacją.....	79
4.6.	Interakcja normalnej i zmutowanej ATXN3 z białkami proteasomu.....	82
4.7.	Badanie nowej strategii terapeutycznej nakierowanej na proteasom zmierzającej do obniżenia zmutowanego białka w SCA3/MJD.....	83
5.	Dyskusja.....	84
6.	Wnioski.....	92
7.	Literatura.....	93
8.	Spis tabel	113
9.	Spis rycin.....	114

Streszczenie

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3/MJD) jest neurodegeneracyjną chorobą poliglutaminową, którą wywołuje mutacja polegająca na ekspansji powtórzeń trójki nukleotydów CAG w genie *ATXN3*. Skutkuje to powstawaniem długiej domeny poliglutaminowej w zmutowanym białku ataksyny-3 (ATXN3). Dokładny mechanizm choroby SCA3 nie został jeszcze poznany i dlatego nie istnieją jeszcze terapie celujące w przyczynę choroby.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było określenie patomechanizmu choroby SCA3. W tym celu wygenerowałem nowy myszy model SCA3 o zaostrowym fenotypie jako platformę *in vivo* do badania patogenezy, określenia zmian białkowych i tkankowych, interakcji białkowych oraz szybkiego testowania terapii SCA3. W mysim modelu SCA3 o łagodnym fenotypie nie zaobserwowałem wczesnych, presymptomatycznych zmian transkrypcyjnych, natomiast zidentyfikowałem post symptomatyczne zmiany w mRNA. Okazało się, że zmiany w mRNA odzwierciedlały zaburzenie w populacjach komórek mózgu związanych z oligodendrocytami, mikroglejem oraz metabolizmem energetycznym. Mimo braku zmian transkrypcyjnych i behawioralnych na bardzo wczesnym etapie choroby, w łagodnym modelu SCA3, zidentyfikowałem zmienioną lokalizację i mikroagregaty zmutowanego białka ATXN3. Te markery mogą być przydatne w badaniach przedklinicznych na wczesnym, bezobjawowym etapie choroby.

Kolejnym etapem badań było wygenerowanie nowego modelu mysiego SCA3 Ki150, o zaostrowym fenotypie, który jest modelem klasy przedklinicznej służącym do badań nad skuteczną terapią dla pacjentów chorych na SCA3. Przeprowadzone testy motoryczne na mysim modelu Ki150 wskazują na zaostrowy fenotyp chorobowy u tych myszy. Osobniki już w 1 miesiącu życia wykazywały obniżoną sprawność motoryczną. U myszy Ki150, w przekroju całego mózgu, widoczne są bardzo liczne i duże agregaty nieprawidłowego białka ATXN3.

W następnym etapie badań zidentyfikowano interakcje białkowe pomiędzy prawidłowym i zmutowanym białkiem ATXN3. W tym celu wykorzystano równolegle metody frakcjonowania lizatów mózgu za pomocą ortogonalnej chromatografii oraz koimmunoprecypitację, a następnie dla każdej z tych metod zidentyfikowano również białka i kompleksy metodą proteomiczną. Kompleksy zmutowanej i prawidłowej ATXN3 zostały

scharakteryzowane pod względem ich wielkości i zawartości. Zidentyfikowano białka wiążące się ze zmutowaną i normalną ATXN3 w mózgach myszy Ki150. Między innymi, wykryto duże kompleksy białkowe pomiędzy zmutowaną ATXN3 a takimi białkami jak CCT5 i 6, Tcp1 (Chaperon Containing TCP1; kompleks CCT; kompleks T) oraz kinazy Camk2a i Camk2b odpowiedzialne za homeostazę wapnia oraz liczne białka proteasomu. Odkryłem również, że wszystkie te białka mają charakterystyczną kolistą formę strukturalną. Co ciekawe jednym z etapów przejściowych w tworzeniu inkluzji fibrylnych poliQ jest etap inkluzji o formie kolistej. Przeprowadzone analizy danych wskazują, że następuje nieprawidłowa interakcja pomiędzy zmutowaną ATXN3 a białkami ważnych szlaków komórkowych, biorących udział w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych; są to m.in. białka zaangażowane w translację oraz transport mitochondriów w aksonach. Na podstawie zidentyfikowanych interaktorów i ich cech wiązania do ATXN3 zaproponowano sposób terapii celowanej SCA3 związkami niskocząsteczkowymi.

Podsumowując, stworzenie nowego modelu o zaostrowym fenotypie i badanie interakcji białkowych w tym modelu pozwoliło na zidentyfikowanie patogennych procesów biologicznych w SCA3. Dzięki temu, zaproponowano strategię terapeutyczną nakierowaną na jeden z tych procesów, co spowodowało znaczące obniżenie poziomu zmutowanego białka ATXN3 w komórkach fibroblastów pacjentów chorych na SCA3.

Abstract

“CHARACTERISTICS OF THE SCA3/MJD KI91 AND KI150 MOUSE MODELS: TISSUE PATHOGENESIS, MUTANT ATAXIN-3 INTERACTION AND BRAIN TRANSCRIPTOMIC ALTERATIONS”

Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3/MJD) is a neurodegenerative polyglutamine disease caused by the CAG triplet repeat expansion mutation in the ATXN3 gene. This results in forming of a long polyglutamine domain in the mutant ataxin-3 protein (ATXN3). The exact mechanism of SCA3 has not been determined, and therefore no targeted therapies currently exist.

Therefore, the main goal of my Ph.D. thesis was to determine the pathomechanism of SCA3 by generating a new mouse model of SCA3 with an exacerbated phenotype as an *in vivo* platform for studying pathogenesis, determining protein and tissue changes, protein-protein interactions, and rapid evaluation of potential SCA3 therapy. In the SCA3 mouse model with a mild phenotype, I did not observe early presymptomatic transcriptional changes but identified post-symptomatic mRNA changes. Such changes reflected a disturbance in brain cell populations associated with oligodendrocytes and microglia and energy metabolism. Despite the lack of transcriptional and behavioral changes at the very early stage of the disease in the mild SCA3 model, I identified altered localization and microaggregates of the mutant ATXN3 protein, useful as a marker in preclinical studies.

The next task of the research was to generate a new SCA3 Ki150 mouse model with an exacerbated phenotype, a preclinical-class model for testing effective therapies for the SCA3. Motor tests performed on the Ki150 indicate an exacerbated disease, such as reduced motor performance already at 1 month of age, and numerous and large aggregates of abnormal ATXN3 protein seen across the brain.

Next, protein interactions of normal and mutant ATXN3 were identified in Ki21 and Ki150 models. Parallel methods of brain lysate fractionation using orthogonal chromatography and co-immunoprecipitation were used, and then proteins and complexes were identified by proteomics for each method. The mutant and normal ATXN3 complexes were characterized by their size and content. Among others, large protein complexes with disturbed interaction with ATXN3 were detected, such as CCT5 and 6, Tcp1 (Chaperon Containing TCP1; CCT

complex; T complex), and Camk2a and Camk2b kinases responsible for calcium homeostasis and numerous proteasome proteins. I found that all these proteins have a characteristic circular structural form. Interestingly, one of the transient stages in the formation of polyQ fibrillar inclusions are the circular inclusions. Data analysis indicates that the mutated ATXN3 interacts abnormally with proteins of crucial cellular pathways involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, including proteins involved in the translation, and transport of mitochondria in axons. Based on the identified interactors and their binding to ATXN3, a method of SCA3 targeted therapy with low molecular weight compounds was proposed.

In conclusion, the creation of a new model with an exacerbated phenotype and the study of protein interactions in this model allowed the identification of pathogenic biological processes in SCA3. The therapeutic strategy aimed at one of these processes resulted in a significant reduction in the level of the mutated ATXN3 protein in the fibroblast cells of patients with SCA3.

1. Wstęp

1.1. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3)

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (*ang. spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)*), znana także jako choroba Machado-Josepha (*ang. Machado-Joseph Disease; MJD*), jest chorobą neurodegeneracyjną zaliczaną do chorób poliglutaminowych (poliQ), która spowodowana jest przez ekspansję powtórzeń trójki nukleotydowej CAG w odcinku kodującym białko ataksyny-3 (ATXN3). Choroba ta zaliczana jest do grupy 9 chorób poliQ, którymi są choroba Huntingtona (HD), rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA), zanik jądra zębatego, czerwienego, gałki bladej i jądra niskowzgórzowego (DRPLA) oraz pięć innych ataksji rdzeniowo-mózdkowych (SCA1, 2, 6, 7 i 17). Pierwsi pacjenci chorzy na SCA3 zostali zdiagnozowani w latach 70tych XX wieku wśród emigrantów pochodzenia Azorskiego mieszkających w USA (Coutinho and Andrade, 1978). Dwie ze zidentyfikowanych rodzin prezentujących tę dominująco dziedziczną ataksję wywodziły się od Williama Machado i Antone Josepha, co doprowadziło do określenia choroby Machado-Joseph Disease (MJD). Nazwa ta jest nadal używana regionalnie, szczególnie w krajach portugalskojęzycznych. Uważa się, że choroba SCA3 jest najczęstszą dominującą dziedziczną postacią ataksji, dotykającą około 1:50 000-100 000 osób i jest drugą po HD pod względem częstości występowania wśród chorób poliQ (Durr, 2010; Gardiner et al., 2019). Chociaż wykazano, że portugalskie rodziny SCA3 wywodzą się z dwóch haplotypów, ustalono, że większość rodzin SCA3 na całym świecie pochodzi z jednego wewnątrzgenowego haplotypu (Gaspar et al., 2001). Nadal obserwuje się znaczące różnice regionalne i etniczne w częstości występowania choroby SCA3, przy czym największą częstość odnotowano w krajach Azji Wschodniej, w tym w Chinach, Japonii oraz Tajwanie, a także w Portugalii i Brazylii (Buijsen et al., 2019).

1.2. Objawy SCA3

Pierwsze objawy choroby SCA3 zwykle pojawiają się w wieku dorosłym chorego, między trzecią a piątą dekadą życia i postępują powoli wraz z wiekiem (Rüb et al., 2013). Pacjenci ze SCA3 wykazują szeroki zakres postępujących zaburzeń motorycznych, w tym wyraźną ataksję mózdkową z nieprawidłowym chodem, zaburzeniami równowagi, brakiem koordynacji kończyn, dystonią, spastycznością, dyzartrią, dysfagią i nieprawidłowościami

okoruchowymi (Paulson et al., 2017; Rüb et al., 2013). Parkinsonizm z drżeniem lub bez drżenia występuje również u części pacjentów ze SCA3 (Park et al., 2015). Chociaż nasilenie i tempo spadku są różne u pacjentów ze SCA3, niewydolność funkcji związanych z pniem mózgu zwykle prowadzi do zgonu w ciągu 10-15 lat od wystąpienia objawów (Diallo et al., 2018).

Postępujące upośledzenie motoryczne w SCA3 wynika z dysfunkcji neuronów i utraty komórek nerwowych w jądrach czuciowych i ruchowych obejmujących pień mózgu, mózdzek, śródmózgowie, rdzeń kręgowy, prążkowie i wzgórze (Rüb et al., 2013). Istotną cechą anatomiczną u pacjentów z SCA3 jest powiększenie czwartej komory wynikające z atrofii neuronów w moście podstawnym i głębokich jądrach mózdzku oraz utrata włókien mostowo-mózdkowych i dróg rdzeniowo-mózdkowych (Dürr et al., 1996; Rüb et al., 2013). Tkanki pobrane pośmiertnie z mózgów chorych na SCA3 wykazują znaczną degenerację neuronów dopaminergicznych istoty czarnej i jąder przedsionkowych (Dürr et al., 1996; Rüb et al., 2013, 2004). SCA3 prowadzi również do degeneracji neuronów ruchowych jąder nerwów czaszkowych, jądra czerwonego, jądra podwzgórzowego, gałki bladej i niektórych jąder wzgórza (Rüb et al., 2013, 2003, 2002b, 2002a). Zanik rdzenia kręgowego może wystąpić w rogu przednim, zwojach korzeni grzbietowych i jądrach grzbietowych (Fahl et al., 2015).

1.3. Patogeneza SCA3

1.3.1. Agregaty białkowe w komórkach

Nagromadzenie ubikwitynowanych agregatów białkowych lub inkluzji zawierających zmutowane białko ATXN3 wydłużony ciąg poliQ znajduje się we wszystkich wrażliwych obszarach mózgu w SCA3 (Paulson et al., 1997; Schmidt et al., 1998; Sittler et al., 2018). Inkluzje jądrowe neuronów (NNI) stanowią większość agregatów białkowych, chociaż występują również mniejsze neuronalne inkluzje cytoplazmatyczne (NCI) i dystalne agregaty w aksonach (Hayashi et al., 2003; Seidel et al., 2017, 2010). Podobnie jak agregaty w innych chorobach poliQ, ATXN3 NNI wybarwia się pozytywnie dla wielu innych białek, w tym ubikwityny (Ub), białek czynnika szoku cieplnego, podjednostek proteasomów, czynników transkrypcyjnych, białek opiekuńczych związanych z autofagią, takich jak p62, oraz innych białek poliQ i prawidłowej ATXN3 (Yaohui Chai et al., 1999; Y. Chai et al., 1999; Seidel et al., 2017, 2010; Uchihara et al., 2001). Dokładna rola, jaką agregacja ATXN3 odgrywa w SCA3

pozostaje wciąż niejasna, chociaż ogólnie przyjmuje się, że sekwestracja krytycznej maszynerii kontroli jakości białka w agregaty białkowe może przyczyniać się do stresu neuronalnego. To samo prawdopodobnie odnosi się także do innych chorób poliQ (Paulson et al., 2017).

1.3.2. Zmiany w tkance mózgowej, neuronach i gleju

Pień mózgu i jądra mózdzku, są obszarami mózgu wykazującymi największe zmiany u pacjentów ze SCA3, natomiast kora mózgowa wykazuje mniejszy stopień zmian (Yamada et al., 2001). W badaniu MRI pacjenci ze SCA3 wykazują zmniejszoną objętość istoty szarej w obszarze skroniowym, czołowym, ciemieniowym i wyspowym (Lopes et al., 2013). Spektroskopia rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance spectroscopy, MRS*) pacjentów ze SCA3 zidentyfikowała nieprawidłowości metaboliczne w traktach istoty białej, rozpoczynające się przed wystąpieniem objawów SCA3 (Adanyeguh et al., 2015; Joers et al., 2018). Natomiast pacjenci z objawami SCA3 wykazują łagodne zaburzenia funkcji poznawczych w zakresie funkcji wykonawczych i pamięci, prawdopodobnie odzwierciedlające zaangażowanie mózgu w chorobę i/lub zakłócenia w obwodach mózdkowo-mózgowych (Lopes et al., 2013). Zaburzenia snu są również powszechne wśród pacjentów, w tym zaburzenia zachowania podczas fazy snu REM i zespół niespokojnych nóg (Pedroso et al., 2011; Seshagiri et al., 2018).

1.3.3. Stan zapalny

Choroby neurodegeneracyjne związane z wiekiem łączy się z przewlekłym zapaleniem układu nerwowego, a zapalenie z udziałem mikrogleju jest istotnym czynnikiem patogenezy tych chorób (Bachiller et al., 2018; Caldeira et al., 2014; Chen et al., 2016; Glass et al., 2010; Kwon and Koh, 2020). Starzenie się powoduje, że mikroglej przyjmuje nieprawidłowy fenotyp, czasami określany jako dystroficzny lub starzejący się, zwykle związany z obniżoną zdolnością do zapewnienia prawidłowej odpowiedzi na uraz (Caldeira et al., 2014). Starzenie się komórek zazwyczaj charakteryzuje się zatrzymaniem wzrostu z powodu podwyższonego uszkodzenia DNA i stresu oksydacyjnego, który zwiększa ilość markerów starzenia, w tym regulatorów cyklu komórkowego P16Ink4a (znany również jako Cdkn2a), P19Arf (znany również jako Cdkn2a) i P21Cip1/Waf1 (znany również jako Cdkn1a) oraz cytokiny prozapalne, takie jak Pai1 (znany również jako Serpine1), Il-6, Il-8, Il-1 alfa i Il-1 beta (Bussian et al., 2018). Zmniejszona zdolność fagocytarna (Caldeira et al., 2014; Li, 2013), upośledzona homeostaza białek (proteostaza) (Mosher and Wyss-Coray, 2014) oraz morfologia dystroficzna, charakteryzująca się

zmniejszeniem rozgałęzień i skróceniem procesów neuronalnych (Streit and Xue, 2009), są również spójnymi zmianami mikrogleju związanymi z wiekiem. Zmiany te mogą przyczyniać się do zwiększonej podatności na dysfunkcję neuronów i zamieranie w czasie starzenia, poprzez zwiększoną produkcję mediatorów stanu zapalnego i zaburzenie funkcji neuroprotekcyjnych mikrogleju (Angelova and Brown, 2019; Chen et al., 2016).

Chociaż mikroglejoza została zaobserwowana zarówno w mózgach pacjentów z MJD pośmiertnie (Duarte Lobo et al., 2020; Evert et al., 2001; McLoughlin et al., 2020), jak i w mysim modelu MJD (Cunha-Santos et al., 2016), potrzebne są dalsze badania, aby w pełni zrozumieć podstawy aktywacji mikrogleju w SCA3 (McLoughlin et al., 2020). Ponieważ większość komórek mózgowych ekspresuje gen *ATXN3*, dysfunkcja mikrogleju może przyczyniać się do procesu chorobowego z powodu działania zmutowanego białka *ATXN3* w mikrogleju lub w wyniku interakcji tego białka z neuronami.

Najnowsza praca dotycząca wpływu mikrogleju na patogenezę SCA3 wskazuje na zmiany morfologiczne, które wskazują na zwiększony stan aktywacji mikrogleju u myszy CMVMJD135 i specyficzny dla choroby profil transkryptomyczny mikrogleju SCA3, obejmujący łącznie 101 genów o zmienionej ekspresji, które są zaangażowane w szlaki molekularne związane ze stresem oksydacyjnym, odpowiedzią immunologiczną, proliferacją komórek, śmiercią komórek i metabolizmem lipidów. Podsumowując, wyniki te definiują profil komórkowy i molekularny mikrogleju związanego z MJD oraz pozwalają zidentyfikować geny i szlaki metaboliczne, które mogą stanowić potencjalne cele terapeutyczne dla leczenia tego zaburzenia (Campos et al., 2022).

1.3.4. Patogeneza obwodowa

Patologia SCA3 nie ogranicza się do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Pacjenci ze SCA3 wykazują znaczne zmniejszenie amplitudy złożonego potencjału czynnościowego mięśni (ang. *compound muscle action potential*, CMAP) i potencjału czynnościowego nerwów czuciowych (ang. *sensory nerve action potential*, SNAP), co wskazuje na neuropatię aksonalną zarówno włókien motorycznych, jak i czuciowych. Ponadto, u pacjentów tych wystąpiło również umiarkowane spowolnienie przewodnictwa nerwowego sugerujące łagodną demielinizację obwodową. Regresja wieloczynnikowa wykazała, że amplitudy CMAP i SNAP zmniejszały się wraz z wiekiem, ale długość powtórzeń nukleotydowych CAG nie miała na niego wpływu, jak również i na okres pojawienia się objawów i czas trwania choroby. Związany

z wiekiem spadek amplitud CMAP i SNAP w SCA3/MJD był większy niż u osób zdrowych (Klockgether et al., 1999). Ponadto, pacjenci wykazują postępującą neuropatię obwodową, szczególnie w dystalnych kończynach, prowadzącą do atrofii mięśni i arefleksji (Linnemann et al., 2016; Suga et al., 2014).

1.4. Białko ATXN3

1.4.1. Struktura

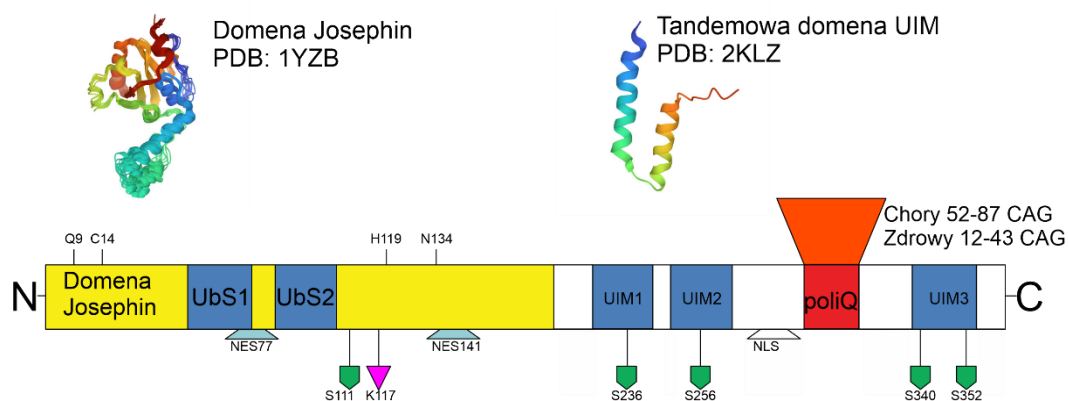
ATXN3 zawiera ustrukturyzowany globularny N-koniec białka, który złożony jest ze 198 aminokwasów – katalityczna domena Józefiny (ang. *Josephin domain*, JD) – po którym następuje nieustrukturyzowany, elastyczny C-koniec białka zawierający odcinek poliQ i dwa lub trzy motywy oddziałujące z ubikwitiną (ang. *ubiquitin-interacting motifs*, UIM), w zależności od izoformy białka (Goto et al., 1997; Masino et al., 2003).

Chociaż kilka potencjalnych izoform ATXN3 może ulegać translacji, tylko dwie zostały szczegółowo zbadane. Obie izoformy są białkami pełnej długości, które zawierają ciąg poliQ oraz motywy UIM 1 i 2, ale różnią się C-końcami, pozbawionymi lub zawierającymi UIM 3. Badania z użyciem przeciwciał, które rozpoznają obie izoformy białka, lub tylko ATXN3 zawierającą UIM3 wskazują, że UIM3 ATXN3 jest dominującą izoformą wyrażaną w mózgu (Harris et al., 2010; Schmidt et al., 1998; Trottier et al., 1998).

Domena JD przyjmuje częściowo wydłużoną strukturę w kształcie litery „L” złożoną z kulistej poddomeny katalitycznej i spiralnej części przypominającej strukturę spinki do włosów (Mao et al., 2005; Nicastro et al., 2006, 2005). Aktywność proteazy ubikwityny zlokalizowana jest w subdomenie katalitycznej, która obejmuje kieszonkę rozszczepiającą (Q9, C14, H119, N134) typową dla proteaz cysteinowych podobnych do papainy oraz dwa miejsca wiązania Ub (Mao et al., 2005; Nicastro et al., 2009, 2006). Aktywność Ub-proteazy ATXN3 wymaga występowania w miejscu aktywnym obecności cysteiny w pozycji 14 (Berke and Paulson, 2003; Burnett et al., 2003; Chai et al., 2004). Struktura krystalograficzna domeny Józefiny Ataxin-3 (PDB: 1YZB, 2AGA, 3O65, 2JRI, 2DOS) pokazuje, że fragment na końcu karboksylowym ma 14 reszt glutaminowych o nieregularnej konformacji spirali i α -helikalnej. Sekwencja poliQ w strukturze α -helikalnej jest stabilizowana przez wewnątrzhelikalne wiązania wodorowe, w których pośredniczą łańcuchy boczne glutaminy. Wewnątrzhelikalne oddziaływania wiązań wodorowych w bocznych łańcuchach glutaminy na poliQ α -helisy

stabilizują natomiast strukturę drugorzędową (Zhemkov et al., 2016). Dane uzyskane ze struktury ATXN3 i jej domeny poliQ pokazują, że gdy glutaminy wchodzą w interakcję z wewnątrzhelikalnym wodorem, może to skutkować agregacją, a interakcja ta może być podstawą do wyjaśnienia patogenicznego procesu tworzenia agregatów wydłużonej ATXN3. Struktura JD jest identyczna w białkach ataksyny-3L i ATXN3 (Weeks et al., 2011). Łańcuchy PoliUb z co najmniej czterema jednostkami Ub, są cięte *in vitro* przez ATXN3. ATXN3 wykazuje również powinowactwo do połączonych z K63 i mieszanych K48/K63 łańcuchów poliUb w porównaniu z łańcuchami połączonymi z K48 *in vitro* (Burnett et al., 2003; Chai et al., 2004; Winborn et al., 2008). Chociaż oddziaływanie to sprzyja rozszczepianiu długich łańcuchów poliUb, ATXN3 może również deubikwitynować specyficzne monoubikwitynowane substraty w funkcjonalnych kompleksach białkowych (Scaglione et al., 2011).

Wiązanie Ub do JD następuje poprzez mechanizm indukowanego dopasowania, w którym pośredniczy część spiralna przypominająca strukturę spinki do włosów (Nicastro et al., 2009). Leżąc blisko aktywnej szczeliny, miejsce wiązania UbS 1 jest niezbędne do rozszczepienia wszystkich łańcuchów Ub, podczas gdy miejsce 2 (UbS2), znajdujące się po przeciwnej stronie i zachodzące na powierzchnię interakcji domeny Ub-podobnej do HHR23B (Ubl). Może nadawać łańcuchowi poliUb preferencje wiązania, ponieważ mutacja tego miejsca zmniejsza rozszczepianie łańcuchów poliUb połączonych z K48 i mieszanych z K63/K48, ale nie z K63 (Nicastro et al., 2010). Co ciekawe, tylko cząsteczka di-Ub związana z K48 wydaje się być zdolna do jednoczesnego zajmowania obu miejsc Ub na wyizolowanej JD (Nicastro et al., 2010) (Ryc. 1).



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie białka ATXN3. ATXN3 jest białkiem o długości 376 aminokwasów składającym się z N-końcowej katalitycznej JD i C-końcowej domeny wiążącej ubikwitynę. JD zawiera miejsce katalityczne deubikwitynazy (ang. *deubiquitinase*, *DUB*) w C14, dwa jądrowe sygnały eksportu (ang. *nuclear export signals*, *NES*) w pozycjach 77 i 141, jak również dwa

miejsca wiązania ubikwityny (Ub). Białko ATXN3 jest modyfikowane potranslacyjnie przez fosforylację w S77 i ubikwitynę w K117. C-końcowa domena wiążąca ubikwitynę zawiera dwa lub trzy motywy oddziałujące z ubikwityną (ang. *ubiquitin-interacting motifs, UIMs*), sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) w pozycji 273 i odcinek poliglutaminowy o zmiennej długości. Jest najczęściej modyfikowany potranslacyjnie przez fosforylację w S236, S256, S340 i S352.

Specyficzne rozpoznawanie i pozycjonowanie łańcuchów Ub służące do trawienia proteolitycznego przez ATXN3 wymaga współpracy między jego miejscami wiązania Ub w JD i UIM na C-końcu. UIM są niezbędne zarówno do wiązania łańcucha poliUb o wyższym powinowactwie, ale są wymagane do procesu trawienia (Winborn et al., 2008).

Część puli komórkowej ATXN3 jest ubikwitynowana. Chociaż ATXN3 może być mono- i oligo-ubikwitynowana (ATXN3-Ub), główne rodzaje ATXN3-Ub są monoubikwitynowane (Berke et al., 2005; Todi et al., 2009). Ta modyfikacja potranslacyjna zwiększa aktywność deubikwitynazy ATXN3 wobec ubikwitynowanych substratów i wolnych łańcuchów poliUb (Todi et al., 2010, 2009). Wśród kilku reszt lizyny, które mogą być ubikwitynowane na ATXN3, reszta K117 znajduje się w pobliżu kieszeni katalitycznej jest resztą najbardziej modyfikowaną (Todi et al., 2010). Ubikwitynacja reszty K117 zwiększa aktywność ATXN3 niezależnie od innych kofaktorów/interaktorów, innych typów modyfikacji potranslacyjnych czy znanych domen wiążących Ub (Todi et al., 2010).

1.4.2. Funkcja ATXN3

ATXN3 posiada kilka domen, dzięki którym może pełnić wiele funkcji (Ryc. 1). Ustrukturyzowany globularny N-koniec zawiera wysoce konserwatywną JD odpowiedzialną za katalityczne cięcie łańcuchów ubikwityny. Elastyczny ogon C-końcowy zawiera trzy motywy UIM, które ułatwiają wiązanie ATXN3 z poliubikwitynowanymi łańcuchami (Costa and Paulson, 2012). Białko ATXN3 jest regulowane przez monoubikwitynację na Lys117, co zwiększa aktywność DUB (Todi et al., 2009). Obecność lub brak trzeciego UIM może zmienić specyficzność ATXN3 wobec łańcuchów i substratów poliubikwityny (Weishäupl et al., 2019). ATXN3 w różnym stopniu lokalizuje się zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym, a jej transport przez błonę jądrową wydaje się być bardzo dynamiczny. Białko ATXN3 pełnej długości zawiera dwie sekwencje eksportu jądrowego (NES) i sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS), które ułatwiają aktywny transport białka przez błonę jądrową (Antony et al., 2009; Sowa et al., 2018) (ryc. 1). W wielu typach komórek ATXN3 głównie lokalizuje się w cytoplazmie

w warunkach neutralnych (Antony et al., 2009), ale stresory komórkowe, takie jak stres oksydacyjny lub szok cieplny, wywołują szybką zmianę lokalizacji białka ATXN3 z cytoplazmatycznej na jądrową (Reina et al., 2010). Jak zauważono wcześniej, nieprawidłowe stężenie i agregacja zmutowanej ATXN3 w jądrach neuronalnych jest cechą definiującą neuropatologię SCA3 (Paulson et al., 1997; Rüb et al., 2013). Co ciekawe, dzięki wymuszeniu zmiany lokalizacji zmutowanego białka z jądrowej na cytoplazmatyczną prowadzi do łagodzenia wielu cech choroby, i odwrotnie podczas gdy wymuszenie zwiększenia lokalizacji jądrowej zmutowanego ATXN3 nasila to chorobę u myszy SCA3 (Bichelmeier et al., 2007).

1.4.3. Rola zmienionej homeostazy białek

Zaburzenia homeostazy białek stanowią istotny temat w chorobach poliQ, w tym SCA3 (Klockgether et al., 2019; Paulson et al., 2017). Trzy główne gałęzie kontroli jakości białek (ang. *protein quality control*, PQC) – UPS, białka opiekuńcze i autofagia – są powiązane z SCA3 i innymi chorobami poliQ. W tych chorobach konsekwencją ciągłego wytwarzania białek podatnych na agregację (np. ATXN3 zawierająca patologiczną liczbę powtórzeń CAG) jest to, że wydajność szlaków PQC jest niewystarczająca. Co więcej, agregacja ATXN3 i innych białek w chorobach poliQ może sekwestrować elementy szlaków PQC w inkluzjach, jeszcze bardziej wpływając na jego wydajność. Wśród chorób poliQ problem ten jest spotęgowany w przypadku SCA3, ponieważ samo białko DUB bezpośrednio uczestniczy w kontroli jakości powstających białek.

Jak wspomniano wcześniej, ATXN3 to kontrola jakości DUB, która jest najbliższej powiązana z UPS. Zmutowana ATXN3 nadal wiąże i rozszczepia łańcuchy poliQ w prostych testach komórkowych i *in vitro*. Jednak w bardziej złożonych warunkach fizjologicznych stosunkowo niewiele wiadomo o tym, jak ekspansja poliQ wpływa na zdolność ATXN3 do regulowania ubikwitynacji, rodzaju wiązań łańcuchowych, które może trawić, oraz skuteczność dostarczania substratów przez proteasom. Wiadomo, że podjednostki ubikwityny i proteasomów są sekwestrowane w agregatach wewnątrz neuronalnych w mózgu w modelach myszy z chorobą SCA3 (Yaohui Chai et al., 1999; Schmidt et al., 2002; Seidel et al., 2010). Chociaż taka sekwestracja może ograniczać wydajność neuronalnych procesów UPS, nie zostało to dokładnie ustalone. Jednakże silne osłabienie działania UPS może nie być wymagane, aby mieć szkodliwy wpływ na patogenezę SCA3. Sugeruję się, że nawet dość

niewielki wpływ na wydajność UPS może mieć głęboki pośredni wpływ na inne aspekty sygnalizacji ubikwityny w neuronach lub innych typach komórek.

1.4.4. Rola ubikwityny i proteasomu w patogenezie SCA3

W różnych chorobach neurodegeneracyjnych, przeciążenie UPS przez akumulację nieprawidłowo sfałdowanych białek może wywołać tworzenie szlaku komórkowego służącego do konsolidacji agregatów proteotoksycznych (ang. *aggresome*), (Kopito, 2000). Są to dynamiczne struktury około jądrowe regulowane przez elementy maszyneryi UPS, w tym ligazy E3, podjednostki proteasomów i łańcuchy poliubikwitynowe połączone z K63 oraz białko p62 związane z autofagią (Olzmann et al., 2008). Powstawanie tzw. aggresomów zależy również od zależnego od mikrotubul transportu zagregowanych białek. Niepatogenna ATXN3 wykazuje preferencję w stosunku do wiązań ubikwityny K63 (Winborn et al., 2008) i bezpośrednio oddziałuje z wieloma białkami cytoszkieletu, regulatorami proteasomów i białkami autofagicznymi zaangażowanymi w tworzenie aggresomu, (tj. tubulina, dyneina, HDAC6, Parkin, CHIP, i p62) (Bonanomi et al., 2014; Mazzucchelli et al., 2009a; Scaglione et al., 2011; Zhou et al., 2014). ATXN3 również lokalizuje i reguluje tworzenie tzw. aggresomów zawierających nieprawidłowo sfałdowane białka chorobowe związane z chorobą neurodegeneracyjną, w tym zmutowanym białkiem SOD1 i CFTR (Burnett and Pittman, 2005; Wang et al., 2012). Zdolność ATXN3 do pośredniczenia w tworzeniu tzw. aggresomów jest zmniejszona przez mutacje miejsc katalitycznych lub usuwanie UIM, co sugeruje, że role zależne od DUB ATXN3 są kluczowe dla tworzenia tzw. aggresomów (Burnett and Pittman, 2005).

1.4.1. Modyfikacje potranslacyjne ATXN3

ATXN3 jest poddawana licznym modyfikacjom potranslacyjnym (ang. *posttranscriptional modification, PTM*), w tym ubikwitynacji na K117, SUMOilacji i fosforylacji (Ryc. 1). Wszystkie trzy modyfikacje zmieniają zachowanie i funkcję ATXN3. Ubikwitynacja reszty aminokwasowej w K117 wzmacnia aktywność DUB ATXN3 (Todi et al., 2010, 2009), a fosforylacja w określonych miejscach może zmienić lokalizację jądrowo-cytoplazmatyczną ATXN3 (Mueller et al., 2009). Chociaż ATXN3 może wiązać SUMO i ulegać SUMOilacji (Almeida et al., 2015; Zhou et al., 2013, p. 1), nie jest jeszcze jasne, w jaki sposób wiązanie lub SUMOilacja SUMO zmienia funkcję lub degradację białka ATXN3. W jednym z badań mutacja miejsca wiązania SUMO w ATXN3 przyspieszyła degradację zmutowanego, ale nie normalnego

ATXN3 (Almeida et al., 2015), co sugeruje, że efekty wiązania białka SUMO mogą być szczególnie istotne dla zmutowanej postaci tego białka. Potrzebne są dalsze prace, aby ocenić, w jaki sposób te różne modyfikacje potranslacyjne mogą modulować patogenezę choroby.

1.4.2. Udział ATXN3 w autofagii

W przypadku chorób poliQ większość dowodów wskazuje na nieprawidłowe działanie zmutowanego białka ATXN3 jako głównego czynnika wywołującego chorobę (Paulson et al., 2017). Kliniczne i neuropatologiczne różnice między chorobami prawdopodobnie odzwierciedlają unikalny kontekst białkowy, w którym ekspansja poliQ jest obecna w każdej chorobie. Jednak funkcja ATXN3 prawdopodobnie wykracza poza układ proteasomu ubikwityny (UPS) i obejmuje inne procesy, w tym makroautofagię, regulację transkrypcji, organizację cytoszkieletu i naprawę uszkodzeń DNA (Araujo et al., 2011; Burnett et al., 2003; Costa and Paulson, 2012; Doss-Pepe et al., 2003; Evert et al., 2003; Gao et al., 2015, 2019; Li et al., 2002a; Rodrigues et al., 2010).

1.4.3. Interakcje normalnej i zmutowanej ATXN3

Przez ponad dwie dekady badania ustaliły powiązanie między SCA3 a różnymi białkami opiekuńczymi (Y. Chai et al., 1999; Chan et al., 2000; Ito et al., 2016; Seidel et al., 2012; Vos et al., 2010; Warrick et al., 1999). Liczne białka opiekuńcze, gdy ulegają nadmiernej ekspresji, mogą złagodzić cechy chorobowe w układach modelowych SCA3, poprawiając „obsługę” zmutowanego ATXN3 lub zwiększając ogólną homeostazę białka, albo jedno i drugie. Wcześniejsze badania ustaliły ogólną rolę Hsp40 w białkach opiekuńczych Hsp70, a nowsze badania zidentyfikowały określone białka opiekuńcze ulegające ekspresji w mózgu jako szczególnie istotne dla SCA3 (np. HSPB7, HSPB8-BAG3 i DNAJC8). Podczas gdy wiele badań potwierdza rolę klasycznego, działania zależnego od ATP białek opiekuńczych w celu ponownego fałdowania lub przeciwdziałania agregacji zmutowanego ATXN3, niektóre badania potwierdzają powiązania między zaangażowanymi chaperonami a układem autofagializosomalnym (Pavel et al., 2016). Tak jak różne elementy systemu sygnalizacji ubikwityny mogą wpływać na siebie nawzajem, tak trzy główne ścieżki PQC są ze sobą ściśle powiązane i mogą wywierać na siebie głęboki wpływ.

Niedawno pojawiły się powiązania między SCA3 a autofagią. Na przykład w mózgu z chorobą SCA3 poziomy kluczowych białek autofagii są zaburzone (Sittler et al., 2018). Wzmocnienie ścieżek cholesterolu w mózgu może poprawić autofagię i złagodzić cechy

choroby w mysim modelu SCA3 (Nóbrega et al., 2019b). Podobnie, inhibitor translacji białka Cordycepin i inhibitor kalpajny, kalpeptyna, łagodzą objawy choroby w modelach choroby SCA3, prawdopodobnie poprzez mechanizm związany ze zwiększoną autofagią (Marcelo et al., 2019; Watchon et al., 2017).

Co ciekawe, ATXN3 wydaje się być bezpośrednio związana z autofagią: w kilku badaniach zidentyfikowano rolę regulatorową prawidłowego białka ATXN3 w makroautofagii. ATXN3 wiąże się i reguluje poziomy Beclin1, kluczowego białka w szlaku autofagii zaangażowanym w nukleację autofagosomów. Interakcja ATXN3-Beclin1 stabilizuje Beclin1, zapobiegając jego degradacji przez proteasom. Zmutowana ATXN3 przez rejon poliQ wiąże się z Beclin1, ale wydaje się, że ułatwia jego dostarczenie i degradację przez proteasom, co skutkuje obniżonymi poziomami Beclin 1 (Ashkenazi et al., 2017). Modele komórkowe i zwierzęce SCA3 wykazują zmienioną ekspresję kluczowych białek autofagii, która może być częściowo spowodowana destabilizacją Beclin1 zależną od poliQ. Fibroblasty pochodzące od pacjentów z SCA3 wykazują obniżony poziom Beclin1, zmniejszone natężeniu autofagii (ang. *autophagy flux*) i zaburzone tworzenie autofagosomów (Onofre et al., 2016). Poziomy Beclin1 są znacznie obniżone w mózgu pacjentów z SCA3, podczas gdy inne kluczowe białka autofagii, w tym ATG-12, LAMP-2, Rab7, Rab1A i LC3, są znacznie zwiększone (Sittler et al., 2018). Białka autofagii, takie jak p62 i LC3, również lokalizują się w agregatach ATXN3 we wrażliwych regionach mózgu u pacjentów z SCA3 (Sittler et al., 2018). Zatem zaburzenia PQC w SCA3 mogą być równie dobrze kulminacyjnym efektem akumulacji zmutowanych agregatów ATXN3, sekwestracji kluczowych UPS i autofagicznych regulatorów oraz destabilizacji Beclin1.

1.5. Modele zwierzęce SCA3

Modele zwierzęce chorób neurodegeneracyjnych stanowią doskonałe narzędzie umożliwiające prześledzenie patogenezy, a także testowanie i tworzenie nowych podejść terapeutycznych. Najczęściej stosowanym organizmem modelowym w przypadku badania schorzeń takich jak choroba Parkinsona, Alzheimerera czy płasawica Huntingtona, są zwierzęta laboratoryjne takie jak szczur oraz mysz. W przypadku choroby Alzheimerera, transgeniczne organizmy modelowe umożliwiły zdobycie cennych informacji odnośnie patogenezy oraz współistniejących zaburzeń behawioralnych, poznawczych, w tym zmian anatomicznych i histopatologicznych w mózgu. Chociaż dostępnych jest kilka mysich modeli SCA3, większość

z nich ma wadę polegającą na ekspresji cDNA pod kontrolą sztucznych promotorów, np. CMV, L7, rHtt, PrP lub specyficznych dla komórek Purkiniego (PC) (Bichelmeier et al., 2007; Boy et al., 2010, 2009; Goti et al., 2004; Ikeda et al., 1996; Silva-Fernandes et al., 2010).

1.5.1. Modele transgeniczne (indukowalne)

Boy i współpracownicy (Boy et al., 2009) wygenerowali pierwszy indukowalny myszy model SCA3 stosujący system Tet-Off (Gossen and Bujard, 1992) pod kontrolą promotora białka prionowego (Tremblay et al., 1998), co prowadzi do silnej ekspresji transgenu w mózdku (Boy et al., 2006; Nuber et al., 2008). Myszy transgeniczne rozwijają fenotyp podobny do ludzkich pacjentów z SCA3: myszy wykazują progresywny fenotyp neurologiczny charakteryzujący się nadpobudliwością, zmniejszonym lękiem, upośledzonym uczeniem się motorycznym, krótszymi czasami w teście Rotarod, zmniejszoną wagą i inkluzjami wewnątrzjądrowymi. Jednak po wyłączeniu ekspresji wydłużonej ATXN3 obserwowane objawy motoryczne ustępują i po 5 miesiącach leczenia transgeniczne myszy SCA3 są nie do odróżnienia od swoich kontrolnych miotów. W naszym modelu mysim *in vivo* wykazujemy zatem, że zarówno neurologiczne, jak i fizjologiczne objawy SCA3 są odwracalne.

1.5.2. Model 84, MJD

Model myszy, który dość dobrze naśladuje SCA3, został stworzony przy użyciu konstruktów YAC o długości 250 kb, który zawiera 50 kb ludzkiego genu *ATXN3* flankowanego przez sekwencje genomowe 30 i 170 kb (Cemal K. Cemal et al., 2002). Wskazuje to, że MJD-84.2 YAC może w rzeczywistości być transgeniczny dla innych ludzkich genów, a możliwymi kandydatami są *TRIP11* i *NDUFB1*. Zwierzęta, które zostały wygenerowane, obejmują linie z 15, 67, 72 i 84Q, które różnią się wiekiem zachorowania i ciężkością choroby, ale ogólnie wykazują łagodne fenotypy. Zaburzenia neurobehawioralne obserwowane w modelu obejmują nieprawidłowy chód (od łagodnego do ciężkiego), łagodne drżenie ciała, hipoaaktywność i podwijanie kończyn (Cemal K. Cemal et al., 2002). Wzorec neuropatologii obejmuje przede wszystkim powstawanie NII, utratę neuronów i glicozę jądra zębatego, jądra mostu i istoty czarnej, wraz z widocznymi defektami mielinizacji w obwodowym układzie nerwowym (Cemal K. Cemal et al., 2002; Chen et al., 2008). Kora mózdku, która jest mniej dotknięta u pacjentów z SCA3 niż u pacjentów z SCA1, jest zanikowa z utratą, dysfunkcją i zwyrodnieniem komórek Purkiniego (Cemal K. Cemal et al., 2002; Shakkottai et al., 2011).

1.5.3. Modele knock-in

Chociaż modele transgeniczne umożliwiły badanie wybranych cech SCA3, mają pewne wady, takie jak nadmierne ilości kopii transgeny, nienaturalne wzorce ekspresji, niepełna ekspresja białka, brak sekwencji regulatorowych, a nawet połączenie tych wad. W 2002 r. Cemal i współpracownicy przedstawili pierwszy model pełnego genu, w którym zachodzi ekspresja ludzkiego genu *ATXN3* ze wszystkimi sekwencjami regulatorowymi, a mimo to ekspresjonujący mysz endogenny *Atxn3* (Cemal K. Cemal et al., 2002). W 2015 roku wprowadzono pierwsze modele SCA3 typu knock-in. Modele te mają zaletę ekspansji CAG w mysim locus *Atxn3* pod endogennymi elementami regulatorowymi i na poziomie fizjologicznym., w Instytucie Chemii Bioorganicznej stworzono model myszy, w której mysz gen *Atxn3* zastąpiono humanizowaną wersją z 91 powtórzeniami CAG, w tym samym czasie Paulson i współpracownicy przedstawili linię KI zawierającą 82 powtórzenia CAG w mysim locus *Atxn3* (Ramani et al., 2015, 2017; Switonski et al., 2015a). Chociaż myszy te wykazywały tworzenie agregatów i łagodny fenotyp, nie odzwierciedlały pełnego fenotypu ludzkiego SCA3. Z modeli zwierzęcych HD wiemy, że nie wystarczy wprowadzić taką samą długość ekspansji CAG u myszy lub szczurów, jaka występuje w genie chorobotwórczej ludzkiej huntingtyny (HTT). Wymagane jest natomiast kilkukrotne wydłużenie tej długości, aby wywołać fenotyp (Farshim and Bates, 2018). Badacze doszli do wniosku, że konieczne jest wprowadzenie znacznie dłuższych powtórzeń CAG w mysim *Atxn3* niż obserwowane u pacjentów, aby wywołać fenotyp podobny do ludzkiego (Haas et al., 2022).

1.6. Terapie eksperymentalne w leczeniu SCA3

Chociaż przeprowadzono wiele badań klinicznych z udziałem różnych potencjalnych terapii SCA3, wciąż nie ma leku na tę chorobę zaakceptowanego przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA). Na chwilę obecną w bazie ClinicalTrials.gov znajduje się lista 32 testów klinicznych dotyczących terapii SCA3 (tabela 1), które trwają lub zostały ukończone. Testowane leki obejmują modulatory neuroprzebieżników, inhibitory transportu jonów, czynniki wzrostu, inhibitory deacetylazy histonowej (HDAC) i wzmacniacze autofagii, oraz testy z użyciem komórek macierzystych pochodzących z adipocytów i krwi pępowinowej (Chen et al., 2020).

1.6.1. Terapia genowa

Najbardziej oczywistym celem interwencji terapeutycznej jest supresja lub modyfikacja zmutowanego białka w celu złagodzenia fenotypów choroby. Brak jawnych fenotypów po linii zarodkowej lub warunkowy nokaut endogennego ATXN3 u myszy sugeruje, że ATXN3 nie jest niezbędnym białkiem u ssaków (Boy et al., 2009; Schmitt et al., 2007). Zatem zmniejszenie całkowitych poziomów białka ATXN3 byłoby prawdopodobnie dobrze tolerowane u pacjentów z SCA3.

Strategie wyciszania ATXN3 obejmują transfekcję konstruktów RNAi specyficznych dla alleli i niespecyficznych skierowanych na 3'UTR mRNA ATXN3. Specyficzny knockdown zmutowanego białka ATXN3 można przeprowadzić przez celowanie w pojedynczy allel polimorfizmu nukleotydowego lub przy użyciu konstruktów z pominięciem eksonu ukierunkowanych na ekson 9 lub 10 (Buijsen et al., 2019; Moore et al., 2019). Alternatywnie, wyciszanie niespecyficzne dla allelu zmutowanego i typu dzikiego ATXN3 również osiągnęłoby cel polegający na zmniejszeniu agregacji białek i wynikającej z tego neuropatologii, ponieważ knockdown ATXN3 typu dzikiego nie pogorszyłby patologii SCA3 (Alves et al., 2010).

Shi i współpracownicy stwierdzili niższe poziomy ekspresji mikroRNA (miRNA) miR-29a, miR-25 i miR-125b w surowicy pacjentów w porównaniu z grupą kontrolą (Shi et al., 2014). Jednak tylko transfekcja miR-25 naśladowała ekspresję dzikiej ATXN3 lub zmutowanej ATXN3 w komórkach modelowych HEK293T, SH-SY5Y i SCA3/MJD (Huang et al., 2014, p. 25). Wykazano, że oprócz miR-25, gatunki miR-9, miR-181a i miR-494 wiążą 3'-UTR mRNA ATXN3 i hamują ekspresję ATXN3 (Carmona et al., 2017). Obniżenie poziomu miR-9 i miR-181a została potwierdzona w egzosomalnych macierzach miRNA pochodzących z płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzącego od pacjentów z SCA3 i modeli zwierzęcych SCA3 (Carmona et al., 2017; Hou et al., 2019).

Te konstrukty RNAi mogą być dostarczane pacjentom przy użyciu wektorów, takich jak wirus adenowirusowy (ang. *Adeno Associated Virus*, AAV) (do Carmo Costa et al., 2013) i lentiwirus (Nóbrega et al., 2019a) lub przez systemy niewirusowe, takie jak nanocząstki lipidowe (Conceição et al., 2016). W każdym przypadku wymagana jest wydajna długoterminowa ekspresja RNAi, aby zahamować agregację białek. Nóbrega i wsp. donosili o długotrwałej supresji (20 tygodni po wstrzyknięciu) przy użyciu wektora lentiwirusowego kodującego krótkie RNA o strukturze spinki do włosów (LV-shmutatx3) (Nóbrega et al., 2019a).

Chociaż terapeutyki oparte na miRNA nie zostały jeszcze zastosowane w leczeniu SCA3/MJD, zostały przebadane w badaniach klinicznych pod kątem innych chorób, takich jak dziedziczny zespół Alporta i ALS. Na podstawie tych ustaleń możliwe wydaje się zastosowanie terapii opartych na miRNA w przypadku SCA3/MJD.

1.6.2. Modulatory neurotransmiterów

Agregacja zmutowanych białek ATXN3 *in vivo* była związana z nieprawidłową transmisją synaptyczną. Zostało to wywnioskowane przez podawanie leków, które celują w neurotransmisję acetylocholiny do nicieni SCA3. Wrażliwość na modulatory sygnalizacji acetylocholiny w połączeniu z obrazowaniem *in vivo* sugerowała upośledzenie uwalniania acetylocholiny z neuronów presynaptycznych poprzez wychwytywanie pęcherzyków do agregatów zmutowanego białka ATXN3 (Khan et al., 2006). Ponadto analiza transkryptomyczna mózgów dwóch odrębnych modeli myszy transgenicznym SCA3 wykazała obniżenie ekspresji genów zaangażowanych w neuroprzebieżność glutaminergiczną i alfa-adrenergiczną (Chou et al., 2008; Toonen et al., 2018). Defekty sygnalizacji glutaminergicznej były również badane na poziomie funkcjonalnym poprzez elektrofizjologię (Chou et al., 2014; Konno et al., 2014).

Większość środków terapeutycznych stosowanych do SCA3 moduluje sygnalizację neuroprzebieżników, w tym agonistów receptora 5-HT_{1A}, agonistów receptora nikotynowego acetylocholiny (Zesiewicz et al., 2012), inhibitory transportu jonów (Saute et al., 2014), aktywatory kanałów potasowych, inhibitory transmisji glutaminergicznej i różnych innych agonistów lub antagonistów receptora neuroprzebieżników.

Wareniklina, agonista neuronalnych receptorów nikotynowych acetylocholiny $\alpha 4\beta 2$, obecnie stosowana klinicznie jako pomoc w rzucaniu palenia, została również przetestowana w badaniu fazy 2. Wareniklina istotnie złagodziła objawy osiowe i szybkie ruchy naprzemienne (Zesiewicz et al., 2012), natomiast najczęstszym skutkiem ubocznym były nudności. Jednak w innym badaniu tylko jeden pacjent na siedmiu ukończył badanie z powodu uporczywych nudności, bezsenności i/lub depresji. Mimo to leczony pacjent wykazywał nieznaczną poprawę objawów osiowych (Connolly et al., 2012). Liczne badania kliniczne badały skuteczność terapeutyczną leków, które zakłócają neuroprzebieżność glutaminergiczną jako nadmierna stymulacja i wynikająca z tego ekscytotoksyczność, w której pośredniczy glutaminian, ma związek z wieloma zaburzeniami neurologicznymi. Badanie (NCT01104649) wykazało, że inhibitor uwalniania glutaminianu, riluzol, obniżył wynik skali oceny ataksji (ang. *Scale for the*

Assessment and Rating of Ataxia, SARA) u połowy badanych pacjentów, bez poważnych skutków ubocznych (Romano et al., 2015). W 2018 r. rozpoczęto badania fazy 2 dla dwóch pochodnych riluzolu, troriluzolu (pochodna tripeptydu) i BHV-4157 (proleku riluzolu). Hormon uwalniający tyreotropinę (TRH) jest plejotropowym modulatorem hormonów i neuroprzekaźników, a także domniemanym neuroprzekaźnikiem. Jest to również jeden z pierwszych leków zatwierdzonych w Japonii na degenerację rdzeniowo-mózdkową. W mózdku TRH promuje długotrwałą depresję pobudzającej transmisji glutaminergicznej z włókien równoległych do komórek Purkiniego (ang. *Purkinje cells*, PC) poprzez zmniejszenie aktywności receptora typu kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolepropionowego (AMPA) poprzez sygnalizację NO/cGMP droga (Watanave et al., 2018). Receptor jądrowy ROR α (ROR α), metabotropowa cząsteczka sygnalizacyjna receptora glutaminianu typu 1 (Konno et al., 2014), podtrzymuje złożoność dendrytyczną PC i mono- unerwienie poprzez pnące włókna (Chen et al., 2013). Zmniejszoną ekspresję ROR α wykryto w jądrach mysich PCs SCA3 (Konno et al., 2014; Watanave et al., 2019), a pojedyncze wstrzyknięcie agonisty ROR α/γ SR1078 poprawiało behawioralne, morfologiczne i funkcjonalne zaburzenia u myszy modelowych SCA3 (Watanave et al., 2019).

1.6.3. Terapie nakierowane na autofagię

Ukierunkowana autofagiczna degradacja zmutowanej ATXN3 została również zaproponowana jako potencjalna strategia leczenia SCA3/MJD (Rozdział 2.3.3) (Berger et al., 2006; Bové et al., 2011). W zasadzie ta terapeutyczna autofagia może być indukowana przez ssące szlaki zależne lub niezależne od rapamycyny (mTOR) (Bové et al., 2011; Wang, 2018).

Ekspresja beclin-1, inicjatora autofagii zależnej od mTOR, była niższa w fibroblastach pacjentów (Nascimento-Ferreira et al., 2011; Onofre et al., 2016). Ponadto stosunek LC3II/LC3I był niższy, a ekspresja p62 wyższa u pacjentów (Nascimento-Ferreira et al., 2011), co wskazuje na zatrzymanie przepływu autofagicznego w fagoforze bez progresji do autofagosomu. Może to wynikać z degradacji becliny-1 spowodowanej przez ekspandowany zmutowany poliQ ATXN3, podczas gdy normalna ATXN3 sprzyja autofagii poprzez zapobieganie degradacji becliny-1 przez proteasom (Ashkenazi et al., 2017; Herzog et al., 2020).

Rapamycyna (Ou et al., 2016), kordycepina (Marcelo et al., 2019) i nadekspresja becliny-1 mogą nasilać autofagię (Nascimento-Ferreira et al., 2011). Kordycepina aktywuje autofagię poprzez zwiększenie aktywności AMPK (Marcelo et al., 2019), a strategia ta została

zastosowana w badaniu klinicznym w leczeniu odpornej na leczenie białaczki TdT-dodatniej (NCT00709215). Rapamycyna jest dobrze znanym induktorem autofagii zależnej od mTOR, zatwierdzonym przez FDA i sprzedawanym pod wieloma markami (sirolimus, ewerolimus i temsirolimus) w leczeniu kilku chorób. Rapamycyna nie została jeszcze przetestowana w badaniach klinicznych pod kątem SCA3, jednak chemiczny chaperone cabaletta (trehaloza), induktor autofagii niezależnej od mTOR, był przedmiotem jednego badania klinicznego dla SCA3 (NCT02147886), ale nie obniżył wyniku SARA.

Zmniejszoną ekspresję białkowej deacetyazy Sirt1 wykazano zarówno w modelach zwierzęcych SCA3, jak i u pacjentów, a resweratrol zależna od dinukleotydu nikotynamidoadeninowego może regulować autofagię poprzez zwiększoną ekspresję Sirt1. Ograniczenie kalorii lub resweratrol przywróciły prawidłową ekspresję SIRT1, wywołały autofagię, zmniejszyły stres oksydacyjny i poprawiły koordynację ruchową w modelu zwierzęcym (Cunha-Santos et al., 2016). Chociaż resweratrol nie był testowany na pacjentach z SCA3, został zastosowany w leczeniu ataksji Friedreicha, choroby autosomalnej recesywnej spowodowanej mutacją w genie frataksyny. Stwierdzono, że podawanie resweratrolu poprawia funkcje neurologiczne, audiologiczne i mowy oraz zmniejsza markery stresu oksydacyjnego, ale nie zmienia poziomu frataksyny (Yiu et al., 2015). Trwają badania kliniczne resweratrolu w ataksji Friedreicha (NCT03933163).

1.6.4. Terapie nakierowane na proteasom

Inną strategią zmniejszania agregacji zmutowanej ATXN3 jest ukierunkowana regulacja w górę szlaku ubikwityny-proteasomu (UPS). Białka proteasomalne zostały znalezione w inkluzjach jądrowych i wykazano, że hamują agregację poliglutaminy (Yaohui Chai et al., 1999). Jako potencjalne induktory usuwania ATXN3 przez UPS zaproponowano leki takie jak inhibitor kinazy rho (H1152), katapol, pueraryna i daidzeina (te ostatnie są aktywnymi składnikami ziół leczniczych, odpowiednio, *Rehmannia glutinosa* i *Pueraria lobata*) (I.-C. Chen et al., 2019; Wang, 2018).

Jednak strategia ta jest skomplikowana przez działanie ATXN3 jako enzymu deubikwitynującego i nie jest jasne czy prawidłowa ataxin-3, czy zmutowana ATXN3 są silniejszymi modulatorami aktywności proteasomalnej. Wykazano, że nadekspresja enzymu deubikwitynującego ubikwitynowo-specyficznej proteazy 14 (USP14) u pacjentów z HD zmniejsza agregację białka poliQ (Hyrskyluoto et al., 2014). W przeciwieństwie do tego,

nadekspresja USP14 hamowała degradację koniugatów ubikwityny-zmutowanej ATXN3 in vitro, podczas gdy niskocząsteczkowy inhibitor USP14 odwracał ten efekt (Lee et al., 2010), co sugeruje możliwą użyteczność wzmocnienia usuwania ATXN 3 poprzez degradację proteasomalną.

Podsumowując, aktywacja systemu proteasomów i autofagia mogą ułatwić degradację zagregowanej ATXN3. Jednakże efekty mogą być komplikowane przez proces deubikwitynacji ATXN3, co wymaga dalszych badań.

1.6.5. Regulacja transkrypcji

Zdolność ATXN3 do wiązania DNA i interakcji z regulatorami transkrypcji wskazuje na rolę ATXN3 w regulacji transkrypcji, najprawdopodobniej jako korepresora transkrypcji (Li i wsp., 2002). Poprzez interakcję z białkiem wiążącym element odpowiedzi cAMP (CREB) (CBP), p300 i czynnikiem związanym z p300/CREBBP (PCAF), ATXN3 hamuje transkrypcję za pośrednictwem CREB (Chai et al., 2001; Li et al., 2002a). ATXN3 reguluje również acetylację histonów, hamując acetylację histonów za pośrednictwem p300 i promując deacetylację histonów poprzez interakcję z deacetylazą histonową 3 (HDAC3) i korepresorem receptora jądrowego 1 (NCOR1) (Bernd O. Evert et al., 2006a; Li et al., 2002b). Specyficzna biochemiczna rola ATXN3 w tych reakcjach jest jednak nieznana. Prawidłowa ATXN3 promuje ekspresję enzymu antyoksydacyjnego SOD2 poprzez interakcję z czynnikiem transkrypcyjnym FOXO4 (Araujo et al., 2011). Ponadto ATXN3 oddziałuje z ludzkim Rad23, białkiem, które może translokować substraty proteolityczne do proteasomu (Doss-Pepe et al., 2003). W przeciwieństwie do tego, zmutowana ATXN3 zmniejsza ekspresję SOD2 i dostarczanie substratów proteolitycznych do proteasomu. Ponadto, odcinki poliQ zmutowanej ATXN3 mogą wiązać TAFII130 i silnie tłumić aktywację transkrypcyjną zależną od CREB (Shimohata et al., 2000). Dlatego też aktywatory transkrypcji, a także promotory degradacji proteasomów mogą służyć jako terapie SCA3. Na przykład, inhibitory HDAC, takie jak maślan sodu, VPA i suberoiloidanilid kwas hydroksamowy, zmniejszają poziomy hipoacetylowanych histonów H3 i H4, zwiększając w ten sposób transkrypcję. Ponadto jako terapie SCA3 proponowano również nikotynamid i dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, które hamują HDAC klasy III.

Jednak prawidłowa ATXN3 może również tłumić transkrypcję przez wiązanie z HDAC3. Ponadto, zwiększoną aktywność HDAC stwierdzono u myszy z nadekspresją normalnej ATXN3, podczas gdy zmniejszoną aktywność HDAC stwierdzono u myszy zmutowaną ATXN3 (Bernd O.

Evert et al., 2006b). W związku z tym nie ma obecnie wystarczającej wiedzy na temat regulacji transkrypcji poprzez szlaki ATXN3/HDAC, aby spekulować na temat potencjalnego wpływu inhibitorów HDAC na procesy związane z SCA3.

1.6.6. Inhibicja stanu zapalnego

U pacjentów z MJD wykryto znaczące podwyższenie poziomu markerów zapalnych TNFSF14, FCGR3B i SELPLG. Co ciekawe, podwyższone poziomy ekspresji NFSF14, FCGR3B, CLC i SLA stwierdzono szczególnie u pacjentów z krótszym czasem trwania choroby (≤ 9 lat), podczas gdy poziomy ekspresji były faktycznie obniżone u pacjentów z dłuższym przebiegiem choroby (>10 lat) (Raposo et al., 2015). Podwyższona eotaksyny i zwiększona rekrutacja eozynofili do miejsc zapalnych została również wykryta u pacjentów bezobjawowych w porównaniu z pacjentami objawowymi (da Silva Carvalho et al., 2016). Można to przypisać większej ekspresji enolazy swoistej dla neuronów, obwodowego markera zaburzeń neuronalnych, u pacjentów z MJD (Tort et al., 2005; Zhou et al., 2011).

Budezonid, poprawiający lokomocję i zmniejszający agregację białek w modelu SCA3 u *C. elegans* został zarejestrowany jako lek do leczenia podtrzymującego astmy, choć wykazywał stosunkowo niską skuteczność w porównaniu z lekami na układ serotonergiczny (Teixeira-Castro et al., 2015). Niemniej jednak nadal możliwe jest, że leki przeciwzapalne będą skuteczne jako terapie wspomagające. Co więcej, ekspresja czynników zapalnych wydaje się zmniejszać wraz z czasem trwania choroby, więc leki przeciwzapalne mogą być szczególnie korzystne we wczesnych stadiach choroby.

Niesteroidowy lek przeciwzapalny ibuprofen (Mendonça et al., 2019) został również zbadany w modelach SCA3/MJD i wykazano, że poprawia neuropatologię i koordynację ruchową, przy jednoczesnej redukcji markerów neurozapalnych, interleukiny (IL)-1 β , czynnika martwicy nowotworu (TNF)- α i fosforylowany IKB- α . Ibuprofen był badany w badaniach klinicznych w AD i stwierdzono, że zmniejsza progresję rytmu delta w łagodnych przypadkach (Babiloni et al., 2009). Co więcej, ibuprofen obniżył poziom ekspresji markerów neutrofilii CD11b i prostaglandyny E2 w fibroblastach skóry pochodzących od rodzinnych i sporadycznych pacjentów z AD (Scali et al., 2002).

Alternatywną strategią przeciwzapalną jest wstrzykiwanie nerwowych komórek macierzystych (Mendonça et al., 2015), ponieważ leczenie to zmniejsza ekspresję prozapalnych markerów IL-1 β i TNF- α oraz zmniejsza utratę komórek Purkinjego.

Tabela 1. Spis badań klinicznych potencjalnych terapii SCA3.

Badanie	Link do strony z badaniem
The Influence of Deep TMS on Cerebellar Signs in Patients With Machado Joseph Disease	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02039206
Astrocytic Markers and the Pre-ataxic Period of SCA3/MJD - BIGPRO Study Astrocytes	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04419974
Natural History of Oculomotor Neurophysiology in Ataxic and Pre-ataxic Carriers of SCA3/MJD	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04229823
Neuropsychiatry and Cognition in SCA3/MJD	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04714307
Clinical Trial Readiness for SCA1 and SCA3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03487367
Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation in SCA3 Patients	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05502432
Weight in Lower Limbs Improves Gait Ataxia of in Machado-Joseph Disease Patients	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02906046
Pilot Study of Safety and Efficacy of Sodium Phenylbutyrate in Spinocerebellar Ataxia Type 3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01096095
Machado-Joseph Disease in Israel	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02175290
Efficacy Of Oral Trehalose In Spinocerebellar Ataxia 3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04399265
Identification of Biomarkers in Spinocerebellar Ataxia 3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03885167
Clinical Effects of Oral Trehalose In Patients With Spinocerebellar Ataxia 3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04426149

A Pharmacokinetics and Safety Study of BIIB132 in Adults With Spinocerebellar Ataxia 3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05160558
Study To Assess Safety, Tolerability and Efficacy of Intravenous Cabaletta in Patients With Machado-Joseph Disease	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT02147886
Safety and Efficacy of Lithium Carbonate in Patients With Spinocerebellar Ataxia Type 3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01096082
Study to Determine the Safety and Tolerability of Varenicline (Chantix®) in Treating Spinocerebellar Ataxia Type 3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00992771
RISCA : Prospective Study of Individuals at Risk for SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01037777
STRIDES - a Clinical Research Study of an Investigational New Drug to Treat Spinocerebellar Ataxia	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05490563
Chinese Medicine WT for Spinocerebellar Ataxia Type 3	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05038306
Treatment of Transcranial Alternating Current Stimulation (tACS) on Cerebellar Ataxia	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05557786
Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy (19#iSCLife®-SA) for Patients With Spinocerebellar Ataxia	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03378414
Dalfampridine and Gait in Spinocerebellar Ataxias	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01811706
Natural History Study of and Genetic Modifiers in Spinocerebellar Ataxias	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01060371
Longitudinal Tracking of Patients Diagnosed With Neurodegenerative Movement Disorders	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05486806
Instrumented Data Exchange for Ataxia Study	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04268147
Open Pilot Trial of BHV-4157	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03408080
Rare Disease Patient Registry & Natural History Study - Coordination of Rare Diseases at Sanford	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT01793168

Study of CAD-1883 for Spinocerebellar Ataxia	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04301284
Troriluzole in Adult Subjects With Spinocerebellar Ataxia	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03701399
Cerebello-Spinal tDCS as Rehabilitative Intervention in Neurodegenerative Ataxia	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT04153110
Rehabilitative Trial With Cerebello-Spinal tDCS in Neurodegenerative Ataxia	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03120013
Measuring Neurological Impairment and Functional Visual Assessment In Spinocerebellar Ataxias	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00654251
NIPD on CFTC for Triplet Repeat Diseases	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03087526
Development of iPS From Donated Somatic Cells of Patients With Neurological Diseases	https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00874783

2. Cel pracy

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było określenie patomechanizmu SCA3 w nowym modelu Ki150 o zaostrozonym fenotypie. Celem było stworzenie nowego modelu SCA3 o zaostrozonym fenotypie jako platformy do badań patogenezy i testowania terapii dla pacjentów SCA3. Określenie patomechanizmu obejmowało stadium presymptomatyczne i symptomatyczne, analizę partnerów białkowych zmutowanej i prawidłowej ATXN3 oraz charakterystykę tych kompleksów i na tej podstawie zaproponowanie skutecznej terapii dla chorych na SCA3 za pomocą związków niskocząsteczkowych.

Cele szczegółowe pracy doktorskiej:

- Zbadanie możliwych zmian w mózgu na poziomie transkrypcyjnym (mRNA) oraz na poziomie splicingu we wczesnych i zaawansowanych stadiach patogenezy. Określenie, czy są czynnikiem bezpośrednio związanym z patogenezą SCA3 w mysim modelu, czy są wynikiem progresji choroby,
- Stworzenie modelu przedklinicznego Ki150 o wydłużonym ciągu CAG w ATXN3 i zaostrozonym fenotypie,
- Poznanie zaostzonych cech patogenezy SCA3 na poziomie tkanki mózgowej modelu Ki150 oraz jego cech motorycznych odzwierciedlających SCA3, jako możliwych biomarkerów przedklinicznych,
- Zbadanie szerokich zmian w interakcjach białkowych w obecności długiego ciągu poliQ w zmutowanej ATXN3 w Ki150 w porównaniu do myszy z genem kontrolnym Ki21. Wskazanie interaktorów zaangażowanych w grupy procesów komórkowych metodami *in silico*,
- Zaproponowanie terapii z użyciem związków niskocząsteczkowych na podstawie zidentyfikowanych interakcji zmutowanej i niezmutowanej ATXN3.

3. Materiały i metody

3.1. Ważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne

- Akrylamid/Bisakrylamid w stosunku 29:1 (Bioshop)
- Bromek etydyny (MERCK)
- BSA (surowicza albumina wołowa, ang. *bovine serum albumin*) (Cell signaling Technology)
- Cytrynian sodu (Chempur)
- Chlorek sodu (Chempur)
- Chloroform cz.d.a. (POCh)
- EDTA (POCh)
- Etanol (Millipore)
- FBS (płodowa surowica bydlęca, ang. *fetal bovine serum*) (EurX)
- Izopropanol cz.d.a. (POCh)
- Kwas borowy (Chempur)
- Kwas octowy (Chempur)
- Medium hodowlane DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco)
- Mieszanka dNTP o całkowitym stężeniu 40 mM (EurX)
- Octan sodu (POCh)
- Paraformaldehyd (MERCK)
- SDS (Bioshop)
- Tris (MERCK)
- TEMED (Bioshop)
- TRI reagent (MERCK)
- Triton X-100 (Bioshop)
- Roztwór penicyliny i streptomycyny 100x stężony (penicylina 10,000 U/ml, streptomycyna 10 mg/ml) (MERCK)
- Roztwór zamykający Florosheld (MERCK)
- Substrat dla peroksydazy chrzanowej SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific)

3.2. Enzymy

- Odwrotna transkryptaza Maxima H Minus (Thermo Fisher Scientific)
- Polimeraza DNA GoTaq Flexi 5 U/ μ l (Promega)
- Trypsyna-EDTA 10 x stężona (MERCK)

3.3. Przeciwciała

Tabela 2. Lista przeciwciał użytych w pracy doktorskiej.

Przeciwciała I-rzędowe			
Nazwa	Gospodarz	Użyte rozcieńczenie	Producent
anty-ataksyna-3	królik	1:2000 (5% mleko)	Proteintech
Anty-pS6 (phospho S235 + S236)	królik	1:2000 (5% BSA)	abcam
Cd11b	mysz	1:50 (4% surowica kozia)	DSHB
Fxr2	mysz	1:50 (4% surowica kozia)	DSHB
Fmr1	mysz	1:20 (4% surowica kozia)	DSHB
Pabpc1	królik	1:100 (4% surowica kozia)	Proteintech
Lamin B	mysz	1:2000 (5% Mleko)	Proteintech
anty-GAPDH	mysz	1:10 000 (5% mleko)	Milipore
Przeciwciała II-rzędowe			
anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową	koza	1:2000 (5% mleko)	Jackson ImmunoResearch
anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową	koza	1:2000 (5% mleko)	Jackson ImmunoResearch

anty-królicze sprzężone z fluoroforem Alexa594	koza	1:1000 (4% surowica kozia)	Jackson ImmunoResearch
anty-królicze sprzężone z fluoroforem Alexa488	koza	1:1000 (4% surowica kozia)	Jackson ImmunoResearch
anty-mysie sprzężone z fluoroforem Alexa594	koza	1:1000 (4% surowica kozia)	Jackson ImmunoResearch
anty-mysie sprzężone z fluoroforem Alexa488	koza	1:1000 (4% surowica kozia)	Jackson ImmunoResearch

3.4. Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji DNA z tkanki EZ-10 Spin Column Animal Genomic DNA Mini-Preps Kit (BioBasic)
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji Maxima H Minus RT (Thermo Fisher Scientific)
- Zestaw do reakcji PCR GoTaq® G2 Hot Start Polymerase, 500u (Promega)
- Zestaw do reakcji qPCR 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne)
- Zestaw do oznaczania stężenia białka metodą BCA - Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible (Thermo Fisher Scientific)

3.5. Roztwory i bufory

Bufor 1x TBE:

100 mM Tris-HCl, pH 8,3

100 mM kwas borowy

1 mM EDTA

Bufor obciążający do elektroforezy w żelu agarozowym:

40 mM Tris-HCl, pH 7,5

12,5% Glicerol

0,03 % błękit bromofenolowy

Bufor Laemli do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym, 10x stężony:

Tris 250 mM

Glicyna 1,92 M

SDS 1%

Bufor do elektrotransferu, 1x stężony:

Tris 25 mM

Glicyna 192 mM

Metanol 20%

Bufor PB do izolacji białek, 1x stężony:

Tris 60 mM

SDS 2%

Sacharoza 10%

PMSF 2 mM

TBS, 10x stężony, pH 7.4:

Tris 0,2 M

NaCl 1,5 M

TBS-T, 1x stężony, pH 7.4:

Tris 20 mM

NaCl 150 mM

Tween 20 0,1%

3.6. Bufory dostępne komercyjnie

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

3.7. Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych i białek

- Marker długości DNA - 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)
- Marker wielkości białek - Perfect Tricolor Protein Ladder (EURx)

3.8. Żele

- Żele agarozowe do analizy produktów PCR
- 2% agarozą w buforze TBE z bromkiem etydyny (0,5 µg/ml)

Żel poliakrylamidowy denaturujący do elektroforezy białek:

- Żel rozdzielający:
 - Akrylamid/Bisakrylamid 10%
 - Tris pH 8.8 0,375 M
 - SDS 0,1%
 - APS 0,1%
 - TEMED 0,4%
- Żel zagęszczający:
 - Akrylamid/Bisakrylamid 5%
 - Tris pH 6.8 0,125 M
 - SDS 0,1%
 - APS 0,1%
 - TEMED 0,1%

3.9. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy zostały zsyntetyzowane w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (Warszawa) oraz w firmie Sigma.

Tabela 3. Oligonukleotydy użyte w niniejszej pracy.

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Mysz		
Slc38a6	GAAGATCTGGGACTCTTCGCTT	TTTCCCCGTGACGTCAACTC
Ttc8	ATGCCACCTTCCACTTGACTG	TTCTCACACCTTTGACAGCC
Prdx3	GTGGTTTGGGCCACATGAAC	GGGACTCTGGTGTCCAGTTG
Ccdc88c	GCCCAGGGGATCTAAAACCA	TCCGAGGATGGCTCACAGA
Ide	AAAGACACTTACCAAGGACGAT	TCCCTGGCAAGAACATGGAC
Btaf1	TTCGACATGGGGCAGGTA	GCTGTCTCCATTTTACCACC
Btaf1	TTTAGTCCCACGTGTCTGGC	TCCAGAATTTCTGGCTGCTT
Ablim1	CGCTTCCCAGGGTGAAAGAT	CCCTCTACCTCCCCATCAA
Serpina3n	GGGATGATCAAGGAACTGGTC	CGTGTCAAGAGGGTCAAAGG
Idh1	AGGAGGTTCTGTGGTGGAGA	ACCTGGTCATTGGTGGCATC
Atp2b1	TAGAGCAATGGCTGTGGTCG	TGGGTTCCATGACCAGCTTC
Akr1b1	AGAGCATGGTGAAAGGAGCC	GGTATCACGTTCCCTGAGGC
Ca2	TAAAGCTGCGTCCAAGAGCA	CCATCAGATGAGCCCCAGTG
Ppp2r1a	GGCCTGAGTATGTGCACTGT	GCCTTGTCTCGCACTACTGT
Plp1	GGCTAGGACATCCCGACAAG	TACATTCTGGCATCAGCGCA
Cox7a2	GTGGGTAACAACCGAGCCAA	TCGTGAAGTGGTGTCTGATGG
Ndufa9	CTCGAGCAATAGCTCAGGCA	AGACGGCCGTATGATGATGG
Nefh	CGCCCTCAAGTGCAGC	CGCCGGTACTCAGTTATCTCC
Omg	CCAGAAACCCTTCCGACTCC	GCATAAGATGCCAGGCGTGA
Srsf2	TCTGCCCGAAGATCCAAGTC	GCTTGCCGATTCATCATTTTCT
Psmc4	AGGAGGCAAGATGGTGTGG	GTGTGATCAGGCCACGTTA
Qdpr	ACCCTGGATACCCCGATGAA	GAGTTTGGCCGTTTGTCTCC
Reln	CGTCCTAGTAAGCACTCGCA	TATCGCCTAAGCGACCTTCG
Sst	GACCCAGACTCCGTCAGTT	GGTTCGAGTTGGCAGACCTC
Npy	GACCCTCGCTCTATCTCTGC	GGGCTGGATCTCTTGCCATA
Cd68	GGGGCTCTTGGGAACTACAC	ATGCCCAAGCCTTTCTCTCC
Cldn11	ACCTGCCGAAAAATGGACGA	ACGTAGCCTGGAAGGATGAGG
Mag	TCGCCTTTGCCATCCTGATT	GTTGTCTCCCCCTGAGAAGC
Plekhb1	AAATTCCACCCCGGTACGC	AAGGTGGCCCATAGTAGCTG

Syp	TTTGCCATCTTCGCCTTTGC	TAGTGCCCCCTTTAACGCAG
Pdgfra	GCACCAAGTCAGGTCCCATT	TGTCCAGGTCTTTCTTCGGC
Olig1	CCGCCCCAGATGTAATATGC	AACCCACCAGCTCATAACAGC
Olig2	GTACCTGGGGGCTTGACAAA	AACAAAGAGCTTCGCATCGC
Mash1	CTCCTGGGAATGGACTTTGGA	GTGAAGGTGCCCTGTAGGT
Pea15a	CTCAAGTCAGCCTGCAAGGA	CAGCACACGGGTTCTGTAGT
Pgk1	ATGTCGCTTTCCAACAAGCTG	GCTCCATTGTCCAAGCAGAAT
Tfrc	GCCCCAGAAGATATGTCCGAA	TCATGAGGGAAATCAATGATCGTA
Actin	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT	ATGGAGGGGAATACAGCCC
Człowiek		
Olig1	GTCGCAGAGAGTTTTTCGCTC	ACTGTGAGACGCCTGGTTAC
Olig2	TCCTCCCTGTCTCTCGTTGA	AGATGAGTCGGTGGGGTAGT
Qdpr	ACAGACTCGTTCACTGAGCA	GATGGCTGGAGATGGTTCGAT
Omg	AGCTCACAGCAACACAATGC	ATCAAAGCCGTGGTGTTCGTC
Mag	CAACCCTCCCGTCCTGTTC	GGTAGAAACCTCTTTGGACTCGT
Cd68	CAGGGAATGACTGTCCTCACAA	AGTGCTCTCTGTAACCGTGGG
Cldn11	CTTGGCACTGTAGCATGTGGA	GCACAAAGCAGGCAGTCAAC
Gad	ATTGCACCAGTGTTTGTCTC	CTTGTAGCGAGCAGCCATGA
Ca2	GCCAAGTATGACCCTTCCCT	TGTAAGTGCCATCCAGGGGT
Srsf2	GGAATCCAAATCCAGGTCGC	CCGAGCAGCACTCCTAATGAT
Actin	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

3.10. Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe

- Aparat do elektroforezy pionowej Mini-Protean®Tetra (Bio-Rad)
- Aparat do transferu mokrego Mini Trans-Blot® (Bio-Rad)
- Inkubator do komórek eukariotycznych
- Komora laminarna do pracy z komórkami eukariotycznymi
- Membrana nitrocelulozowa do analiz typu Western Amersham™Protran™0,45 µm NC
- Mikroskop konfokalny Leica TCS SP5 (Leica Microsystems)
- Termocykler do qPCR CFX Connect™ Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)
- System dokumentacji żeli (Bio-Rad)
- Zasilacz do elektroforezy PowerPac™Basic (Bio-Rad)

3.11. Myszy

3.11.1. Hodowla

Myszy Ki91, Ki150 oraz Ki21 na tle genetycznym C57BL/6 oraz myszy C57BL/6 były hodowane w zwierzętarni Instytutu Genetyki Człowieka (IGCz) oraz Centrum Zaawansowanych Technologii (CZT). Hodowle myszy były prowadzone w cyklu 12 godzin światła, 12 godzin ciemności, w klatkach indywidualnie wentylowanych ze stałym dostępem do wody oraz standardowej paszy dla gryzoni. Badania były prowadzone zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej w zakresie prowadzenia, prezentacji i oceny wyników badań naukowych oraz bezpieczeństwa i higieny pracy. W Instytucie, zgodnie z wymogami ustawy o organizmach genetycznie zmodyfikowanych oraz niektórych innych ustaw z dnia 15 stycznia 2015 r., utworzono Zakłady Inżynierii Genetycznej, w których eksperymenty GMM i GMO w kategorii I i II (były prowadzone wg światowej nomenklatury na poziomach bezpieczeństwa BSL1 i BSL2). W pracy doktorskiej wykorzystane zostały genetycznie zmodyfikowane modele myszy typu knock-in SCA3, określane jako Ki150 i Ki21. Myszy nazwano według liczby powtórzeń CAG w humanizowanym *locus* ATXN3. *Locus* ekspresuje genetycznie zmodyfikowane białko ATXN3. Szczepy myszy wytworzono w IBCH PAN. Tło genetyczne to powszechnie stosowany szczep myszy C57BL6. Zwierzęta były znajdowały się w zwierzętarni CZT UAM Poznań. Numery zgód komisji bioetycznej: nr 63/2016 i 56/2018.

3.11.1. Tkanki

Mózgi były pobierane i dzielone na regiony mózgu z pomocą precyzyjnych operacji pod mikroskopem lub używane w całości. Tkanki przed zamrożeniem były przemywane z pomocą PBS i przechowywane w -80st C do czasu analiz. Tkanki z biopsja końcówki ogona były pobierane w celu ustalenia genotypu zwierząt.

3.12. Hodowle komórkowe

3.12.1. Hodowle neuronalne od pacjentów z SCA3 iPSC

Hodowlę i różnicowanie iPSC od pacjentów z SCA3 przeprowadzono zgodnie z opisem (Koch et al., 2009). Wybrane rozety neuronalne hodowano w zawieszynie przez 2 dni w pożywce składającej się z DMEM/F12, 2 mM l-glutaminy, 1,6 g l-1 glukozy, 0,1 mg ml-1 penicyliny/streptomycyny i suplementu N2 (1:100; Invitrogen), a następnie zdysocjowano za pomocą trypsyny, wysiano na płytki pokryte poli-l-ornityną/lamininą i namnażano w pożywce

N2 uzupełnionej o B27 (1 μ l ml⁻¹, Invitrogen), 10 ng ml⁻¹ FGF2 i 10 ng ml⁻¹ EGF (R&D Systems). Różnicowanie neuronów indukowano przez usunięcie czynników wzrostu FGF2 i EGF z pożywki i hodowanie komórek w pożywce Neurobasal uzupełnionej o B27 (1:50, Invitrogen) i DMEM/F12 uzupełnionej o N2 (1:100) zmieszanych w stosunku 1:1 stosunek; Do pożywek różnicujących dodano 300 ng ml⁻¹ cAMP. Po 6 tygodniach zróżnicowane komórki zebrano do roztworu TRIzol.

3.12.2. Hodowle fibroblastów od pacjentów SCA3

Fibroblasty od pacjenta SCA3 (GM06153, 18/69 CAG w genie *ATXN3* uzyskano z repozytoriów komórek Coriell (Camden, NJ, USA) i hodowano na minimalnej pożywce podstawowej (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) uzupełnionej o 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) (Sigma-Aldrich) i antybiotyki (Sigma-Aldrich).

3.13. Izolacja RNA

Całkowity RNA z tkanki mózgowej oraz hodowli komórek neuronalnych izolowano metodą Chomczyńskiego-Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) z wykorzystaniem TRIzolu. Jakość izolowanego RNA sprawdzono po wykonaniu enzymatycznej degradacji DNA poprzez rozdział w 1% żelu agarozowym.

3.14. Synteza cDNA

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono za pomocą losowych starterów i odwrotnej transkryptazy SuperScript II (Invitrogen). W tym celu, RNA (500 ng) zmieszano z 1x First-Strand Buffer i losowymi starterami uzyskując stężenia końcowe 0,4 μ M oraz wodą do końcowej objętości 5 μ l i inkubowano 3 min w 90°C, następnie 10 min w 55°C i umieszczono na lodzie. Następnie, dodano 10 mM DTT, 2,5 mM dNTP, 1x First-Strand Buffer, inhibitor RNaz 10 U rRNasin, 50 U odwrotnej transkryptazy SuperScript II oraz wody do końcowej objętości 20 μ l i inkubowano przez 50 min w 55°C. Reakcję zatrzymywano przez ogrzewanie w temperaturze 70°C przez 15 min, a powstałe cDNA wykorzystano w kolejnym etapie.

3.15. Analiza RNAseq

NGS QC Toolkit (v 2.2.3) (Patel and Jain, 2012) został użyty do wygenerowania metryk jakości do oceny plików wejściowych fastq. Pliki Fastq zostały następnie dopasowane do genomu

referencyjnego GRCm38.91 przy użyciu oprogramowania STAR (v 2.5.3a) (Dobin et al., 2013) z parametrami sugerowanymi przez oprogramowanie QoRTs (v 1.3.0) (Hartley and Mullikin, 2015). Parametry są używane domyślnie do szacowania liczby genów i liczby identyfikacji egzonów. Dane zostały przeanalizowane przy użyciu trzech różnych podejść eksperymentalnych, które obejmowały dopasowanie/oznaczenie ilościowe transkryptów przez Star/Deseq i HISAT/StringTie/Ballgown (Kim et al., 2015; Pertea et al., 2016). W skrócie, różnicową ekspresję genów obliczono za pomocą oprogramowania DESeq2 (v 1.14.1) (Love et al., 2014). Do sprawdzenia wyników wykorzystano drugi zestaw oprogramowania, HISAT2 (v 2.0.5) → StringTie (v 1.3.1c) → Ballgown (v 2.6.0) (Kim et al., 2015; Pertea et al., 2016, 2015). Wyniki z programu HISAT2 były zgodne z analizą pierwotną i nie są pokazane w sekcji wyników. Dodatkowo analiza JunctionSeq została zastosowana w identyfikacji zmienionych wariantów splicingu (Hartley and Mullikin, 2016).

3.16. Standardowy PCR

Do przeprowadzenia reakcji PCR użyto GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, USA). Warunki reakcji PCR były następujące: 3 min w 94°C, 12 × (35 s w 94°C, [45 s w 64°C - 0,5°C/cykl], 45 s w 72°C), 25 × (35 s w 94°C, 30 s w 58°C, 45 s w 72°C) i 2 min w 72°C. Produkty reakcji rozdzielono na 1,5% żelach agarozowych w buforze TBE i wybarwiono bromkiem etydydy.

3.17. Genotypowanie myszy

DNA przygotowano z biopsji koniuszka ogona przy użyciu zestawu Spin Column Genomic DNA Kit (Bio Basic Inc., Markham, Kanada). Genotypy określono przez przeprowadzenie multipleksowej reakcji PCR. Zastosowano następujący zestaw czterech starterów: forward GGACCTATCAGGACAGAGTTCACATCCA i reverse CACATTACCAAAGTGGACCCTATGCTGT, celujący w humanizowany region genu *ATXN3* oraz forward TCCTCTCTAGGATGGCTTTG i reverse TAAACGCCCTACCTATTTG, celujący w endogeny region genu *Atxn3*.

Liczbę powtórzeń CAG określono przeprowadzając PCR przy użyciu polimerazy DNA GoTaq Flexi z wyznakowanym starterem forward 6-FAM GGAAGAGACGAGAAGCCTAC i starterem reverse TCACCTAGATCACTCCCAAGT; te startery flankują region powtórzeń CAG w humanizowanym genie *ATXN3*. Warunki reakcji PCR były następujące: 5 min w 94°C, 30 ×

(20 s w 94°C, 10 s w 60°C, 30 s w 72°C) i 7 min w 72°C. Rozmiary fragmentów PCR określono przy użyciu analizatora ABI 3130xl i oprogramowania Peak Scanner 1.0 (Life Technologies, Carlsbad, USA). Ponieważ obecność powtórzeń CAG spowalnia migrację elektroforetyczną fragmentów PCR, sporządzono krzywą kalibracyjną złożoną ze zweryfikowanych pod względem sekwencji fragmentów z 21, 69, 81, 91 i 97 CAG i wykorzystano ją do oceny dokładnej liczby powtórzeń CAG w analizowanych próbkach.

3.18. PCR w czasie rzeczywistym

1 µl cDNA wykorzystano jako matrycę do reakcji PCR w czasie rzeczywistym ze specyficznymi starterami (stężenia końcowe 1 µM) i gotową mieszaniną reakcyjną zawierającą polimerazę DNA 5x HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) zgodnie z protokołem producenta. Całkowita objętość reakcji wynosiła 10 µl. Dla każdej badanej próbki reakcję przeprowadzono w trzech powtórzeniach w aparacie CFX96™ Real-Time System (Bio Rad) wg następującego programu: 95°C przez 15 min, 39 cykli 95°C przez 20 sek, 60°C przez 1 min. Po każdym cyklu wykonywany był odczyt fluorescencji z płytki. Analiza półilościowa pozwoliła na porównanie ekspresji poszczególnych genów.

3.19. Barwienia immunofluorescencyjne

Zwierzęta znieczulono ogólnie i poddano perfuzji przezsercowej solą fizjologiczną, a następnie 4% paraformaldehydem w PBS. Mózgi usunięto i dalej utrwalono w 4% paraformaldehydem w PBS przez 48 godzin. Następnie utrwalone mózgi poddano odwodnieniu szeregiem roztworów sacharozy w PBS (10–20–30%) przez 72 godziny. Mózg pocięto na 20µm sagitalne skrawki w temperaturze -20°C, które zebrano na szkiełka SuperFrost Plus (Thermo Fisher Scientific). Procedurę odkrywania epitopów indukowaną ciepłem (ang. *Heat-Induced Epitope Retrieval* (HIER)) zastosowano przez inkubację skrawków w buforze cytrynianowym (pH 9,0) przez 30 min w 60°C. Skrawki zablokowano przez inkubację w 4% normalnej surowicy koziej (ang. *normal goat serum, NGS*) w TBS przez 1 godzinę. Do barwienia immunofluorescencyjnego, skrawki inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi, a następnie z przeciwciałem II-go rzędowym wykrywającym przeciwciała klasy IgG gatunku, w którym wytworzono przeciwciało pierwszorzędowe (mysz lub królik) wyznakowanym AlexaFluor488 (1:400; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Wielka Brytania). Następnie skrawki wybarwiono barwnikiem

jądrowym Hoechst 33342 (Sigma) w stosunku 1:1000 i zatopiono w medium zatapiającym Fluoroshield (Sigma). Fluorescencyjne obrazy konfokalne uzyskano przy użyciu stałych parametrów wzbudzenia i detekcji przy użyciu TCS SP5 II (Leica Microsystems, Polska) oraz Opera LX (PerkinElmer).

3.20. Analiza poziomu białek metodą Western blot

Próbki mózgdzku i kory pobrano od czterech myszy Ki91 i czterech myszy C57BL w tym samym wieku. Tkanki homogenizowano w buforze zawierającym 60 mM TRIS-base, 2% SDS, 10% sacharozę i 2 mM PMSF przy użyciu homogenizatora Bioprep-6 (Allsheng, Chiny), a następnie poddano działaniu ultradźwięków przez 3 minuty, które powtórzono trzy razy. Stężenie białka oszacowano za pomocą zestawu do oznaczania białek Pierce BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) zgodnie z instrukcjami producenta. Do każdej analizy 25 µg białka całkowitego rozcieńczono w buforze ładującym zawierającym 2-merkaptoetanol i gotowano przez 5 min. Białka rozdzielono metodą elektroforezy w żelu SDS-poliakrylamidowym (5% żel zagęszczający/12 lub 10% żel rozdzielający), przeniesiono na nitrocelulozę i wybarwiono roztworem Ponceau S. Bloty zablokowano 5% odtłuszczonym mlekiem w TBS/0,05% Tween 20 przez 1 godz. w RT, a następnie inkubowano przez 24 godz. w 4°C z następującymi przeciwciałami pierwszorzędowymi. Bloty sondowano odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym z HRP (przeciwnkróliczym lub przeciwmysim, 1:2000; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Wielka Brytania). Reakcję immunologiczną wykrywano stosując substrat ECL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.21. Frakcjonowanie mysich mózgów

Całe mózgi myszy Ki21 i Ki91 zebrano i natychmiast zamrożono w ciekłym azocie. Następnie mózgi homogenizowano przy użyciu stalowych kulek w homogenizatorze Allshend Bioprep-6 w buforze PBS EDTA 5mM uzupełnionym Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Theromo Fisher Scientific). Próbki homogenizowano 2x 30s 3,5k RPM, pomiędzy rundami homogenizacji próbki umieszczano na lodzie. Po homogenizacji próbki odwirowano w celu zebrania supernatantów. Klarowne supernatanty naniesiono na żywicę jonowymienną CMM, następnie wpływ naniesiono na żywicę DEA i zebrano przesącz. Zebrany przesącz zatężono do ~2,5 ml i nałożono na kolumnę HiLoad Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) połączoną z systemem AKTA FPLC (Amersham Biosciences). Chromatografię *size exclusion* prowadzono jako końcowy

etap oczyszczania w buforze złożonym z PBS EDTA 50uM, uzyskując 2mL w każdej frakcji białkowej.

3.22. Spektrometria mas wybranych frakcji białkowych

Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu nanoLC Dionex UltiMate 3000 RSLC połączonego ze spektrometrem mas Q Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Peptydy pochodzące z trawienia w roztworze rozdzielano na kolumnie Acclaim PepMap RSLC nanoViper C18 (75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$, granulacja 2 μm) przy użyciu gradientu acetonitrylu (od 4 do 60%, w 0,1% kwasie mrówkowym) w temperaturze 30°C i szybkość przepływu 300 nl/min (przez 230 min). Spektrometr pracował w zależnym od danych trybie MS/MS (tandemowa spektrometria masowa) ze skanami przeglądowymi uzyskanymi w rozdzielczości 70 000 przy m/z 200 w trybie MS i 17 500 przy m/z 200 w trybie MS2. Widma rejestrowano w zakresie skanowania 300–2000 m/z w trybie jonów dodatnich. Fragmentację jonów dysocjacji kolizyjnej o wyższej energii (HCD) przeprowadzono przy znormalizowanych energiach kolizji ustawionych na 25. Identyfikację białek przeprowadzono przy użyciu bazy danych myszy Swiss-Prot z tolerancją dokładności 10 ppm dla mas peptydów i 0,08 Da dla mas jonów fragmentowanych. Wszystkie surowe dane uzyskane dla każdego zestawu danych zostały zaimportowane do wersji MaxQuant 1.5.3.30 w celu identyfikacji białek i kwantyfikacji. Białko uznawano za pozytywnie zidentyfikowane, jeśli co najmniej dwa peptydy na białko zostały znalezione przez wyszukiwarkę Andromeda, a wynik peptydu osiągnął próg istotności FDR = 0,01. Uzyskane dane zostały wyeksportowane do oprogramowania Perseus ver. 1.5.3.2 (część pakietu MaxQuant). Dane liczbowe zostały przekształcone w skalę logarytmiczną, a każda próbka została opisana przynależnością do grupy. Białka zidentyfikowane tylko na podstawie lokalizacji, odwrotnych trafień w bazie danych i zanieczyszczeń zostały usunięte z wyników. Następnie dane zostały przefiltrowane na podstawie prawidłowych wartości dla białek. Białka, które zawierały prawidłowe wartości w 75% próbek w co najmniej jednej grupie (próg włączenia: 3 lub 4 wartości dla kontroli i 3 lub 4 wartości dla myszy Ki91) zostały uwzględnione jako ważne trafienia. Dodatkowo do analizy uzupełniającej wybraliśmy białka, które dawały prawidłowe wartości tylko w grupie kontrolnej lub tylko w grupie myszy Ki91 SCA3/MJD (włączenie 4 wartości). Przed analizą statystyczną przeprowadzono normalizację danych, odejmując medianę od każdej wartości z rzędu. Test t dla dwóch próbek przeprowadzono na analizowanych danych próbki, przy czym wartość $p < 0,05$ uznano za istotną, a białka

różnicujące znormalizowano przy użyciu algorytmu Z-score dla hierarchicznego grupowania danych.

3.23. Koimmunoprecypitacja

Poświęcone zwierzęta dekapitowano, następnie pozyskano korę mózgową i mózdzek z mózgu i szybko zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C . Immunoprecypitacje przeprowadzono z pierwotnym mysim przeciwciałem anti- ATXN3 1H9 lub kontrolą negatywną IgG (AC011; Santa Cruz Biotechnology, sc2025) i zestawem Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kit (14321D, Thermo Fisher Scientific). Do przyłączenia przeciwciał przeprowadzonego zgodnie z protokołem producenta zastosowano kulki 6 μg przeciwciała /mg kulek. W skrócie, Dynabeads przemyto w buforze C1, a następnie inkubowano przez noc w roztworach C1, C2 i przeciwciałach w 37°C . Następnego dnia przeciwciała sprzężone z kulkami przemyto w buforach HB, LB i SB. Po przemyciu kulki przechowywano do użycia w buforze SB w lodówce. Do lizy użyty bufor do lizy z zestawu (IP) zmodyfikowanego o 100mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 1mM DTT i 40 μM PMSF. Procedurę spoczynkową przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta, kulki inkubowano z lizatami przez 30 min. w temp. 4°C do wymywania kompleksów białkowych zastosowano HPH EB (0,5M NH_4OH , 0,5mM EDTA). Po elucji próbki liofilizowano przez noc w wirówce typu *speed vac*. Następnie próbki były użyte w celu przeprowadzenia spektrometrii masowej.

3.24. Spektrometria masowa

Liofilizowane próbki rozpuszczono w 100 mM wodorowęglanie sodu, a następnie 5 μg białka z każdej próbki poddano dalszej obróbce. Objętość zawierającą 5 μg białka inkubowano w DTT przez 5 min w 95° , następnie umieszczano na lodzie, a następnie acylowano w IAA przez 20 min w ciemności w temperaturze pokojowej, następnie próbki trawiono trypsyną przez noc w 37°C w łaźni wodnej. Analizę proteomu przeprowadzono za pomocą systemu Dionex UltiMate 3000 RSLC nanoLC podłączonego do spektrometru masowego Q Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Peptydy pochodzące z trawienia w roztworze rozdzielono na kolumnie Acclaim PepMap RSLC nanoViper C18 z odwróconą fazą (75 $\mu\text{m} \times 25$ cm, granulacja 2 μm) przy użyciu gradientu acetonitrylu (od 4 do 60%, w 0,1% kwasie mrówkowym) w 30°C i natężenie przepływu 300nL/min (przez 230 min). Spektrometr pracował w trybie MS/MS zależnym od danych ze skanami pomiarowymi uzyskanymi

z rozdzielczością 70 000 przy m/z 200 w trybie MS i 17 500 przy m/z 200 w trybie MS2. Widma rejestrowano w zakresie skanowania 300–2000 m/z w trybie jonów dodatnich. Fragmentację jonów w wyniku dysocjacji zderzeniowej o wyższej energii (ang. *Higher energy collisional dissociation*, HCD) przeprowadzono ze znormalizowanymi energiami kolizji ustawionymi na 25. Baza danych myszy Swiss-Prot została wykorzystana do identyfikacji białek z precyzyjną tolerancją ustawioną na 10 ppm dla mas peptydów i 0,08 Da dla mas jonów fragmentów. Surowe dane uzyskane dla każdego zestawu danych zostały przetworzone przez wersję MaxQuant 1.5.3.30 w celu identyfikacji i oceny ilościowej białka. Białko uznano za pomyślnie zidentyfikowane, jeśli oprogramowanie Andromeda znalazła co najmniej dwa peptydy na białko, a wynik peptydu osiągnął próg istotności FDR=0,01.

3.25. Badania behawioralne

3.25.1. Analiza Rotarod

Protokół rotarod został zaadaptowany z opisanego w publikacji (Hockly et al., 2003). Myszy umieszczono na antypoślizgowym pręcie (model 47600, Ugo Basile, Włochy), który przyspieszał od 4 do 40 obr./min przez 500 sekund. Myszy testowano przez 4 kolejne dni, w 4 próbach dziennie, z 20-minutowym okresem odpoczynku pomiędzy próbami. Ostateczna ocena sprawności rotarod dla każdej myszy była średnią z 4 kolejnych dni.

3.25.2. Test prętów statycznych

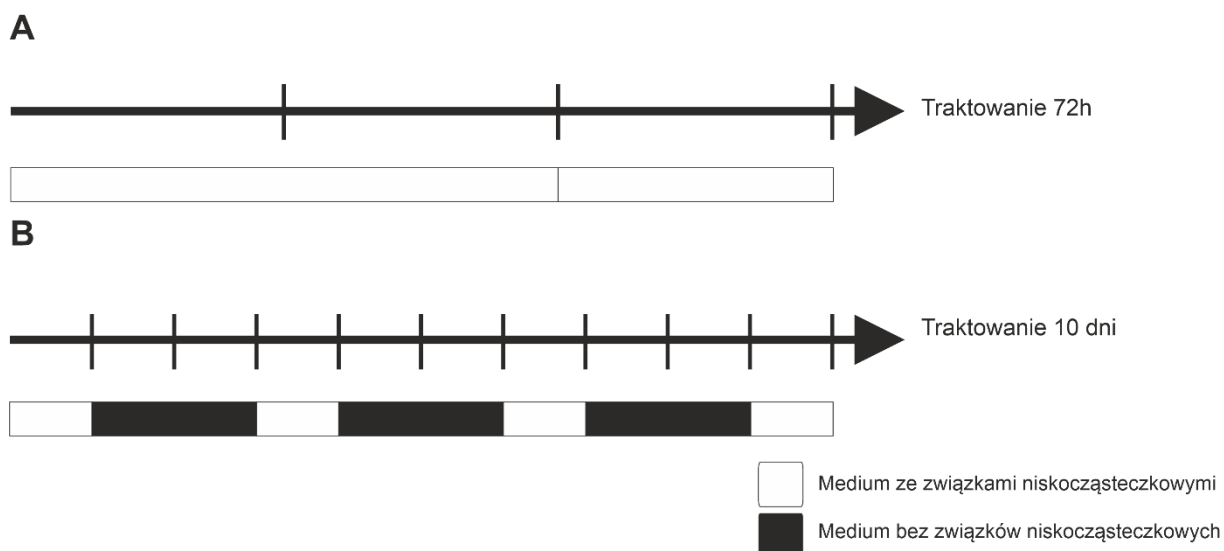
Konfiguracja i protokół testu prętów statycznych został zaadaptowany z testu Deacona (Deacon, 2013) z modyfikacjami. W skrócie, 5 drewnianych prętów o długości 60 cm o średnicach 35 mm, 28 mm, 21 mm, 17 mm i 9 mm, reprezentujących różne stopnie trudności, zostało przymocowanych do specjalnej półki umieszczonej 60 cm nad podłogą, która została zabezpieczona miękką pianką, aby uniknąć zranienia myszy. Półka została wyścielona ściółką, aby zachęcić myszy do pójścia w stronę półki. Odnotowywano czas do odwrócenia się myszy i czas przejścia po pręcie. Myszy otrzymywały maksymalny wynik 30 s, jeśli nie zawróciły, spadły z pręta, odwróciły się do góry nogami na pręcie lub nie wykonały w tym czasie przejścia, lub jakiegokolwiek kombinacji tych zachowań. Myszy poddano jednodniowemu treningowi, a następnie testowano przez 3 kolejne dni z 2-3 minutową przerwą między kolejnymi prętami o malejącej średnicy.

3.25.3. Test punktowy

Przeprowadziliśmy również testy punktowe przeznaczone do oceny fenotypu ataksji w modelach mysich (Guyenet et al., 2010), oraz test drutowy do oceny siły mięśni. Wszystkie myszy były ważone podczas każdej sesji testowej. Wykresy i statystyki wykonano na oprogramowaniu PrismVR (San Diego, CA, Stany Zjednoczone), stosując ANOVA z testem post-hoc Bonferroniego.

3.26. Traktowanie hodowli fibroblastów SCA3 związkami niskocząsteczkowymi

Ryc. 2A i 2B przedstawiają schematy zastosowanych sposobów podawania związków niskocząsteczkowych, które odzwierciedlają możliwy schemat podania u pacjentów z SCA3. Pierwszy sposób (Ryc. 2A) polegał na ciągłej ekspozycji komórek na związki niskocząsteczkowe. Badane związki podano w danym stężeniu do medium hodowlanego o obniżonej ilości FBS (2%). Po upływie 48 godzin wymieniono medium na świeże zawierające związki niskocząsteczkowe w danym stężeniu po upływie 48 godzin. Po kolejnych 24 godzinach komórki były lizowane. Sposób ten stanowił odpowiednik stałego dostarczania terapeutyków u pacjentów przy czym potencjalne podawanie pacjentom nie jest limitowane poniżej ani powyżej 72h. Drugi sposób (Ryc. 2B) polegał na podawaniu związków niskocząsteczkowych naprzemiennie z medium nie zawierającym związków niskocząsteczkowych. Komórki były eksponowane na działanie substancji terapeutycznych przez 24 godziny, a następnie były hodowane przez 2 dni w medium bez związków niskocząsteczkowych. Po 10 dniach komórki były lizowane.



Rycina 2. Schemat traktowania kultur fibroblastów SCA3 związkami niskocząsteczkowymi.

3.27. Analizy statystyczne

Analizy statystyczne dotyczące qPCR, western blot, testów behawioralnych przeprowadzono z użyciem programu Graphpad Prism 8.

Proteomiczne analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem programu Perseus 1.6.15.0

3.28. Programy komputerowe i bazy danych

- ImageLab – analiza żeli agarozowych i western blot (Biorad)
- ImageJ- analiza zdjęć mikroskopowych (Fiji)
- LasX- wykonywanie fotografii mikroskopowych (Leica)
- Harmony - wykonywanie fotografii mikroskopowych (Parkin Elmer)
- Ensemble – baza danych sekwencji genomowych
<https://www.ensembl.org/index.html>
- primer-blast – projektowanie starterów do PCR
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- Baza danych sekwencjonowania pojedynczych komórek
<http://celltypes.brain-map.org/rnaseq/human>
- Baza danych oddziaływań białkowych
<https://string-db.org/>
- ZINC15- przewidywanie oddziaływań związków niskocząsteczkowych z białkami

<https://zinc.docking.org/>

- CFX Maestro Software- analiza wyników qPCR (Biorad)

4. Wyniki

4.1. Wstęp

Wyniki mojej pracy doktorskiej przedstawiają się następująco:

- Analiza zmian w transkryptomie mózgów myszy Ki91 w fazie presymptomatycznej i symptomatycznej oraz analiza mRNA wybranych genów w komórkach neuronalnych wyprowadzonych od pacjentów SCA3,
- Wygenerowanie nowego mysiego modelu SCA3 Ki150,
- Charakterystyka molekularna i behawioralna mysiego modelu SCA3 Ki150,
- Określenie interakcji prawidłowej oraz zmutowanej ATXN3 w mysich modelach Ki21 i Ki150,
- Badanie nowej strategii terapeutycznej zmierzającej do obniżenia poziomu zmutowanego białka ATXN3

4.2. Analiza transkryptomiczna mózgów myszy SCA3 w fazie presymptomatycznej i symptomatycznej

4.2.1. RNAseq

W celu określenia czy zmiany transkrypcyjne są bezpośrednią przyczyną patogenezy SCA3 przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem technik RNAseq i qPCR oraz tkanek z mózgów myszy Ki91 w stadium przed objawowym i objawowym. Sekwencjonowanie RNA przeprowadzono przy użyciu tkanek mózdzku i kory mózgowej czterech myszy Ki91 i czterech myszy kontrolnych w wieku 2 miesięcy. Tabele 4 i 5 podsumowują geny o zmienionej w modelu Ki91 względem tkanek WT ekspresji w mózdzku i korze mózgowej, zmiana ekspresji (ang. *fold change*), wartość p (ang. *p-value*) i skorygowane wartości p (ang. *adjusted p-value*). Geny deregulowane w porównaniu z kontrolnymi myszami C57/BL/6 znajdowały się w dwóch stosunkowo małych rejonach w genomie zlokalizowanych na dwóch mysich chromosomach. W pierwszym rejonie zlokalizowanym na chromosomie 12 zidentyfikowaliśmy zmienioną

ekspresję *Serpina3n*, *Slc38a6*, *Ccdc88c*, *Fbln5* i *Ttc8*, przy czym wszystkie deregulowane geny znajdują się bardzo blisko docelowego *locus Atxn3* (Ryc. 3). W drugim rejonie na chromosomie 19 znaleźliśmy zmienioną ekspresję *Btaf1*, *Ide* i *Ablim1*. Takie skupienie genów o zmienionej ekspresji w pobliżu docelowego *locus* może wskazywać, że *loci* mają inne tło genetyczne (pochodzenie genetyczne) niż reszta genomu myszy Ki91 (kongeniczny; C57BL/6) (Ryc.3). Obydwa *loci* mogą pochodzić z tła genetycznego myszy 129sv, z którego zostały uzyskane komórki macierzyste użyte do wprowadzono konstrukt Ki91 (Switonski et al., 2015a). Przeprowadziliśmy porównanie sygnatur SNP genu *Serpina3n* przy użyciu danych RNAseq myszy Ki91 i bazy danych MGI dla szczepów 129sv, FVB i C57BL/6. Okazało się, że sygnatury SNP genu *Serpina3n* były takie same u myszy 129sv, FVB i Ki91 i inne niż u myszy C57BL/6. Sugerowało to, że region na chromosomie 12 w pobliżu transgenicznego *locus Atxn3* segregował razem z transgenem w czasie krzyżowania myszy transgenicznych i został wyselekcjonowany przez genotypowanie zwierząt *Atxn3* Ki91.



Rycina 3. Lokalizacja genetyczna zmienionych genów (niebieskie słupki) w zależności od tła genetycznego 129sv/FVB wokół transgenicznego *locus* (czerwony słupek).

Tabela 4. Lista deregulowanych transkryptów zidentyfikowanych przez RNAseq w mózdku 2 miesięcznych myszy Ki91 SCA3/MJD (n = 4).

Ensemble ID	Gene ID	Chromosom	Log2 fold change	p value	p adjusted
ENSMUSG00000021091	<i>Serpina3n</i>	12	4.17	8.4E-202	2E-197
ENSMUSG00000047632	<i>Fgfbp3</i>	19	1.12	1.53E-15	7.33E-12
ENSMUSG00000021182	<i>Ccdc88c</i>	12	1	5.23E-23	4.17E-19
ENSMUSG00000056999	<i>Ide</i>	19	0.95	4.81E-34	5.75E-30
ENSMUSG00000021186	<i>Fbln5</i>	12	0.94	3.82E-13	1.3E-09
ENSMUSG00000092083	<i>Kcnb2</i>	1	0.71	1.83E-08	4.37E-05
ENSMUSG00000040565	<i>Btaf1</i>	19	0.49	1.57E-09	4.69E-06
ENSMUSG00000021062	<i>Rab15</i>	12	-0.44	2.85E-06	0.004863
ENSMUSG00000044712	<i>Slc38a6</i>	12	-0.61	1.37E-08	3.64E-05

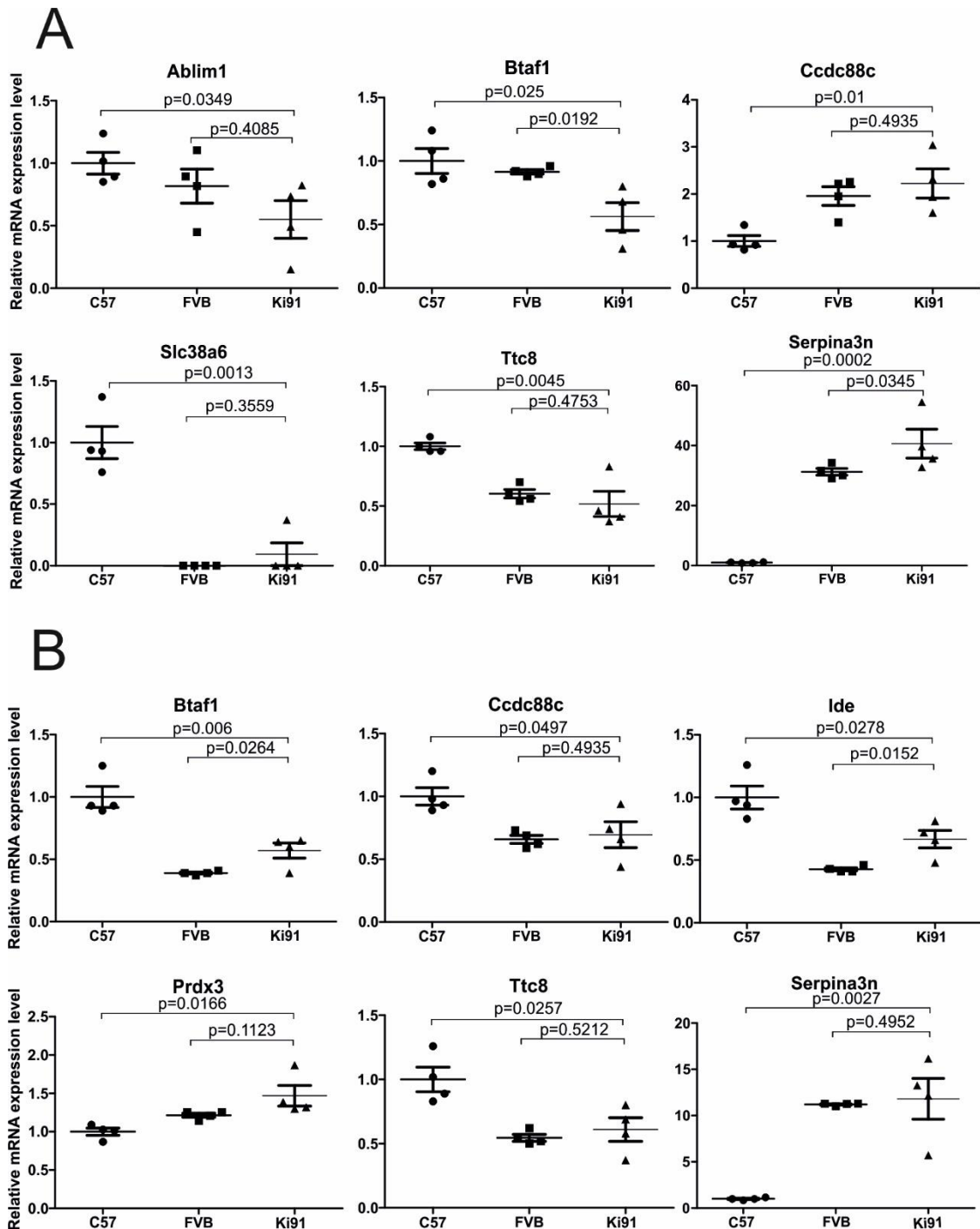
Tabela 5. Lista deregulowanych transkryptów zidentyfikowanych przez RNAseq w mózdku 2 miesięcznych myszy Ki91 SCA3/MJD (n = 4).

Ensemble ID	Gene ID	Chromosom	Log2 fold change	p value	p adjusted
ENSMUSG00000079012	Serpina3m	12	6.22	4.19E-30	3.34E-26
ENSMUSG00000021091	Serpina3n	12	3.27	3.39E-184	8.11E-180
ENSMUSG00000056999	Ide	19	1.07	1.00E-30	1.20E-26
ENSMUSG00000047632	Fgfbp3	12	0.75	7.53E-06	1.80E-02
ENSMUSG00000040565	Btaf1	19	0.62	6.30E-12	3.77E-08
ENSMUSG00000021182	Ccdc88c	12	- 0.49	4.09E-06	1.22E-02
ENSMUSG00000047415	Gpr68	12	- 0.79	4.03E-06	1.22E-02

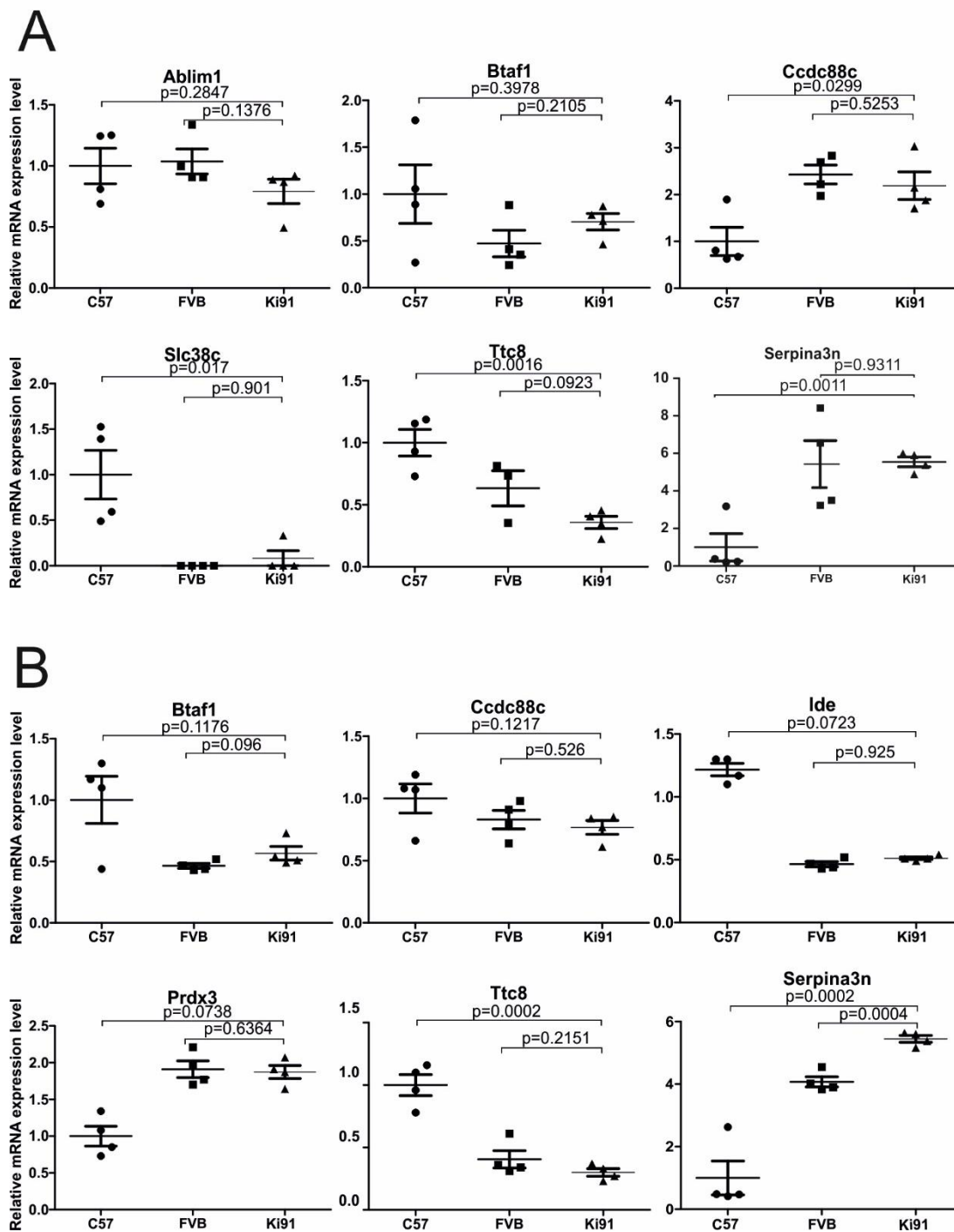
4.2.2. Walidacja zmian RNAseq z użyciem qPCR

Kolejnym krokiem było zbadanie zidentyfikowanych zmian transkrypcyjnych za pomocą qPCR w czasie rzeczywistym. Dlatego, aby ocenić występowanie zmian transkrypcyjnych u myszy Ki91 i wpływ obcego tła myszy 129sv na ekspresję na te zmiany, zbadaliśmy mózdek i korę mózgową z homozygotycznej myszy Ki91 w porównaniu z podwójnym zestawem kontroli, w tym mózdzkiem i korą mózgową z FVB szczep myszy (te same sygnatury SNP co 129sv) ze szczepu myszy C57BL/6 (Ryc. 4 i 5). Zmiany transkrypcji w badanych tkankach myszy Ki91 w porównaniu z mRNA wyizolowanym z tkanek myszy C57BL/6 ponownie wykazało zmiany poziomu tych genów. Podobna analiza nie wykazała żadnych zmian w poziomie transkryptów, gdy poziom ekspresji genów w tkankach myszy Ki91 porównano z poziomem mRNA w tkankach wyizolowanym z tkanek myszy szczepu FVB. W szczególności wyraźną różnicę między szczepami myszy C57BL/6 i FVB wykryto dla *Serpina3n*, gdzie mózdek i kora mózgowia myszy C57BL/6 wykazują wyraźnie obniżoną ekspresji *Serpina3n*, a mózdek i kora mózgowia myszy FVB wykazywały wysoki poziom *Serpina3n* podobny do tego wykrytego u myszy Ki91. Inne zmiany poziomu ekspresji genów u myszy Ki91 ujawnione przez RNAseq również wykazały podobieństwo od poziomów FVB. Analiza potwierdziła, że zmiany transkrypcyjne genów w stadium przed objawowym w mózdku i korze mózgowiej myszy Ki91 jest wynikiem tła genetycznego występującego w sąsiedztwie *locus Atxn3* i w miejscu *locus* na chromosomie 19. Ponadto nieznacznie zmieniony poziomy

Fgfbp3, Btaf1 i Ide może być wynikiem znanej zmienności liczby kopii DNA (ang. *copy number variation*, CNV) charakterystycznej dla C57BL/6 (ale nie FVB) i obejmującej ten region chromosomu 19 (Watkins-Chow and Pavan, 2008).



Rycina 4. Geny zidentyfikowane przez RNAseq analizowano metodą qPCR przy użyciu dwóch szczepów kontrolnych C57BL/6 (C57) i FVB w celu wykluczenia wpływu tła genetycznego na poziom ekspresji genów. Wyniki zarówno w (A) mózdzku oraz (B) korze mózgowej wskazują na istotny wpływ tła genetycznego na poziom ekspresji wykrytych zmian transkryptomycznych (n = 4, n = 4 na tkankę; tkanka myszy C57BL6 (C57) lub FVB była kontrolą dla tkanek myszy Ki91; test t-Studenta dla prób niezależnych p<0,05, słupki błędów: SEM).



Rycina 5. Poziom ekspresji tych samych genów co w przypadku myszy 2 miesięcznych określono w tkanki mózgowej 4-miesięcznych myszy kontrolnych i myszy Ki91. Różnice w poziomach ekspresji genów dla (A) mózdzku (B) kory mózgowej nie osiągnęły spójnej istotności statystycznej w kontrolach i tkankach (n = 4, tkanki myszy C57BL6 (C57) oraz FVB była kontrolą dla tkanek myszy Ki91; test t-Studenta dla prób niezależnych p<0,05, słupki błędów: SEM).

4.2.3. Zmiany splicingowe w modelu Ki91

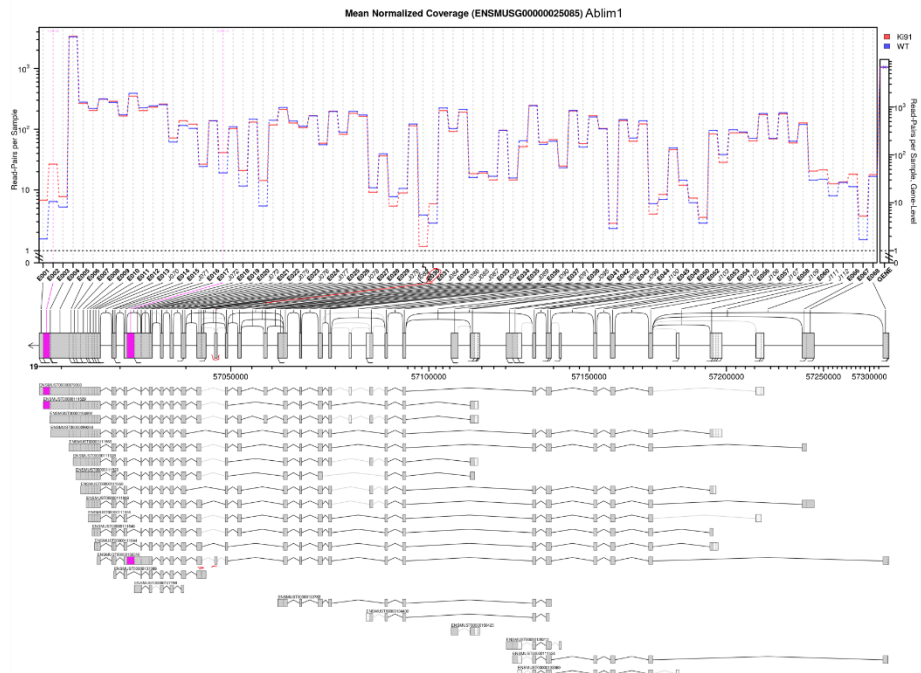
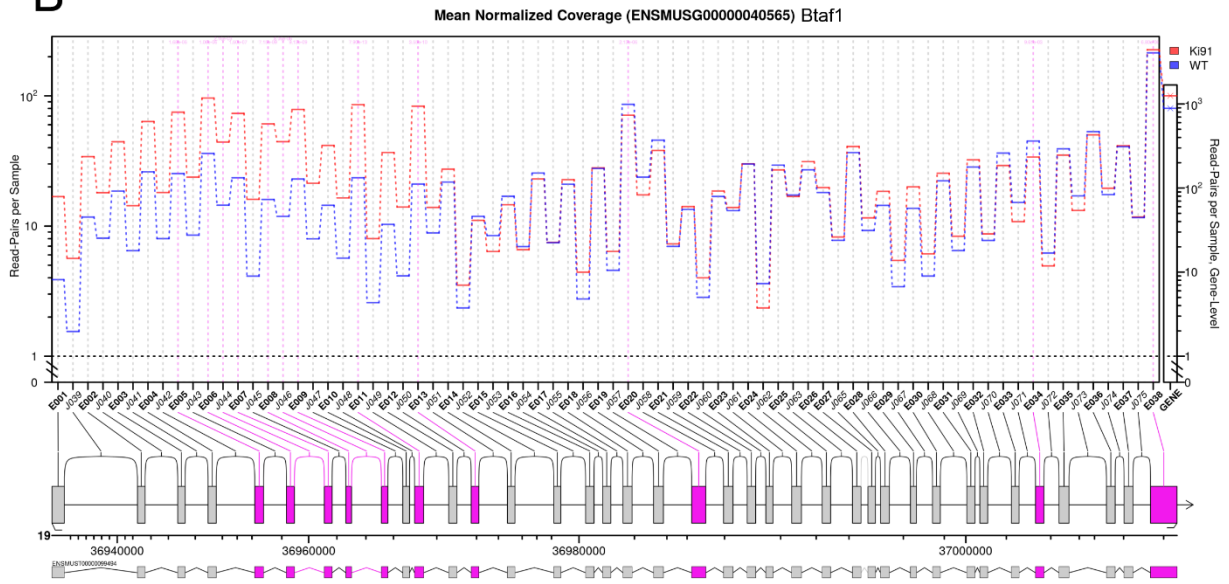
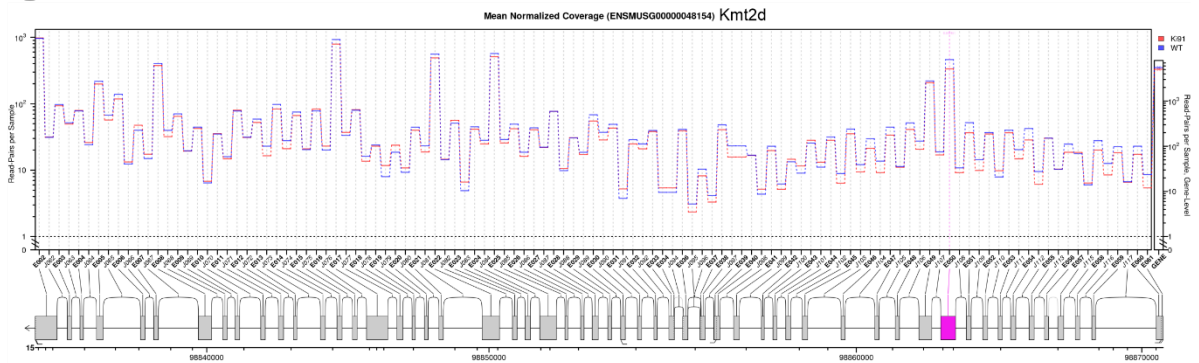
W celu określenia zmian splicingowych w modelu Ki91 zastosowano algorytm JunctionSeq i powiązany z nim pakiet Bioconductor

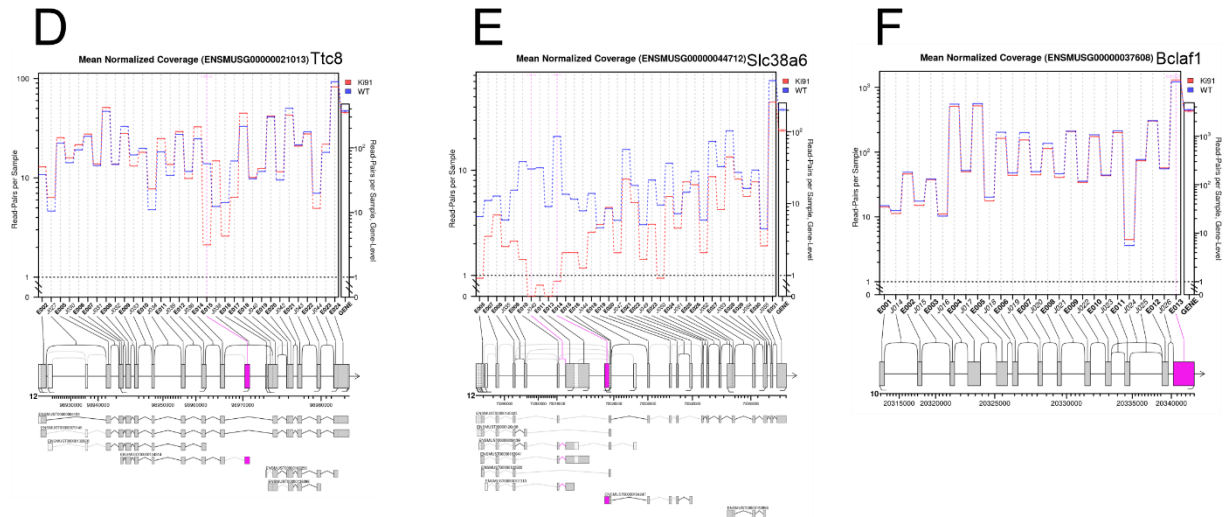
Analiza JunctionSeq wskazała na zmiany splicingowe w 6 genach w korze mózgowej, natomiast w korze mózgowej wykryto 4 geny (Tabela 6 oraz Rycina 6 i 7). Podobnie jak w przypadku wyników RNAseq większość zidentyfikowanych genów wykazujących zmienione warianty splicingowe znajdują się na chromosomach 12 i 19, ponadto w korze mózgowej zostały zidentyfikowane zmiany w Kmt2d (chromosom 15) oraz Bclaf1 (chromosom 10).

Ze względu na wykrycie wpływu tła genetycznego na zmiany transkrypcyjne u przedobjawowych myszy Ki91 (Rozdział 4.2.2) nie wykonywałem walidacji tych zmian z użyciem techniki qPCR.

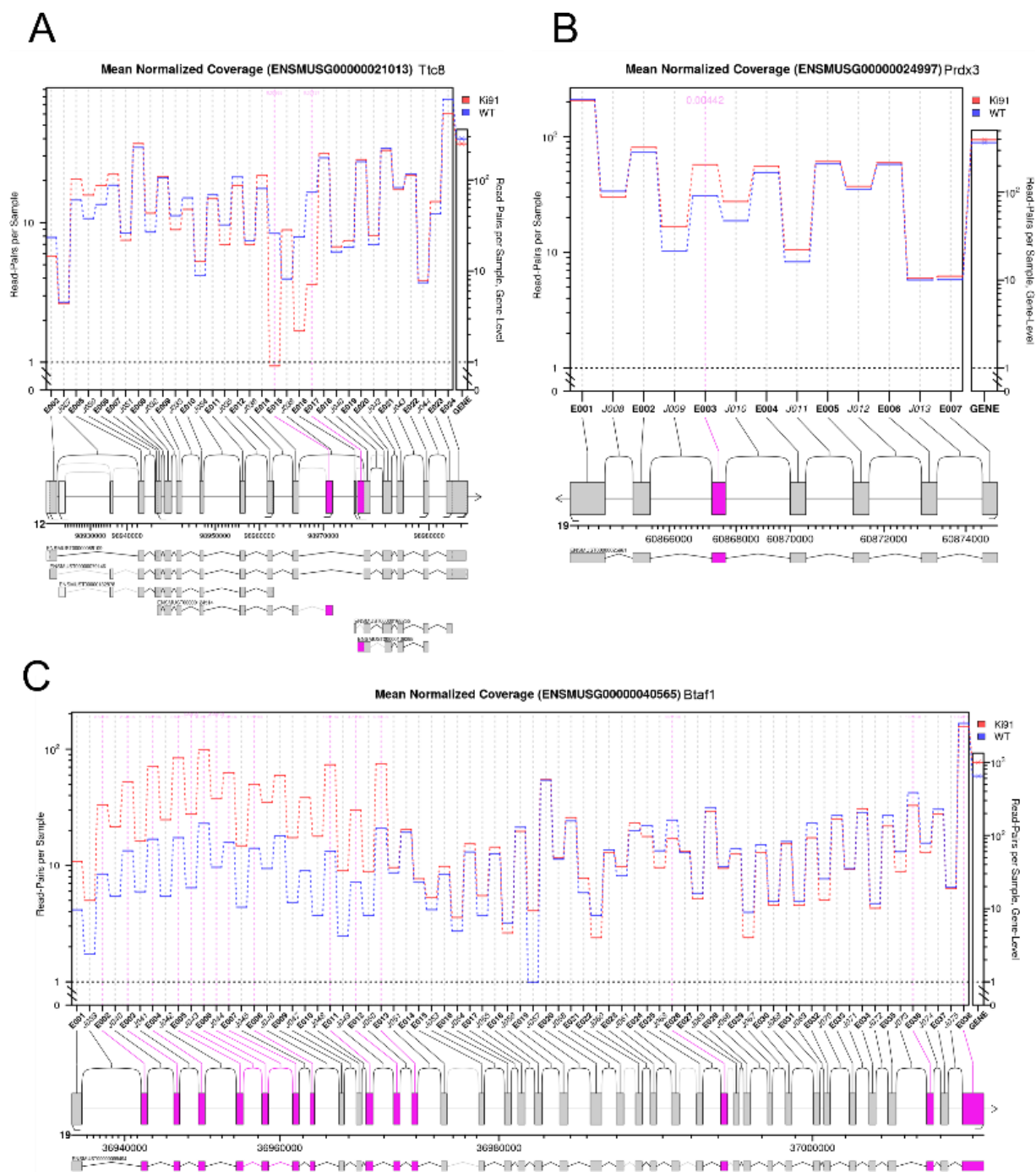
Tabela 6. Zidentyfikowane geny o zmienionych wariantach splicingowych w genach zidentyfikowane z pomocą JunctionSeq w mózdzku i korze mózgowej myszy 2 miesięcznych (n = 4).

Mózdzek			Kora mózgowa		
Gene	Ensemble id	Chromosom	Gene	Ensemble id	chromosom
Atxn3	ENSMUSG00000021189	12	Btaf1	ENSMUSG00000040565	19
Btaf1	ENSMUSG00000040565	19	Atxn3	ENSMUSG00000021189	12
Slc38a6	ENSMUSG00000044712	12	Ttc8	ENSMUSG00000021013	12
Ablim1	ENSMUSG00000025085	19	Prdx3	ENSMUSG00000024997	19
Ttc8	ENSMUSG00000021013	12			
Kmt2d	ENSMUSG00000048154	15			
Bclaf1	ENSMUSG00000037608	10			

A**B****C**



Rycina 6. Zmiany splicingowe w mózdzku myszy Ki91 wykryte za pomocą danych RNAseq analizowanych z użyciem narzędzia JunctionSeq wskazują na zmiany głównie w obrębie genów zlokalizowanych na chromosomach 12 i 19, dodatkowo zidentyfikowano zmiany w obrębie Kmt2d (chromosom 15) oraz Bclaf1 (chromosom 10) (n=4).



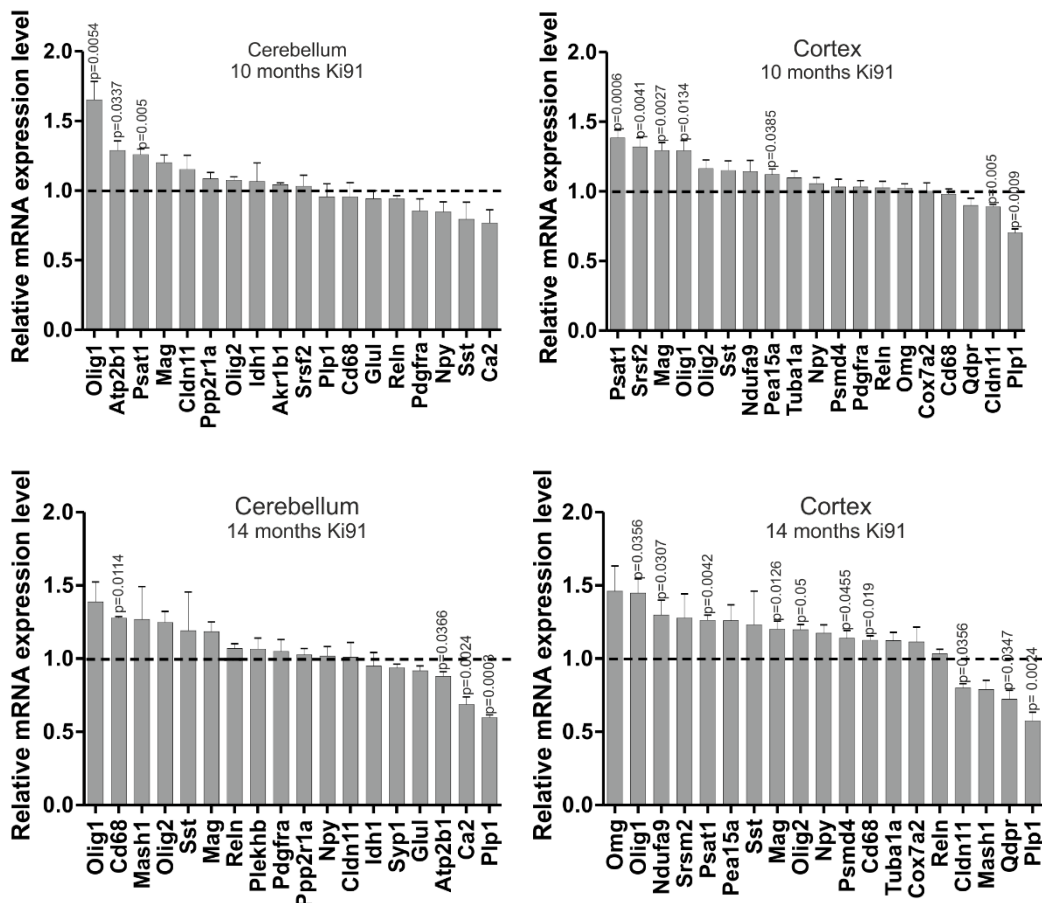
Rycina 7. Zmiany splicingowe w korze mózgowej myszy Ki91 wykryte za pomocą narzędzia JunctionSeq wskazują na zmiany w obrębie genów zlokalizowanych na chromosomach 12 i 19 (n=4).

4.2.4. Zmiany transkrypcyjne, symptomatycznych zwierząt Ki91 SCA3/MJD wskazują na zaburzenia w populacjach komórek w mózgu

Ponieważ wczesne zmiany transkrypcyjne zależne od zmutowanej ATXN3 nie występują u młodych myszy Ki91, starano się określić fenotyp transkrypcyjny w późniejszych stadiach SCA3. Zbadałem również, czy zmiany transkrypcyjne w objawowej fazie SCA3/MJD są

markerami określonych typów komórek w mózdzku i korze mózgowej. Identyfikacja takich markerów może wskazywać na zmiany w liczbie komórek w populacji istotne dla patogenezy mózgu. Dlatego wykorzystałem symptomatyczne homozygotyczne zwierzęta Ki91 w wieku 10 i 14 miesięcy. Zgodnie z naszymi eksperymentami behawioralnymi, 14-miesięczne zwierzęta Ki91 wykazują objawy i wykazują zmienioną sprawność motoryczną, zmieniony test punktowy i zmniejszoną masę ciała (Wiatr et al., 2019). Na podstawie wstępnych pilotażowych eksperymentów proteomicznych na myszach Ki91, wybrałem 16 najbardziej zmienionych białek (*Atp2b1*, *Psat1*, *Ppp2r1a*, *Idh1*, *Akr1b1*, *Srsf2*, *Plp1*, *Glul*, *Ca2*, *Ndufa9*, *Pea15a*, *Tuba1a*, *Psm4*, *Omg*, *Cox7a2* i *Qdpr*) w celu zbadania potencjalnych zdarzeń transkrypcyjnych u starszych zwierząt Ki91 w wieku 10 i 14 miesięcy. Oprócz tych 16 genów uwzględniłem również geny wybrane na podstawie bazy danych scRNAseq (<http://celltypes.brain-map.org/rnaseq/human>) jako markery różnicujących się oligodendrocytów (*Olig1*, *Olig2*), dojrzałych oligodendrocytów (*Mag*, *Omg*, *Cldn11*, *Plp1*), mikrogleju (*Cd68*), neuronów (*Reln*, *Npy*, *Sst*).

Stwierdziłem, że poziom mRNA markerów różnicujących oligodendrocytów, takich jak *Olig1* i *Olig2*, jest podwyższony zarówno w mózdzku, jak i korze mózgowej myszy Ki91, co wskazuje na wzrost zapotrzebowania na nowe oligodendrocyty w mózgu SCA3/MJD (Ryc. 8). Co więcej, wykryłem obniżoną ekspresję markerów mielinacji, będące również markerami dojrzałych oligodendrocytów, takich jak *Plp1* i *Cldn11*, zarówno w mózdzku, jak i korze mózgowej. Ponadto wykryłem zmienione markery metabolizmu, takie jak *Psat1*, *Ndufa9*, *Qdpr* i *Pea15a* (Ryc. 8). Nie było zmian w ekspresji markerów neuronalnych: *Npy*, *Sst* i *Reln* (Ryc. 8). Obserwowałem większą liczbę deregulowanych genów u zwierząt w wieku 14 miesięcy w porównaniu do zwierząt w wieku 10 miesięcy.

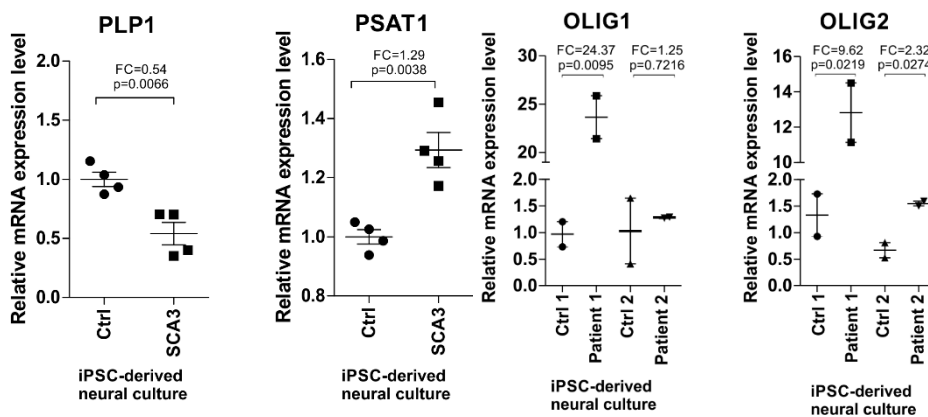


Rycina 8. Zmiany transkrypcyjne występują u 10- i 14-miesięcznych objawowych homozygotycznych myszy Ki91 SCA3/MJD i są związane ze zmianami związanymi z określonymi typami komórek. U 10-miesięcznych myszy Ki91 analiza wykazała podwyższony poziom *Pstat1* i *Olig1* w mózdzku i korze mózgowej (A). Gen *Mag* związany z oligodendrocytami ujawnił podwyższony poziom w korze mózgowej. *Plp1* wykazywał obniżony poziom w korze mózgowej 10-miesięcznych myszy Ki91, co sugeruje utratę dorosłych oligodendrocytów podczas progresji choroby. Czternastomiesięczne myszy Ki91 wykazują bardziej wyraźne zmiany w poziomach mRNA (B). W mózdzku poziom *Cd68*, markera mikrogleju, wykazywał podwyższony poziom ekspresji. Geny związane z metabolizmem, *Atp2b1* i *Ca2*, są obniżone. Gen o wysokiej ekspresji w dorosłych oligodendrocytach-*Plp1* jest również obniżony w mózdzku. W korze mózgowej poziom transkryptów charakterystycznych dla prekursorów oligodendrocytów jest podwyższony (*Olig1*, *Olig2*), a z drugiej strony obniżony poziom transkryptów charakterystycznych dla dorosłych oligodendrocytów (*Plp1* i *Cldn11*) oraz podwyższony poziom *Mag*. Nie wykryliśmy zmian transkrypcyjnych charakterystycznych dla markerów neuronalnych zarówno w mózgu myszy Ki91 w wieku 10, jak i 14 miesięcy. Obserwujemy również zmieniony poziom genów charakterystycznych dla metabolizmu (*Pstat1*, *Qdpr*), (Test t dla dwóch prób, $p < 0,05$, słupki błędów: SEM, $n=4$).

4.2.5. Zmiany transkrypcyjne zachodzące u objawowych myszy Ki91 SCA3/MJD występują również w neuronach pacjentów z SCA3/MJD

Ponieważ zmiany transkryptomu w naszym mysim modelu Ki91 wystąpiły w starszym mózgu, zapytaliśmy, czy takie zmiany wystąpiłyby również w terminalnie zróżnicowanej kulturze neuronalnej SCA3 z linii komórek SCA3 iPSC. Dlatego użyliśmy kultur neuronalnych

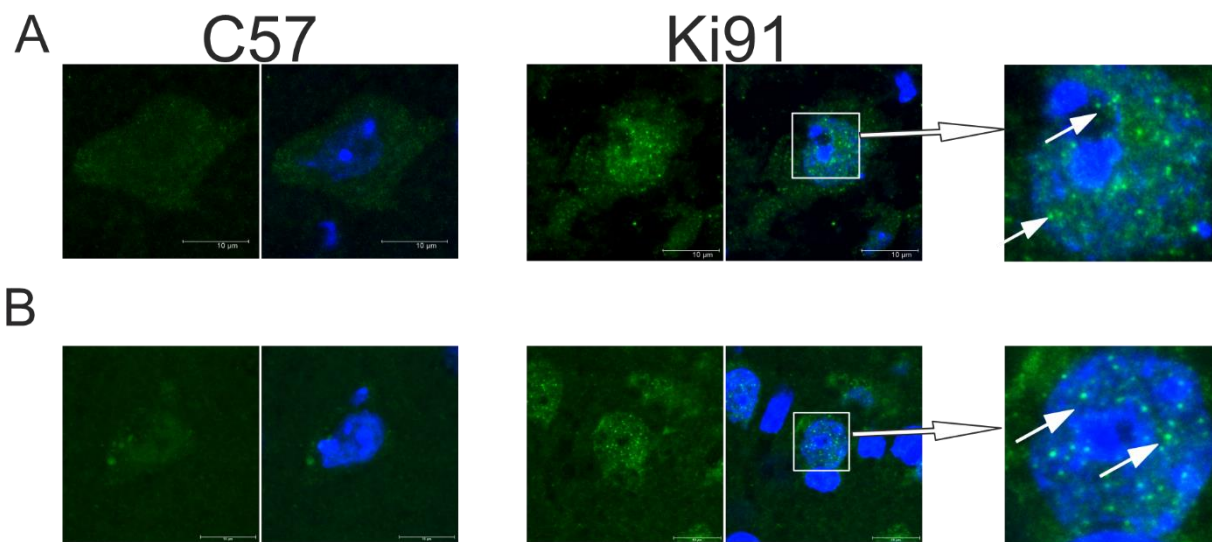
pochodzących z komórek iPSC wyprowadzonych od dwóch pacjentów ze SCA3 i dwóch genetycznie spokrewnionych zdrowych osób (Koch et al., 2011). Różnicowanie neuronalne obejmujące 6 tygodni reprezentuje zatem dorosłe komórki nerwowe (Koch et al., 2009). Izolacja mRNA i qPCR ujawniły zmiany w genach związanych z prekursorami neuronalnymi i oligodendrocytami (*OLIG1*, *OLIG2* i *PLP1*) oraz metabolizmem energetycznym (*PSAT1*) (Ryc. 9).



Rycina 9. Komórki neuronalne zróżnicowane z linii komórek iPSC pochodzących od pacjentów SCA3 wykazały zmiany mRNA podobne do późnych zmian u myszy Ki91 SCA3/MJD. Marker prekursorów oligodendrocytów i neuronów, *OLIG1*, był podwyższony u jednego pacjenta, a *OLIG2* był podwyższony w hodowlach neuronalnych od obu pacjentów. *PLP1*, który jest wysoce ekspresyjny w dojrzałych oligodendrocytach, był obniżony u pacjentów z SCA3. Marker *PSAT1* był nieznacznie podwyższony u obu pacjentów. Wartości p (niesparowany test t-Studenta; dwie techniczne powtórzenia hodowli komórkowej na pacjenta) obliczono w celu oceny różnic między pacjentem a grupą kontrolną; jednak kryteria statystyczne zastosowania testu t nie zostały spełnione ze względu na małą liczbę dostępnych pacjentów (pacjenci n = 2; pacjenci bez zmian n = 2) (Test t dla dwóch prób p < 0,05, słupki błędów: SEM).

4.2.1. Mózg i kora mózgowa przedobjawowych myszy Ki91 SCA3/MJD wykazują występowanie komórek z akumulacją mikroagregatów białka ATXN3 w jądrach komórkowych

Jedną z komórkowych cech charakterystycznych dla patogenezy SCA3 jest jądrowa lokalizacja ATXN3. Dlatego zbadałem lokalizację ATXN3 w mózgu 2-miesięcznych myszy Ki91 i wykryłem komórki z jądrami pozytywnymi dla ATXN3 w istocie białej mózdzku (Ryc. 10A) i kory mózgowej (Ryc. 10B). Jądra 2 miesięcznych mysich komórek Ki91 ujawniają agregaty wewnątrzjądrowe dodatnie pod względem ATXN3 (Ryc. 10). Z kolei lokalizacja ATXN3 w mózdzku i korze zwierząt WT jest równomiernie rozłożona w całej cytoplazmie i jądrze komórkowym.

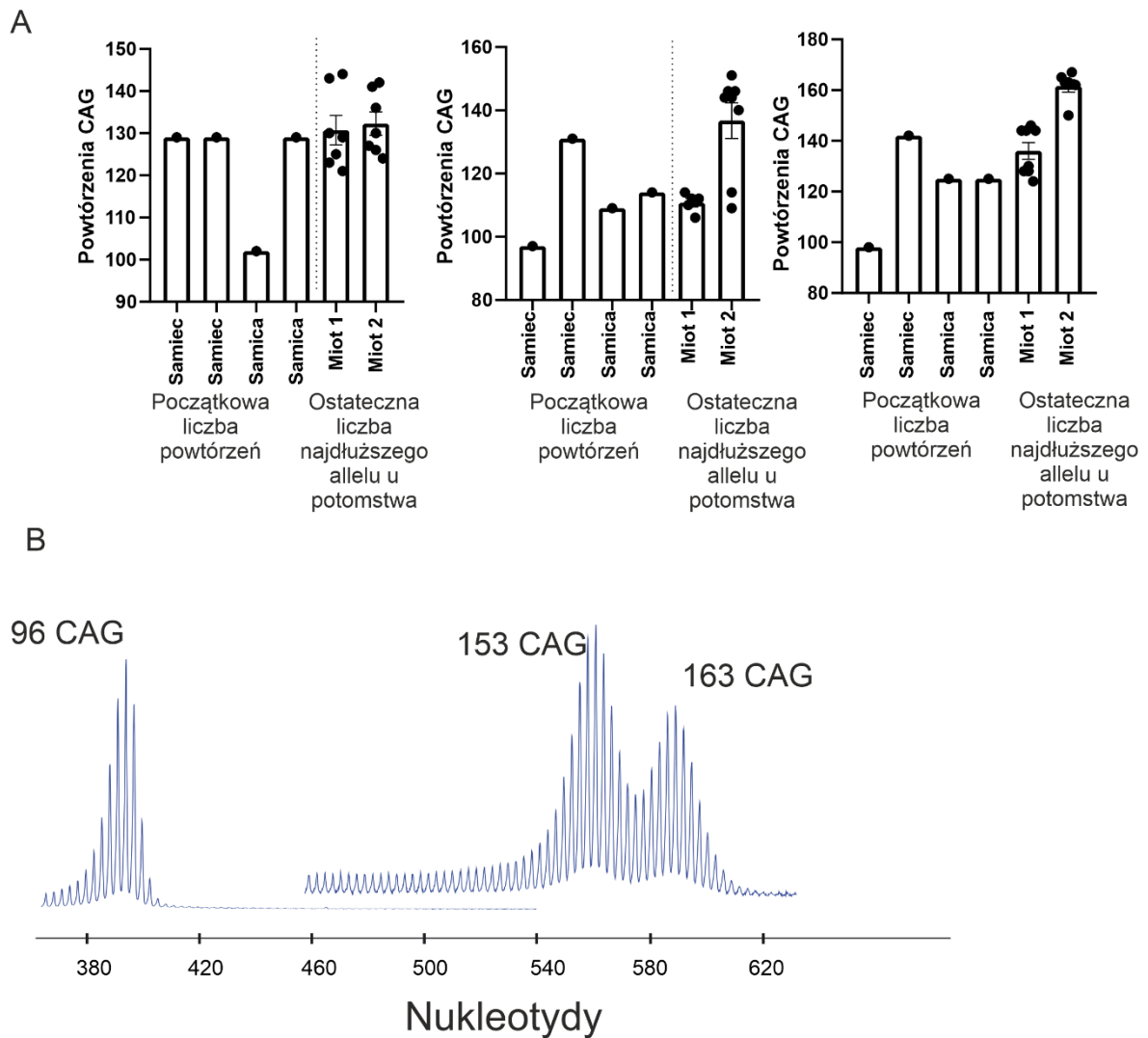


Rycina 10. Lokalizacja jądrowa ATXN3 u 2-miesięcznych bezobjawowych myszy Ki91 SCA3/MJD. Skrawki mózgu ujawniły niewielką liczbę komórek z pozytywnym sygnałem ATXN3 (kolor zielony; przeciwciało 1H9) w (A) istocie białej mózdzku i (B) korze mózgowej, gdzie ATXN3 lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym (kolor niebieski; Hoechst 33342) myszy Ki91, podczas gdy w próbkach kontrolnych ATXN3 lokalizuje się równomiernie w całej komórce. Ponadto mikrografia przedstawia lokalizację mikroagregatów (strzałki) w jądrze komórkowym myszy Ki91. (n=3).

4.3. Mysi model SCA3 Ki150

Mysi model SCA3 typu knock-in przejawiający mocno wyrażony fenotyp nie był dostępny do badań. Model taki powinien dokładnie naśladować patogenezę SCA3 u pacjentów i ułatwić wykorzystanie modelu w przedklinicznych podejściach terapeutycznych i testowaniu terapii w SCA3. Ekspansja liczby powtórzeń CAG w ATXN3, która zachodzi między pokoleniami (ekspansja międzypokoleniowa), zwykle koreluje z przyspieszoną progresją choroby u pacjentów ze SCA3. Model Ki91 także wykazuje ekspansję międzypokoleniową (Switonski et al., 2015a), powodując spontaniczny wzrost liczby powtórzeń CAG w naszych koloniach myszy, dając myszy zawierające od 110 do 130 powtórzeń CAG w humanizowanym genie ATXN3. Myszy wykazywały znacznie przyspieszony fenotyp; jednak nadal objawy motoryczne manifestują się w pełni w wieku 12 miesięcy (Wiatr et al., 2021, 2019). Dlatego naszym celem było dalsze wzmocnienie fenotypu, aby zwiększyć przydatność modelu mysiego do przedklinicznych testów terapeutycznych. Zastosowaliśmy selektywną hodowlę par

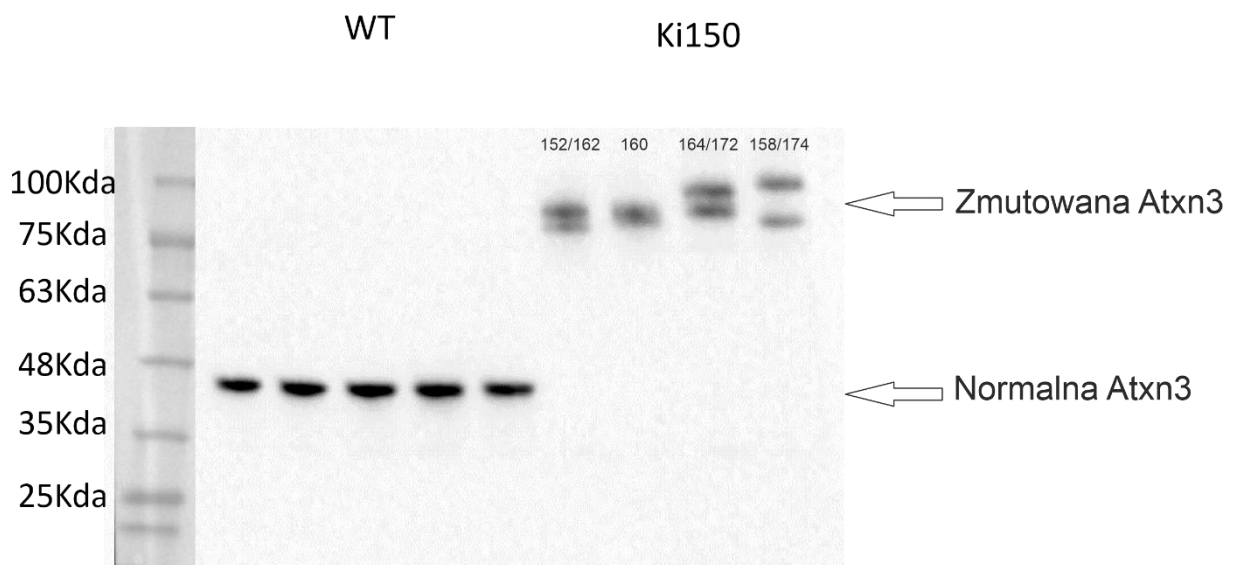
o największej liczbie powtórzeń CAG. Rycina 11 przedstawia wykresy z przykładami długości CAG najdłuższego i najkrótszego allelu u rodziców w porównaniu z allelami potomstwa (Ryc. 11A i B). Występowanie zmienności liczby powtórzeń zwiększało się z czasem, co skutkowało identyfikacją pojedynczych ekspansji o długości ciągu nawet do 200 CAG.



Rycina 11. Ekspansja CAG podczas generowania mysiego modelu Ki150 SCA3. (A) Liczba powtórzeń CAG najwyższego allelu w miotach. (B) Reprezentatywny przykład ekspansji genetycznej CAG w humanizowanym genie ATXN3 między modelami mysimi Ki91 i Ki150. (B).

4.3.1. Poziom zmutowanego białka ATXN3 w mysim modelu SCA3 Ki150 w korze mózgowej

W celu określenia wielkości białek z prawidłową oraz wydłużoną liczbą glutamin wykonano eksperyment western blot. W celu analizy wykorzystalem kore mózgową myszy C57/BL6 oraz myszy Ki150 (150Q). Każda z myszy homozygotycznych Ki150 posiadała inną ilość powtórzeń CAG co jest spowodowane niestabilnością powtórzeń CAG. Ilość powtórzeń CAG u myszy Ki150 MUT/MUT to odpowiednio 152/162, 160, 164/172 i 158/174 powtórzeń. Pierwotnie zmutowana ATXN3 w modelu Ki91 miała wielkość ok 67 kDa (Switonski et al., 2015a) natomiast zidentyfikowane transgeniczne białko w tym modelu przekraczało 75 kDa.

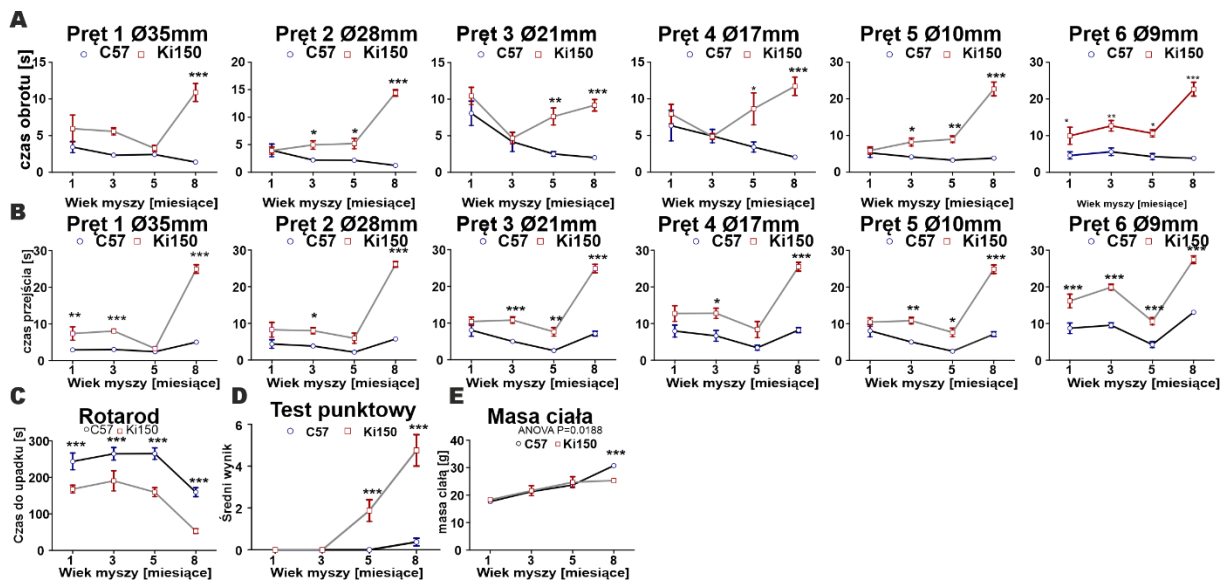


Rycina 12. Analizy Western Blot lizatów kory mózgowej wykazały ekspresję poliQ-ekspandowanej ATXN3 (Ki150) i nieekspandowanej ATXN3 w wieku 2 miesięcy w homozygotycznym zmutowaniu ATXN3 Ki150 osiąga około 100 kDa. Na próbkach myszy Ki150 zaznaczono genomyczną ilość powtórzeń CAG w allelach zmutowanej ATXN3.

4.3.2. Charakterystyka behawioralna nowego mysiego modelu SCA3 Ki150

W celu ustalenia, czy istnieją fenotypy behawioralne charakterystyczne dla SCA3 u myszy Ki150, przeprowadziłem testy mierzące sprawność motoryczną. Odkryłem, że pierwsze objawy ruchowe występują już u jednomiesięcznych zwierząt Ki150 (n=8 na genotyp). Już w tym młodym wieku myszy Ki150 wykazywały objawy motoryczne w teście prętów statycznych i teście Rotarod, wykazując utratę równowagi i brak koordynacji (Ryc. 13A-C). Myszy Ki150 potrzebowały więcej czasu, aby obrócić się na pręcie (średnica: 9 mm) (Ryc. 13A) i potrzebowały więcej czasu na przejście przez pręt (średnica: 35 i 9 mm) w teście prętów

statycznych ($P < 0,05$; dwukierunkowa ANOVA, poprawka Bonferroniego) (Ryc. 13B). Wraz z progresją SCA3 czas potrzebny na obrót na pręcie i czas przejścia przez pręt był znacząco dłuższy na wszystkich testowanych prętach (średnica: 35, 28, 21, 17, 10 i 9 mm) ($P < 0,05$; dwukierunkowa ANOVA, poprawka Bonferroniego; Ryc. 13A, B). Co więcej, Ki150 więcej razy ześlizgiwały kończyny na prętach podczas przechodzenia przez pręt. Ponadto, brak koordynacji obserwowany w Rotarod był obserwowany począwszy od wieku 1 miesiąca i postępował wraz z wiekiem ($P < 0,001$; dwukierunkowa ANOVA, poprawka Bonferroniego; Ryc. 13C). W wieku 5 miesięcy Ki150 wykazał pogorszenie fenotypu motorycznego w teście punktowym, który oceniał chód, koordynację ruchową i równowagę, podwijanie kończyn tylnych i kifozę ($P < 0,0001$; dwukierunkowa ANOVA, Bonferroni) (Ryc. 13D). W wieku 8 miesięcy Ki150 wykazywał również zmniejszoną masę ciała ($P < 0,0001$; dwukierunkowa ANOVA, poprawka Bonferroniego) (Ryc. 13E). Nie istniała korelacja między masą ciała a testami behawioralnymi w każdym wieku ($P < 0,05$, test korelacji).

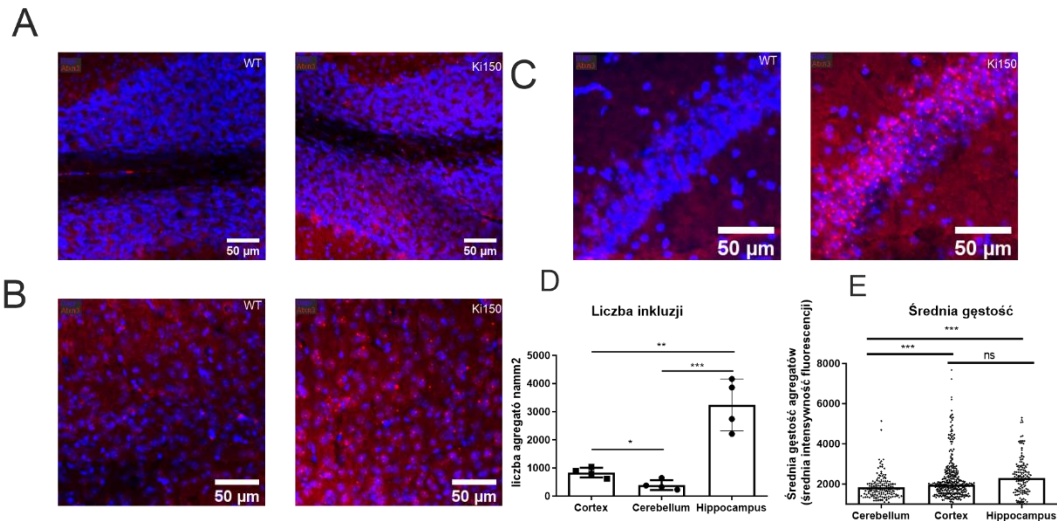


Rycina 13. Postępujący spadek motoryki w modelu Ki150 SCA3 knock-in jest szybki i postępujący. W teście prętów statycznych (A, B) „czas obrotu” i „czas przejścia” mierzono na sześciu prętach o malejącej średnicy (średnicę prętów oznaczono jako Ø w mm). (A) 1-miesięczne zwierzęta potrzebowały więcej czasu, aby włączyć pręt 6 reprezentujący najwyższy poziom trudności, a wraz z postępem choroby więcej prętów stanowiło wyzwanie dla myszy Ki150; Ostatecznie w wieku 8 miesięcy myszy Ki150 potrzebował więcej czasu na przejście na wszystkich prętach. (B) Podobnie jak w przypadku parametru „czasu na obrót” 1-miesięczne myszy Ki150 potrzebowały znacznie więcej czasu na przejście na pręcie 6, ale także 1, podczas gdy starsze 8-miesięczne myszy potrzebowały więcej czasu na wszystkich prętach (C) Motor Niekoordynację w przyspieszonym rotarodzie (4–40 obr./min w ciągu 5 min) Ki150 przedstawił już w wieku 1 miesiąca. (D) W teście punktacji 5-miesięczne myszy Ki150 wykazywały fenotyp SCA3: brak koordynacji, zaburzenia chodu, kifoza i zaciskanie kończyn tylnych (E)

Zmniejszenie przyrostu masy ciała u Ki150 zaobserwowano w wieku 8 miesięcy; Dwukierunkowy ANOVA z testem post hoc Bonferroniego ($p \leq 0,05$; całkowita liczba powtórzeń biologicznych: $n = 16$, $n = 8$ na genotyp), słupki błędów: SEM. Gwiazdki oznaczają dwukierunkowy test ANOVA (post hoc Bonferroni) dla danego wieku myszy (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). ANOVA z testem post hoc Bonferroniego dla wszystkich testów oprócz masy ciała wynosiła $p < 0.0001$.

4.3.3. Lokalizacja tkankowa, komórkowa i subkomórkowa zmutowanej ATXN3 w mózgu mysiego modelu SCA3 Ki150

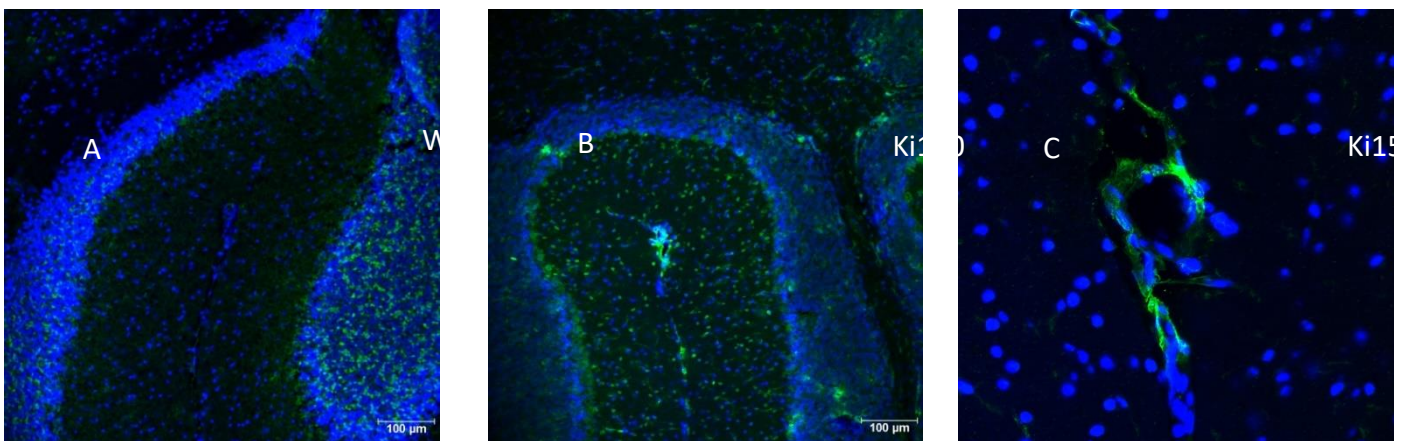
Doświadczenia wykonane wcześniej w zakładzie pokazały występowanie inkluzje u myszy Ki91 SCA3 MJD występujące we wszystkich obszarach mózgu (Switonski et al., 2015a; Wiatr et al., 2019, 2021). Określiłem liczbę i gęstość agregatów w obszarach mózgu za pomocą narzędzia: Aggrecount Master (Klickstein et al., 2020) i programu ImageJ/Fiji. U myszy Ki150 w stadium 8 miesięcy zidentyfikowałem bardzo dużą liczbę inkluzji, szczególnie widoczną w obszarach mózgu o wysokiej gęstości komórek, takich jak hipokamp (Ryc. 14B). Zidentyfikowałem również największą liczbę inkluzji na mm² ($n=4$) w hipokampie (średnia = 3243; SEM = 460,7) w porównaniu do kory mózgowej (średnia = 838,7; SEM = 87,6) i mózdzku (średnia = 393,1; SEM = 88,8) (Ryc. 14). Dodatkowo zmierzyłem intensywność sygnału fluorescencyjnego każdej inkluzji z próbki ($n=4$ i 3 powtórzenia techniczne na mózg), co było równoważne średniej gęstości inkluzji. Gęstość pojedynczej inkluzji była najwyższa w hipokampie (mediana = 2298) w porównaniu z korą mózgową (mediana = 1969) i mózdzkiem (mediana = 1727). Podsumowując, w mysim modelu Ki150 inkluzje są wyraźnie większe niż Ki91 oraz są gęste i występują wcześniej w porównaniu z Ki91. Model myszy Ki150 odzwierciedla przyspieszoną patogenezę podobną do SCA3 u pacjentów. Średnia intensywność inkluzji w korze mózgowej i hipokampie jest jednak wyższa niż w mózdzku.



Rycina 14. Lokalizacja komórkowa ATXN3 w myszach kontrolnych i mysim modelu Ki150. Widoczna jest znaczna ilość inkluzji w (A) mózdzku, (B) korze mózgowej i (C) hipokampie. (D) Największa ilość inkluzji na skrawkach mózgowi Ki150 na mm² znajduje się w hipokampie. Test t-Studenta dla prób niezależnych (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001), (n=3).

4.3.4. Mikroglejoza i zapalenie mysiego modelu SCA3 Ki150

W modelu Ki150 wykonałem barwienie immunofluorescencyjne skrawków myszy 8-miesięcznych, które wykazało podwyższony poziom markeru aktywnego mikrogleju Cd11b w mózdzku Ryc. 15B i C. Ponadto, aktywacja mikrogleju w rejonie naczyń krwionośnych w mózdzku myszy Ki150 może świadczyć o naruszeniu bariery krew mózg (Ryc. 15C).



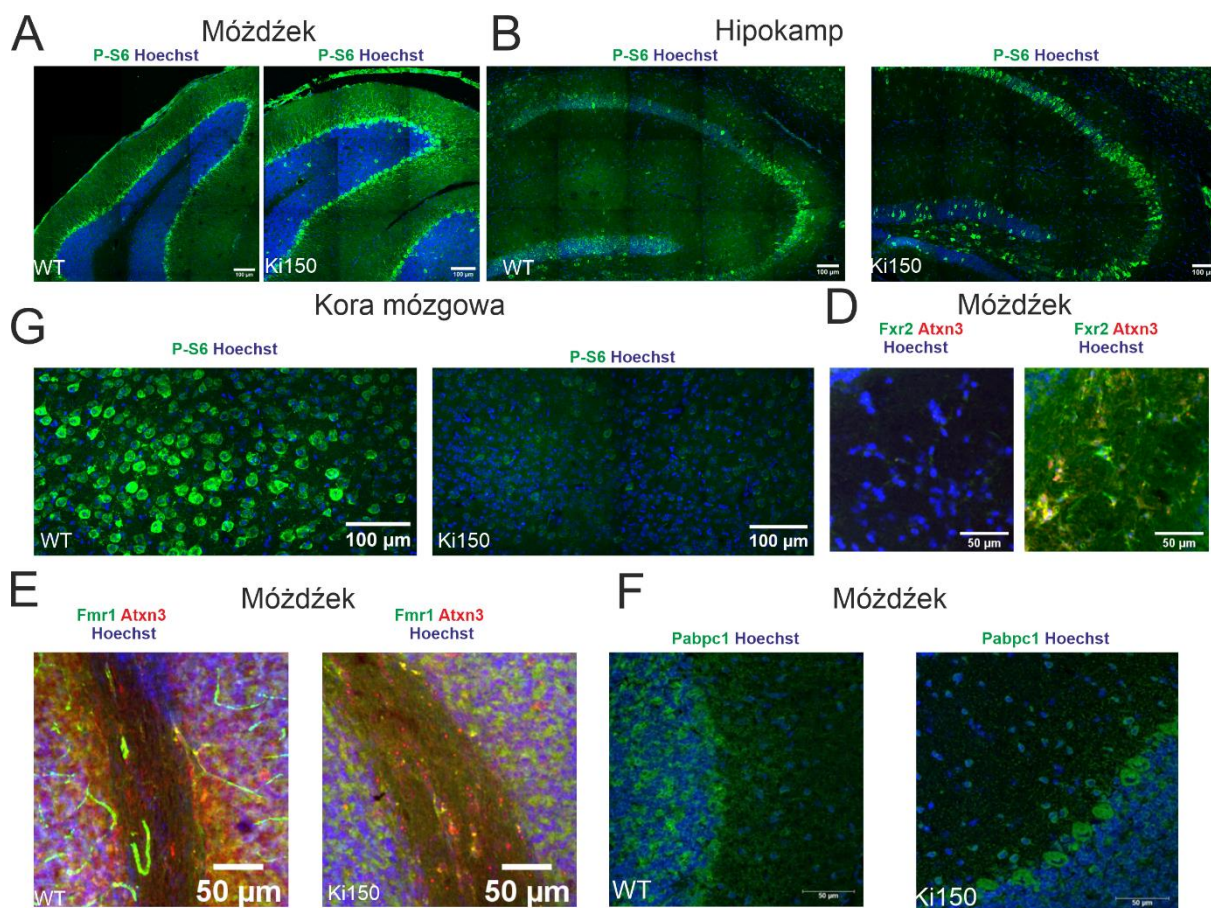
Rycina 15. Zwiększona immunodetekcja Cd11b w mózdzku 8 miesięcznych myszy Ki150 świadcząca o nadmiernej aktywacji mikrogleju. n=3.

4.3.5. Zmienione białka związane z translacją w mysim modelu SCA3 Ki150

Tkankowy i komórkowy obraz białek związanych z translacją jest ważnym czynnikiem w proteinopatiach takich jak SCA3. Dlatego wykonałem barwienie immunofluorescencyjne

znanych markerów poziomu translacji: fosforylowanego białka S6, białka Fxr2, Fmr1 oraz białka Pabpc1 na skrawkach myszy Ki150 i myszy kontrolnych w stadium 8 miesięcy życia. Czynniki wzrostu i mitogeny indukują aktywację kinazy p70 S6, a następnie fosforylację rybosomalnego białka S6. Fosforylacja rybosomalnego białka S6 koreluje ze wzrostem translacji transkryptów mRNA, które zawierają sekwencje oligopirymidynową w ich 5'UTR (Peterson and Schreiber, 1998). Wykryłem podwyższony poziom fosforylowanego białka S6 w komórkach Purkiniego w mózgu myszy Ki150, ale również w hipokampie i korze mózgowej (Ryc. 16 A-C). Białko Fxr2 oddziałuje z polirybosomami w szczególności z dużą podjednostką rybosomu 60S (Tamanini et al., 1997). Badania pokazują, że w aksonach białko Fxr2 łączy się z rybosomami tworząc granule i regulować RNA w aksonach, jest też częścią granulek stresowych (Akins et al., 2017; Chyung et al., 2018). W mózgu myszy Ki150 wykryłem szczególnie wysoki sygnał Fxr2 w istocie białej mózgu (kolor zielony), w bezpośrednim sąsiedztwie znajdują się również inkluzje zmutowanej ATXN3 (kolor czerwony) (Ryc. 16D). Fmr1 wpływa na plastyczność synaptyczną poprzez negatywną regulację translacji. Fmr1 jest białkiem wiążącym RNA, które łączy się z polirybosomami (Brown et al., 1998; Weiler et al., 1997). Podobnie do Fxr2 białko Fmr1 wykazuje podwyższony poziom u myszy Ki150 w istocie białej mózgu. (Ryc. 16E). Białko PABP1 wiąże mRNA i bierze udział w procesach takich jak: transport mRNA do i z jądra, degradacja mRNA, translacja i stabilność mRNA (Gray et al., 2015). W mózgu myszy 8 miesięcznych myszy Ki150 daje się obserwować silniejszy sygnał fluorescencji tego białka w komórkach Purkiniego niż w mózgu myszy C57 (Ryc. 16F).

Uzyskane wyniki wskazują na intensywnie zachodzący proces translacji w mózgu myszy Ki150 jednak należy mieć na uwadze, że są to zaledwie wstępne wyniki i wymagają potwierdzenia innymi bardziej bezpośrednimi metodami badawczymi.



Rycina 16. Zmiany w poziomach markerów translacji na skrawkach mózgow 8 miesięcznych myszy Ki150. Barwienie immunofluorescencyjne skrawków mózgow Ki150 z pomocą przeciwciał nacelowanych na procesie translacji. Barwienie przeciwciałem wykrywającym fosforylowane białko S6 wykazało obserwowalnie wyższy poziom sygnału (kolor zielony, królicze przeciwciało wykrywające fosforylacje (Ser235/236) białka rybosomalnego S6) w móźdżku, hipokampie i korze mózgowej (kolor niebieski: Hoechst 33342) (A-C). Białe strzałki wskazują miejsca intensywnej fosforylacji S6. W istocie białej móźdżku na skrawkach mózgow Ki150 mysie przeciwciało wykrywające białko Fxr2 (kolor zielony) wykazuje silniejszy sygnał fluorescencji pewnych komórek (zaznaczone białą strzałką) w bezpośrednim sąsiedztwie agregatów zmutowanej ATXN3 (kolor czerwony, królicze przeciwciało wykrywające ATXN3, (kolor niebieski: Hoechst 33342)) (D). Również w istocie białej móźdżku na skrawkach mózgow Ki150 mysie przeciwciało anti-Fmr1 wykrywa komórki pozytywne na Fmr1 (kolor zielony) również w sąsiedztwie inkluzji ATXN3 (kolor czerwony) zaznaczono białą strzałką, kolor niebieski: Hoechst 33342 (E). Barwienie immunofluorescencyjne białka Pabpc1 wskazuje na silniejszy poziom fluorescencji (kolor zielony) w komórkach Purkiniego na skrawkach mózgow myszy Ki150 w porównaniu do myszy kontrolnych. Jądra komórkowe są zabarwione z pomocą Hoechst 33342 (kolor niebieski) (n=3).

4.4. Określenie interakcji normalnej i zmutowanej ATXN3 w modelu KI150

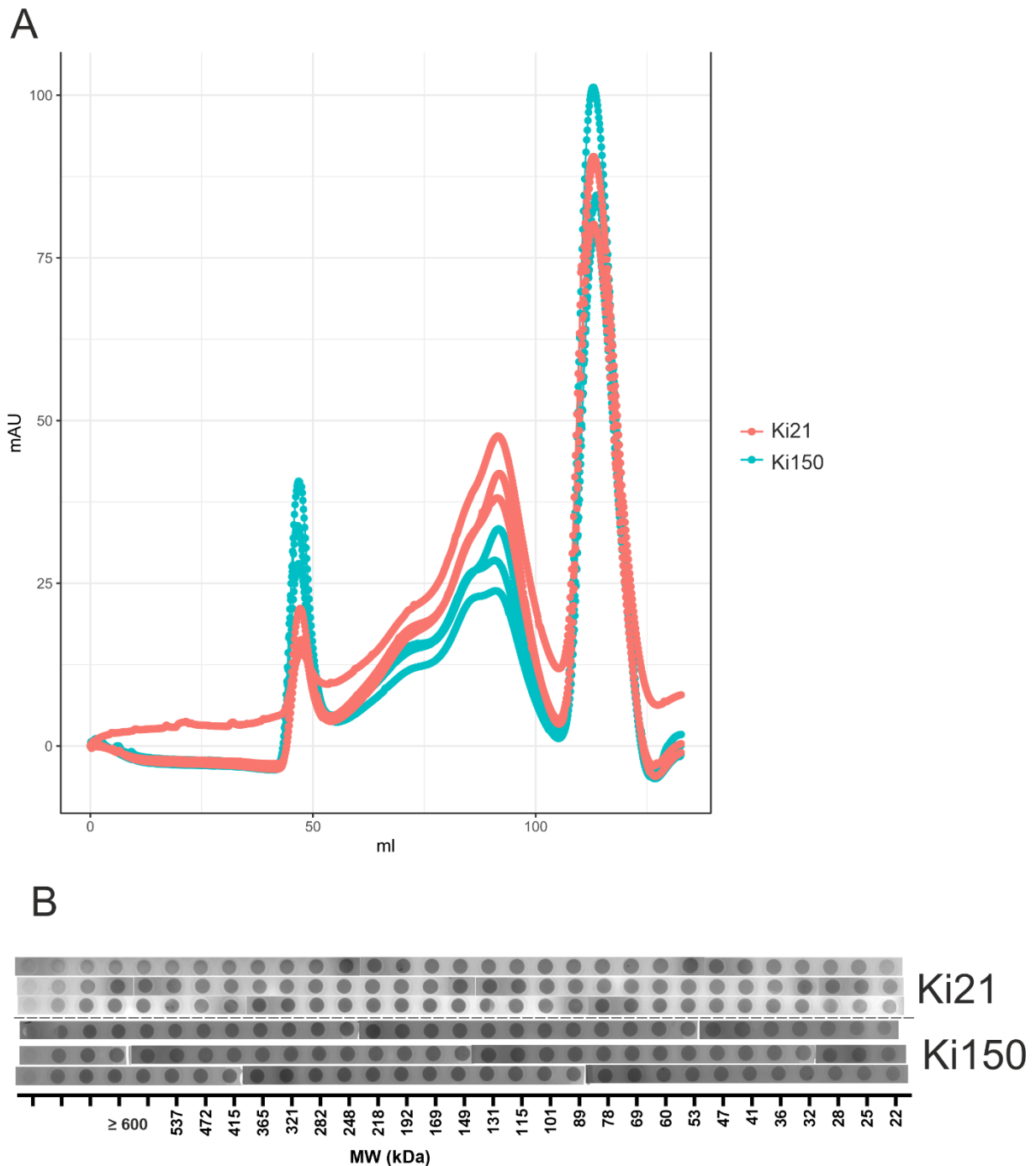
4.4.1. Analiza proteomiczna kompleksów białkowych

Wcześniej wykazaliśmy, że obecność zmutowanego białka ATXN3 z modelu Ki91 wpływa na wiele zmian w poziomach różnych białek i ich fosforylacji. Ponieważ ATXN3 z Ki150

zawiera bardzo wydłużony trakt poliQ i powoduje obecność gęstych inkluzji w komórkach mózgow, postanowiliśmy scharakteryzować jej interakcje białkowe, które mogą być kluczowe dla zmian poziomów szerokiej gamy białek w mózgu. Określiłem, jak normalne i zmutowane białko ATXN3 oddziałuje z innymi białkami oraz jak duże i stabilne są kompleksy wytwarzane przez ATXN3 zawierającą dużą domenę poliQ. Aby przeanalizować wpływ zmutowanej lub normalnej ATXN3 na tworzenie kompleksu, wykorzystaliśmy fakt, że nasze modele zawierają homozygotyczne allele (Ki150/150 lub Ki21/Ki21) co pozwala na selektywne badanie interakcji w mózgu dla obu form ATXN3.

Charakterystyka eksperymentalna białek często obejmuje dwie lub więcej metod chromatograficznych zwanych ortogonalnymi. W naszym układzie zastosowaliśmy wielowymiarową metodę chromatograficzną w natywnych warunkach do rozdzielania chromatograficznego lizatów białkowych mózgu myszy Ki150 zawierających ludzką zmutowaną ATXN3 z około 150Q i myszy Ki21 z ludzką normalną ATXN3 21Q. Najpierw rozdzieliłem białka według ładunku za pomocą chromatografii jonowymiennej (ang. *ion-exchange chromatography*, IEC), a następnie według wielkości za pomocą chromatografii wykluczania (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC). Moim celem było (i) zbadanie dystrybucji białka ATXN3 we frakcjach SEC, (ii) zidentyfikowanie białek które są wymywane z kolumny razem z ataxin-3 oraz (iii) ocena właściwości fizycznych kompleksów zmutowanej i normalnej ATXN3. W IEC kompleksy ATXN3 były obecne we frakcji wypływającej (ang. *flow-through*), prawdopodobnie ze względu na stosunkowo wysoką siłę jonową buforu PBS. Niemniej jednak IEC usunęła tłuszczy i kwasy nukleinowe, co było niezbędnym krokiem przed SEC. Frakcje SEC zawierały natywne kompleksy białkowe z zachowaną interakcją dzięki zastosowaniu buforu PBS-EDTA do SEC. Całkowite stężenie białka w wybranej frakcji (A280) było różne dla obu genotypów. Stężenie białka we frakcjach ≥ 600 kDa było wyższe w próbkach Ki150, natomiast stężenie białka we frakcjach 101-78 kDa było wyższe w próbkach Ki21 (Ryc. 17A). Przeprowadzono analizę białek z wykorzystaniem nanoszenia białek na membranę nitrocelulozową (tzw. dot-blot) z użyciem pompy próżniowej i wybarwiono immunologicznie przeciwciałami wykrywającymi ATXN3 w celu określenia dystrybucji ATXN3 we frakcjach białkowych z mózgow Ki150 i Ki21 (Ryc.17B i 18A). Przygotowano wykres zależności całkowitej gęstości optycznej (IOD) sygnału ATXN3 z każdej frakcji od średniej masy cząsteczkowej białek obliczonej na podstawie rozdzielania SEC białek wzorcowych dla każdej z frakcji. Na wykresie

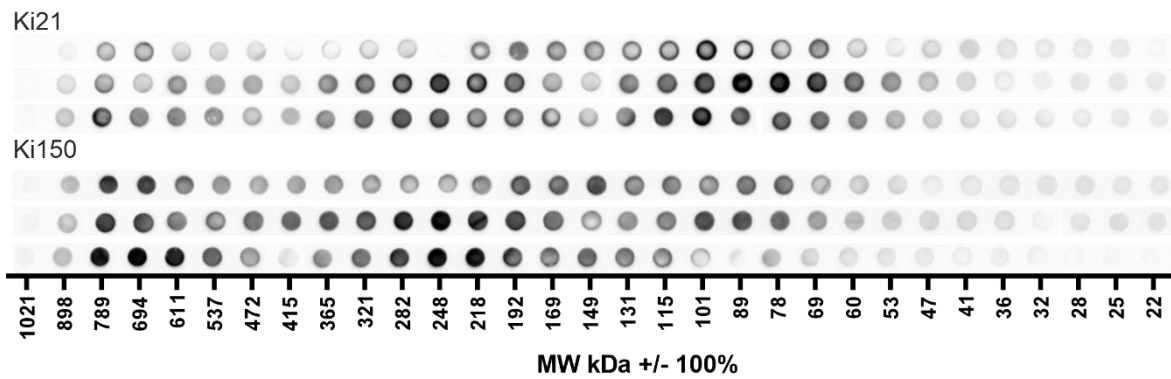
widoczne są trzy piki najwyższego sygnału ATXN3 wskazujące na podwyższoną obecność białka ATXN3 w (i) ≥ 600 kDa, (ii) 282-192 kDa frakcjach białkowych w obu genotypach oraz wyraźnie wyższy poziom prawidłowej ATXN3 w (iii) frakcja 101-78 kDa. Przewidywane rozmiary białek we frakcjach nie są równoważne masie cząsteczkowej dla monomerycznej prawidłowej ATXN3 (48 kDa dla Ki21) i zmutowanej ATXN3 (95 kDa dla Ki150), co sugeruje, że ATXN3 jest wymywana z kolumny jako składnik kompleksów z innymi białkami lub tworzy oligomery.



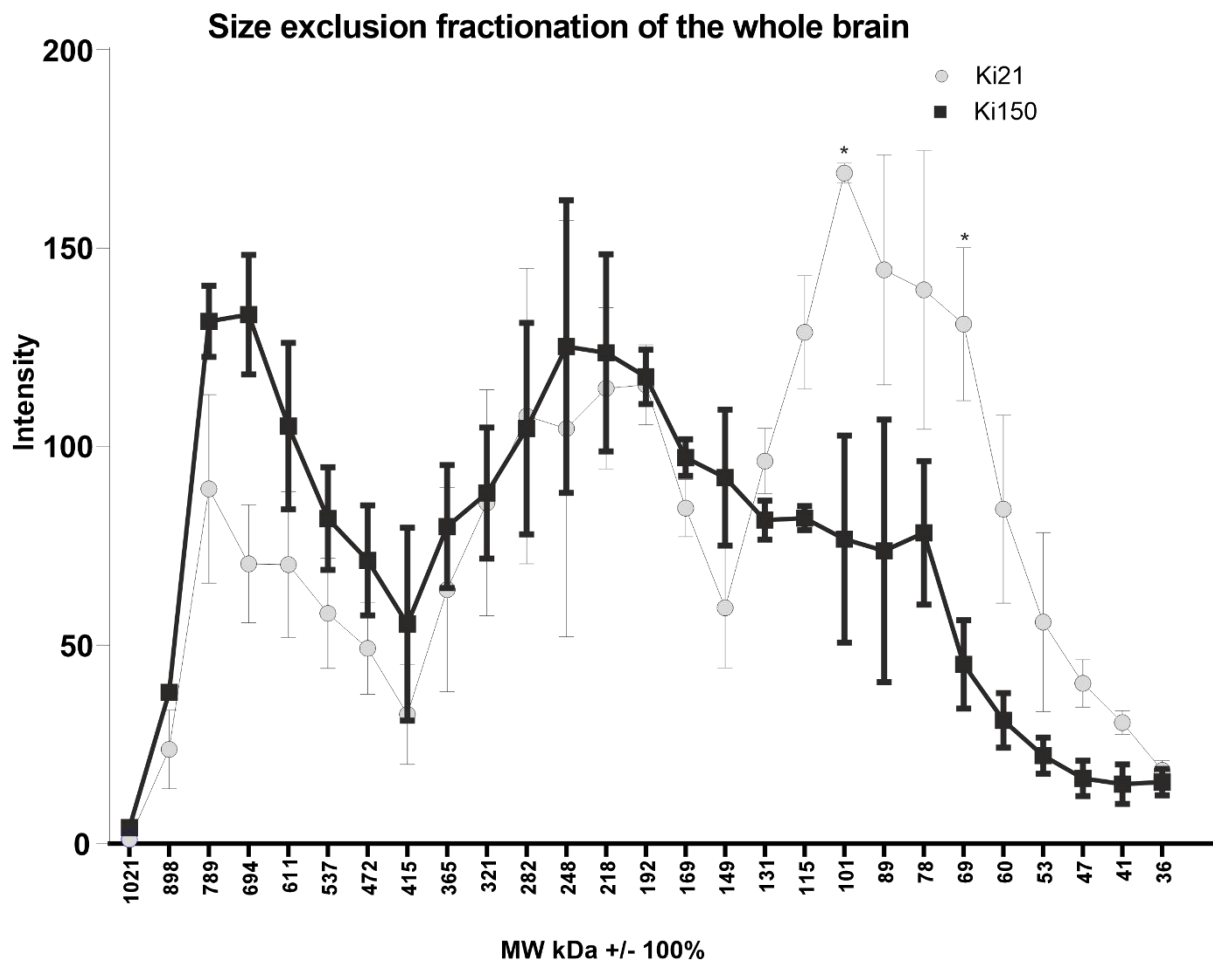
Rycina 17. Chromatografia *size exclusion* (SEC) lizatów całego mózgu myszy Ki21 i Ki150. (A) Profil elucji SEC (A280 w mAU). (B) Próżniowy dotblot z barwieniem ponceau frakcji białkowych odpowiadających

zakresowi wielkości > 600-22 kDa). Analizę SEC przeprowadzono przez wstrzyknięcie objętości próbki 2,2 ml na kolumnę Superdex 200 16/60 podłączoną do systemu chromatograficznego AKTA. Całkowita liczba powtórzeń biologicznych: n = 6, n = 3 na genotyp.

A



B



Rycina 18. ATXN3 jest dystrybuowana w dużych kompleksach białkowych po frakcjonowaniu chromatograficznym. (A) Lizaty całego mózgu po frakcjonowaniu kompleksów białkowych metodą chromatografii wykluczania (SEC) rozdzielono na podstawie wielkości w zakresie (1021-22 kDa) i podzielono na 31 frakcji. Membrany nitrocelulozowe inkubowano z przeciwciałem przeciw ATXN3. Sygnał wskazuje na dystrybucję ATXN3 we frakcjach kompleksów białkowych w próbkach mysich

mózgów Ki21 i Ki150. Na podstawie wyników dot blot możemy wyróżnić 3 piki ze szczególnie wysokim poziomem białka ATXN3. Pierwszy (898-789 kDa), drugi (248-192 kDa) i trzeci (101-78 kDa). (B) W trzecim pikie (101-78 kDa) poziom mutanta Atxn3 w mózgu Ki150 jest znacznie niższy niż w kontrolnych liszatkach mózgowych Ki21. Test t dla dwóch prób (*p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001), słupki błędów: SEM, n=3.

4.4.2. Frakcje zawierające tylko zmutowaną i tylko normalną ATXN3 wykazują zmieniony poziom białek tworzących wielkocząsteczkowe kompleksy

Zbadałem interakcje proteomu w obecności zmutowanej lub normalnej ATXN3, aby wskazać potencjalnych partnerów białkowych w mózgu homozygotycznych Ki21 i Ki150. Zebrane frakcje 282-192 kDa i 115-89 kDa pozytywne pod względem białka ATXN3 (metodą dot blot) poddano identyfikacji białka i oznaczeniu ilościowemu za pomocą spektrometrii mas (MS). Frakcja (i) \geq 600 kDa okazała się nieodpowiednia do analizy MS, ponieważ może zawierać agregaty niedostępne dla trypsyny oraz wysoką zawartość zagregowanych fragmentów peptydowych stanowiących tło widma MS. Jednak porównując próbki Ki21 i Ki150 z frakcji (ii) i (iii), zidentyfikowaliśmy pewne białka ($p < 0,05$; Tabela 7 i 8 oraz Ryc. 19), które są częścią określonych kompleksów białkowych. We frakcjach 282-218 kDa stwierdziłem, że poziom białek CCT5 i 6, Tcp1 zaangażowane w kompleks Chaperon Containing TCP1 (kompleks CCT; kompleks T) odpowiedzialne za regulację fałdowania i agregacji był silnie obniżony we frakcjach mózgu Ki150 w porównaniu z frakcjami Ki21. Również poziom białek Ap2a1 i Aak1 (kinaza białkowa związana z AP2), które są częścią kompleksów białka adaptorowego 2 i wraz z Synj1 są odpowiedzialne za transport pęcherzykowy, był obniżony we frakcje Ki150. Najbardziej obniżony poziom białka we frakcjach mózgu Ki150 wykazały kinazy Camk2a i Camk2b odpowiedzialne za homeostazę wapnia. Białka wysoko wzbogacone we frakcjach mózgowych Ki150 115-89 kDa to Hnrnpk i Eif4a2 zaangażowane w proces inicjacji translacji. Zidentyfikowano również wysoce podwyższony poziom białek Gad2, enzym syntetyzujący GABA, Calb2, białko wiążące wapń i białka PCP2, wszystkie charakterystyczne dla neuronów GABAergiczych, takich jak neurony Purkiniego w mózdku.

Tabela 7. Białka deregulowane we frakcjach kompleksów białkowych 282-218 kDa

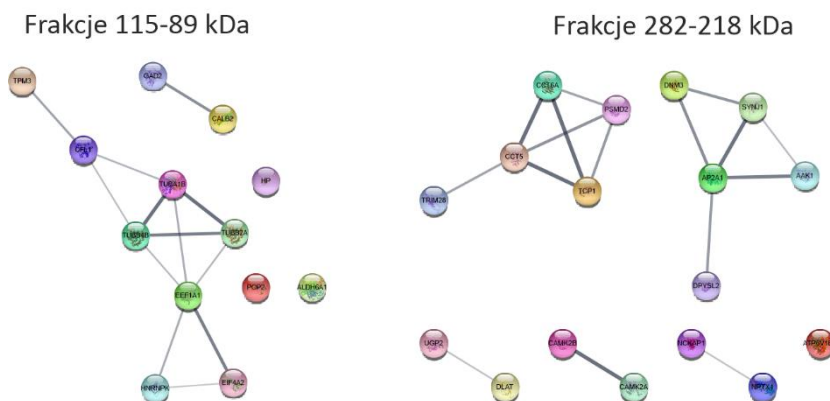
Gene symbol	Gene name	Student's T-test p-value	Student's T-test Difference	Mol. weight [kDa]
Camk2b	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	7.56E-05	-18.72	56.45

Camk2a	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	3.10E-04	-18.08	54.11
Nckap1	Nck-associated protein 1	0.0061	-11.79	128.78
Cct6a	T-complex protein 1 subunit zeta	0.0061	-12.01	58.00
Aak1	AP2-associated protein kinase 1	0.014	-12.91	103.35
Nptx1	Neuronal pentraxin-1	0.022	-9.11	47.12
Ap2a1	AP-2 complex subunit alpha-1	0.022	-9.30	107.66
Psm2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	0.022	-9.29	100.20
Dlat	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex. mitochondrial	0.022	-9.76	67.94
Tcp1	T-complex protein 1 subunit alpha	0.022	-9.83	60.45
Synj1	Synaptojanin-1	0.025	-10.57	144.59
Dpysl2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	0.04	-0.59	62.28
Ugp2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.043	-10.68	56.98
Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon	0.04	-9.89	59.62
Atp6v1b2	V-type proton ATPase subunit B. brain isoform	0.044	-0.50	56.55
Dnm3	Dynammin-3	0.047	-10.01	97.27
Trim28	Transcription intermediary factor 1-beta	0.0498	-9.14	88.85

Tabela 8. Białka deregulowane we frakcjach kompleksów białkowych 115-89 kDa.

Gene symbol	Gene name	Student's T-test p-value	Student's T-test Difference	Mol. weight [kDa]
Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1	1.69E-04	0.53	50.1
Ighg2c	Immunoglobulin heavy constant gamma 2C	2.90E-03	-13.78	44.1
Igkc	Immunoglobulin kappa constant	0.009	-13.58	11.9
Tubb2a	Tubulin beta-2A chain	0.019	0.42	49.9
Tuba1b	Tubulin alpha-1B chain	0.021	0.31	50.2
Cfl1	Cofilin-1	0.028	0.22	18.6
Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0.032	9.17	43.2
Aldh6a1	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]. Mitochondrial	0.033	-8.26	57.9
Gad2	Glutamate decarboxylase 2	0.033	-7.95	65.2
Tpm3	Tropomyosin 3	0.033	8.94	29.0
Pcp2	Purkinje cell protein 2	0.036	10.32	10.8

Tubb4b	Tubulin beta-4B chain	0.048	0.37	49.8
Calb2	Calbindin 2. isoform CRA_a	0.049	6.77	31.4
Eif4a2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	0.050	6.91	41.3
Hp	Haptoglobin	0.050	7.77	38.8



Rycina 19. Sieci białek tworzących kompleksy z ATXN3 identyfikowane metodą chromatografii jonowymiennej (IEC) i wielkości metodą chromatografii wykluczania (SEC), a następnie LC-MS/MS. Sieci zostały wygenerowane przy użyciu bazy danych String i klastrowania (<https://string-db.org/>).

4.5. Interaktry zmutowanej ATXN3 można przyporządkować do funkcjonalnych grup białek związanych z mitochondriami i translacją

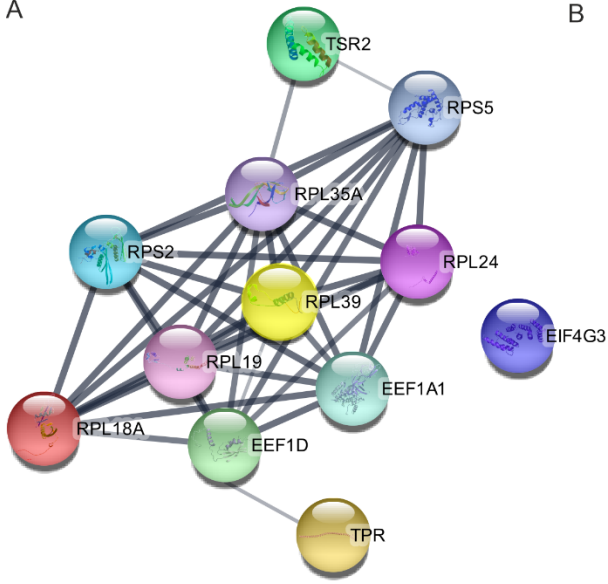
Zidentyfikowane kompleksy molekularne takie jak CCT, AP2 i rodzina kinaz wapniowych, zazwyczaj wiążą różne inne białka komórkowe, które modulują ich funkcje fizjologiczne. Dlatego zastosowałem koimmunoprecypitacje ze specyficznym przeciwciałem przeciw ATXN3 na kulkach magnetycznych w celu zidentyfikowania grup białek specyficznych oddziałujących z AXTN3. Postawiliśmy sobie za cel korelację krzyżową naszych odkryć dotyczących dużych kompleksów molekularnych oraz dalszą charakterystykę mechanizmów fizjologicznych i patogennych stojących za złożonymi interakcjami zmutowanej i normalnej ATXN3 w tkance mózgowej. Koimmunoprecypitacja, a następnie identyfikacja białek oddziałujących ze zmutowaną i prawidłową ATXN3 i ocena ilościowa obejmowały mózgi w stadium 2 miesięcy mysich modeli Ki21 oraz Ki150.

Interakcje, które mogą wynikać z wiązania białek bezpośrednio do dynabeads lub niespecyficznego wiązania do immunoglobulin, zostały zidentyfikowane i wykluczone z analizy za pomocą koimmunoprecypitacji w lizatach mózgowych z dynabeads sprzężonymi z mysim kontrolnym przeciwciałem IgG. Po wykluczeniu niespecyficznie związanych białek z wyników

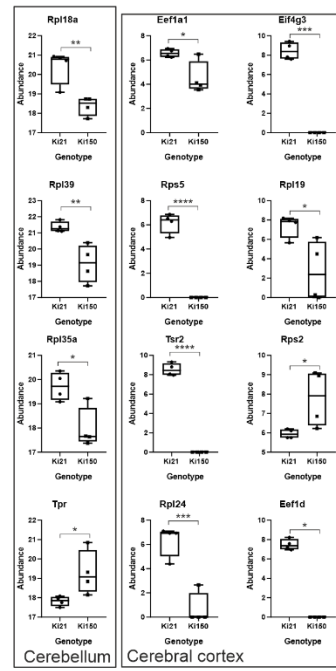
eksperymentów proteomicznych, zidentyfikowałem 410 i 34 interaktorów ATXN3 odpowiednio w korze mózgowej i mózdzku, które wykazywały znacząco zaburzoną interakcję w 2-miesięcznych myszach Ki150 vs Ki21 ($p < 0,05$; test T).

Zidentyfikowałem białka należące do 3 klastrów funkcjonalnych, które wykazywały znaczne osłabienie lub nawet brak interakcji ze zmutowaną ATXN3 w Ki150 vs Ki21. Pierwszy klaster białek zawierał białka związane z translacją zarówno w mózdzku (Rbm8a, Rpl39, Eef1a1, Rpl18a, Tpr, Rpl35a, Rps2, Hnrnpd, Rpl19, Eif5a;) i korze mózgowej (Eef1a2, Eef1d, Eif4g3, Tsrps2, Rpl24). Sieć wzajemnych połączeń funkcjonalnych białek wiążących ATXN3 została zademonstrowana przez narzędzie STRING (Ryc. 20A; PPI $p < 10e-16$). Diagramy przedstawiają względne poziomy białek, po oznaczeniu ilościowym za pomocą proteomiki w Ki150 vs Ki21, odzwierciedlając zmianę lub nawet całkowitą utratę interakcji białka ze zmutowaną ATXN3 w porównaniu do prawidłowej ATXN3 (Rycina 20B i D; $p < 0,05$; test t dwóch próbek). Kolejne dwa klastry funkcjonalne były związane z mitochondriami i ich transportem w neuronach. Zmutowana ATXN3 z mózgowi Ki150 wykazywała bardzo słabą interakcję w porównaniu z normalną ATXN3 z mózgowi myszy Ki21 z białkami mitochondrialnymi w mózdzku (Cyc1, Ndufa5 i Ndufa8) i korze mózgowej (Atp5k, Acly, Cox7c, Cox6b1, mt-Co2, Ndufa10, Ndufa12, Ndufb10, Ndufb4, Ndufs4, Ndufs7, Pdhb, Slc25a11, Hadhb, Vdac3) (Ryc 20A i C $p < 0,05$; T-test; sieć STRING $p < 10e-16$). Trzecia grupa to białka o zmienionych interakcjach ze zmutowaną ATXN3 w porównaniu z normalną ATXN3, które należą do zestawu funkcjonalnego związanego z transportem mitochondriów (Letm1, Sfxn3, Vdac2, Slc25a12, Gdap1, Ywhaq, Ndufa13, Ywhab, Atp5mf, Atp5me, Camk2a, Slc25a4, Slc25a22, Opa1, Csnk2a2, Vps35, Atp5pd, Atp5f1a, Atp5pb, Atp5f1c, Hsp90aa1, Aifm1) (Ryc. 19E i F $p < 0,05$; T-test STRING; $< 10e-16$).

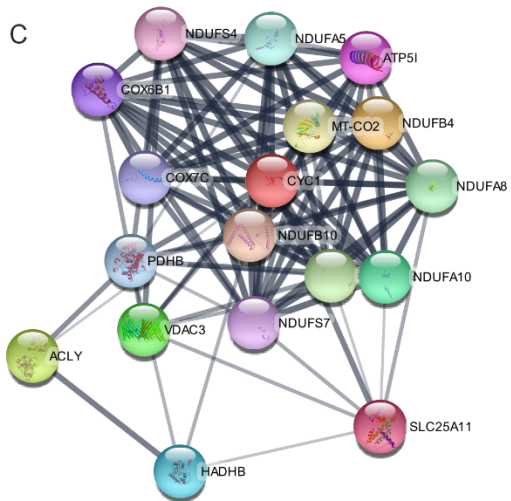
A



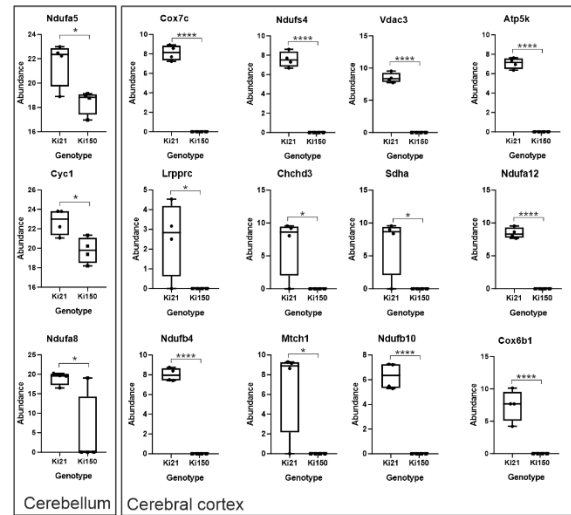
B



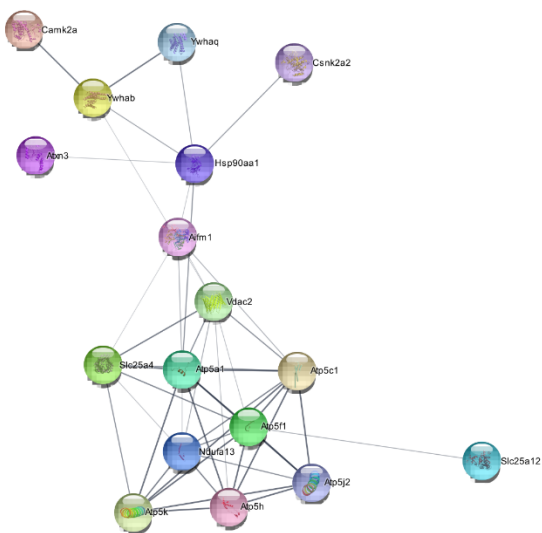
C



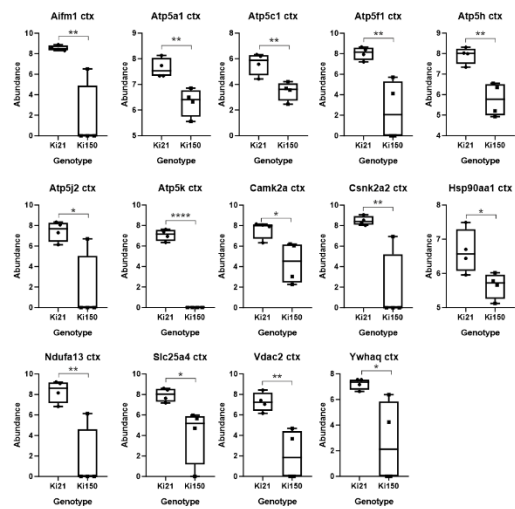
D



E



F



Rycina 20. Analiza proteomiczna białek oddziałujących ze zmutowaną i prawidłową ATXN3 z wykorzystaniem LC-MS/MS ujawnia 3 zestawy białek o znacznie osłabionym oddziaływaniu ze zmutowaną ATXN3 w mózdzku i korze mózgowej Ki150. Sieć białek wykazujących osłabioną interakcję ze ATXN3 w mózdzku (A i B) i korze mózgowej (A, B i C) myszy Ki150 wygenerowano przy użyciu bazy danych String (<https://string-db.org/>). Pierwszy klaster zawierał białka związane z Zaburzenia w prawidłowym procesie i regulacji syntezy acją w mózdzku (A, B) i korze mózgowej (A, B). Zmutowana ATXN3 wykazywała bardzo słabe interakcje z białkami mitochondrialnymi w mózdzku Ki150 (C i D) i korze mózgowej Ki150 (C i D). Trzeci zestaw białek o zmniejszonej interakcji ze zmutowaną ATXN3 (Q150) w korze mózgowej bierze udział w transporcie mitochondrialnym (E i F). Test t dla dwóch prób ($p \leq 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); słupki błędów: SEM, n=4.

4.6. Interakcja normalnej i zmutowanej ATXN3 z białkami proteasomu

Badając białkowych partnerów ATXN3 we wszystkich eksperymentach zidentyfikowaliśmy białka proteasomu wiążące się do normalne i zmutowanej formy białka. Interakcje te nie ujawniły różnicowego wiązania białek proteasomu do obu form ATXN3. Połączenie danych proteomicznych z eksperymentów chromatograficznego frakcjonowania oraz koimmunoprecypitacji umożliwia wytypowanie przypuszczalnie kluczowych podjednostek proteasomu które wiążą białko ATXN3. Tabela 9 przytacza porównanie wszystkich jakościowo zidentyfikowanych podjednostek proteasomu w poszczególnych eksperymentach. Wyniki sugerują, że ATXN3 silnie oddziałuje z białkami (podjednostki 20S), zarówno z podjednostkami α oraz β . Jeśli chodzi o białka pozostałych podjednostek wyniki wskazują na interakcję z Psm1 oraz Psm2 w mózdzku w eksperymencie koimmunoprecypitacji.

Tabela 9. Oddziaływanie białka ATXN3 z podjednostkami proteasomu.

26S proteasome	Dynabeads kora mózgowa	Dynabeads mózdzek	Frakcje Ki150 282-218 kDa
ADRM1			
PSMA1			
PSMA2	✓	✓	✓
PSMA3	✓	✓	✓
PSMA4		✓	
PSMA5		✓	
PSMA6	✓	✓	
PSMA7		✓	
PSMA8	✓		
PSMB1		✓	✓
PSMB10			
PSMB2		✓	
PSMB3			
PSMB4		✓	✓
PSMB5			✓
PSMB6	✓	✓	✓
PSMB7			✓
PSMB8			
PSMB9		✓	
PSMD1		✓	
PSMD10			

PSMD11			
PSMD12			
PSMD13			
PSMD14			
PSMD2		✓	
PSMD3			
PSMD4			
PSMD5			
PSMD6			
PSMD7			
PSMD8			
PSMD9			
Brak interakcje ATXN3 z białkami ADRM1, SEM1, wszystkimi PSME i PSMC			

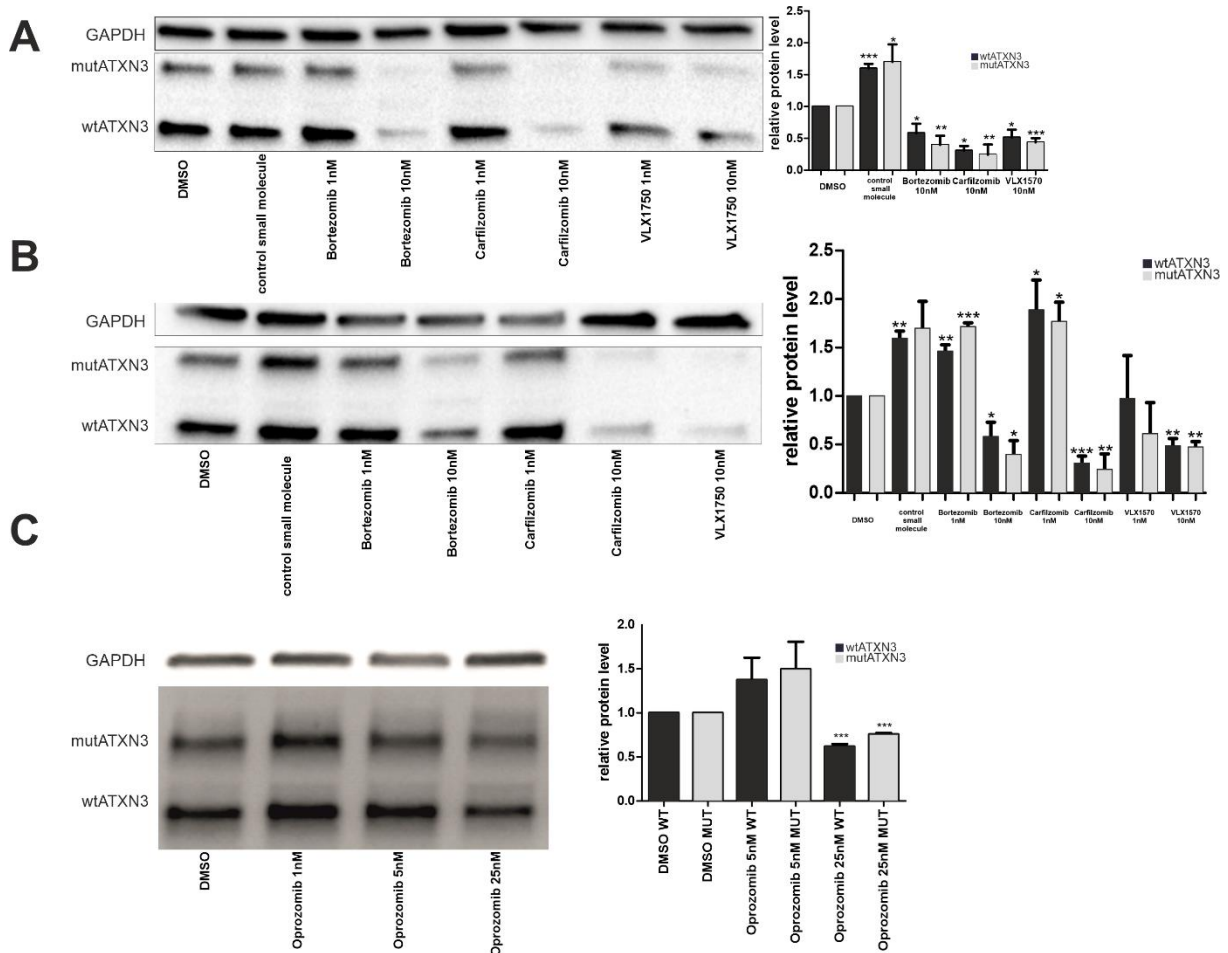
4.7. Badanie nowej strategii terapeutycznej nakierowanej na proteasom zmierzającej do obniżenia zmutowanego białka w SCA3/MJD

Białko ATXN3 w obydwu formach silnie wiąże się ze specyficznymi podjednostkami α i β proteasomu oraz pełni funkcję deubikwitynazy i bierze udział w ścieżkach degradacji białek (rozdziały 1.4.4 i 1.6.4). Wyszliśmy hipotezę, że specyficzne przerwanie interakcji ATXN3 z podjednostkami α i β mogłoby doprowadzić do pewnych efektów pokazujących potencjalne cele terapeutyczne w SCA3. Co bardzo interesujące, istnieją specyficzne związki niskocząsteczkowe, które wiążą się z tymi podjednostkami, i które są już zarejestrowanymi lekami przeciwnowotworowymi, których działanie polega na inhibicji proteasomu. Z tego względu zaproponowano badanie następujących związków niskocząsteczkowych: bortezomib, karfilzomib, VLX1570 lub oprozomib do celowanej w terapii SCA3.

Przed przystąpieniem do właściwego eksperymentu, zoptymalizowałem stężenia podawanych związków. W trakcie projektowania eksperymentów symulowano podawanie leku w odstępach czasowych lub stale (Ryc. 2). W przypadku obu strategii zastosowanie bortezomibu, karfilzomibu i VLX170 w stężeniu 1 nM i 10nM spowodowało znaczące obniżenie poziomu zmutowanej i prawidłowej ATXN3 w komórkach pacjentów. W przypadku oprozomibu w stężeniu 25nM przez 72h nastąpiło obniżenie poziomu zarówno zmutowanej jak i prawidłowej ATXN3 (traktowanie przez 10 dni nie było testowane).

W trakcie przeprowadzonych badań określiłem efektywności działania bortezomibu, carfilzomibu, VLX1570 oraz oprozomibu na obniżenie poziomu zmutowanego białka ATXN3 w kulturze komórkowej fibroblastów wyprowadzonych od pacjentów ze SCA3. Badania prowadzono w odniesieniu do referencyjnego inhibitora proteasomu MG132, który wiąże się do innych podjednostek proteasomu.

W efekcie, poziom patogennego, zmutowanego białka ATXN3 w komórkach pacjentów z SCA3 ulega znacznemu obniżeniu.



Rycina 21. Inhibitory białek proteasomalnych, Bortezomib i Carfilzomib, oraz inhibitor USP14 VLX1570 (kontrolujący deubikwitynazę proteasomalną PSMD14), obniżają toksyczność zmutowanego białka ATXN3. Linie komórkowe ludzkich fibroblastów SCA3 traktowano przez 72 godziny (A i C) i 10 dni (B) wskazanymi stężeniami inhibitorów i kontrolą DMSO. Efekt VLX1570 był mniej wyraźny. Test t dla dwóch prób ($p \leq 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); słupki błędów: SEM, $n=4$

5. Dyskusja

Celem badań mojej pracy doktorskiej było wykrycie dotychczas niepoznanych obszarów patogenezы SCA3, stworzenie przedklinicznego mysiego modelu SCA3 do badań skutecznej terapii dla pacjentów oraz zaproponowanie strategii terapeutycznej skierowanej na zmiany molekularne, które są przyczyną tej choroby.

W niniejszej pracy zdefiniowałem wczesne objawy molekularne SCA3/MJD w homozygotycznych mysich modelach knock-in Ki91 i Ki150 które naśladują genetyczną i patologiczną sytuację SCA3 u pacjentów, w tym fazę przed objawową i późniejszy początek choroby. Korzystając z modelu Ki91, próbowałem odpowiedzieć na pytanie, jakie zdarzenia molekularne mają miejsce przed pojawieniem się symptomów choroby w mózgu myszy przed objawowych SCA3, poprzez zdefiniowanie transkryptomu mózgu najpierw u 2-miesięcznych myszy SCA3, a później w wieku 10–14 miesięcznych zwierząt SCA3. Moim celem było zidentyfikowanie molekularnych czynników prowadzących do rozwoju choroby, które mogą być widoczne we wczesnym okresie życia i we wczesnym stadium patogenezy SCA3, by wykluczyć wpływ wtórnych objawy molekularnych pochodzących z dysfunkcji neuronów i ich śmierci w późniejszym okresie patogenezy i starzenia. W mojej pracy szczególną uwagę przywiązałem do mózdzku i kory mózgowej jako ważnych struktur mózgu w których mogą mieć miejsce wczesne objawów SCA3. Ostatnie odkrycia podkreślają rolę komunikacji między korą mózgową a mózdzkiem jako jedną z cech patologicznych SCA3 (Lomonosova and Chinnadurai, 2008; Lu et al., 2017; Schmidt et al., n.d.; Wang et al., 2015).

Pierwszym istotnym odkryciem jest zbadanie proces początku choroby w SCA3/MJD na poziomie transkrypcyjnym, splicingowym i agregatów białka ATXN3 w mózgu. Wykazałem, że zwierzęta homozygotyczne Ki91 jeszcze przed pojawieniem się fenotypu choroby nie wykazują zmian transkrypcyjnych związanych ze zmutowaną ATXN3 w tkance mózdzku i kory mózgowej w wieku 2 miesięcy. W tym czasie nie wykazują żadnych zmian behawioralnych jednak w mózdzku i korze występują komórki z jądrową lokalizacją agregatów zmutowanej ATXN3 (Wiatr et al., 2019). Ponadto wykazałem, że objawowe myszy ki91 w wieku 10-14-miesięcy wykazują zmiany transkrypcyjne zarówno w mózdzku, jak i korze mózgowej, a dojrzałe pomiotyczne hodowle neuronów wyprowadzone z linii iPSC pacjentów SCA3 również zawierają pewne zmiany transkrypcyjne zidentyfikowane u 10- 14-miesięcznych zwierzętach Ki91. Rodzaj kultur neuronalnych, które były użyte, okazał się pozytywny dla GABA i GAD67 i pochodził z komórek, które wykazują profil różnicowania w kierunku tyłomózgowia (Koch et al., 2009), podczas gdy zmiany zidentyfikowane u myszy występują w korze mózgowej i mózdzku. Na przykład poziom *Olig1* jest podwyższony zarówno w tkance myszy, jak i komórkach nerwowych pochodzących z MJD iPSC, ale istnieje wiele różnych komórek (w tym różne typy neuronów), które ewoluują z komórek progenitorowych OLIG-dodatnich

w zależności od regionu mózgu. W związku z tym podobne zmiany ekspresji w Ki91 jak i w neuronach z iPSC pacjentów niekoniecznie muszą wskazywać na te same zmiany na poziomie komórkowym. Porównanie danych z tyłomózgowia myszy WT i Ki91 (most, rdzeń) z komórkami nerwowymi pochodzącymi z MJD iPSC i kontrolami izogenicznymi wymaga dalszych badań. Te odkrycia pokazują, że możliwa sekwencja zdarzeń, która prowadzi do pełnoobjawowej choroby mózgu, składa się ze zmian na wielu poziomach molekularny przy początkowym braku zmian mRNA zależnych od zmutowanej ATXN3. Te wczesne wydarzenia mogą dalej prowadzić do zmian transkrypcyjnych w późniejszym wieku. Dlatego zmiany transkrypcyjne w SCA3 można sklasyfikować jako wtórne i cięższe objawy choroby (Wiatr et al., 2019). Wcześniejsze doniesienia wykazały, że proces patogenetyczny choroby SCA3 obejmuje względnie bezpośrednie zmiany transkrypcyjne poprzez wiązanie zmutowanej ATXN3 z chromatyną i czynnikami transkrypcyjnymi (Chou et al., 2014; de Rezende et al., 2015; Evert et al., 2003). Ekspresję ATXN3 w komórkach i tkankach myszy Ki91 jest powszechna dlatego nie można wykluczyć bezpośredniego wpływu ATXN3 na zmiany transkrypcyjne, które są obecne tylko w wybranych komórkach w mózgu oraz że rozdzielczość NGS na poziomie tkanek nie pozwala na identyfikację zmian transkrypcyjnych ograniczonych do niewielkiej zdefiniowanej populacji komórek. Innym ważnym wyjaśnieniem braku zmian transkrypcyjnych na etapie przedobjawowym jest bezpośredni lub pośredni wpływ ATXN3 na zmiany transkrypcyjne, które rozpoczynają się w późniejszym dorosłym życiu jako odpowiedź na inny czynnik, taki jak starzenie się, stres, uszkodzenie DNA lub interakcje białkowe. Zmiany transkrypcyjne w SCA3 były dotychczas badane w objawowej fazie choroby, np. we krwi pacjenta lub w starszej tkance mózgowej pobranej z modeli mysich (Kazachkova et al., 2017; Toonen et al., 2018). Jeden z interesujących wyników naszej analizy transkryptomu u starszych zwierząt Ki91 sugeruje, że transkrypty charakterystyczne dla prekursorów oligodendrocytów mają wyższą ekspresję u myszy Ki91. Może to sugerować, że demielinizacja i reakcje naprawy mieliny pojawiają się później w przebiegu choroby. Ponieważ aktywność neuronów sprzyja mielinacji (Gibson et al., 2014), początek demielinacji w SCA3 może być wynikiem zaburzenia funkcji neuronów i aksonów, które następuje w późniejszym przebiegu choroby. Z drugiej strony podwyższony poziom Olig1 sugeruje pewne nieprawidłowości rozwojowe w SCA3. Jedną z możliwości może być opóźnienie różnicowania puli progenitorów Olig1-dodatnich, co mogłoby zakłócić mielinację. Z pewnością dodatkowe informacje dotyczące patogenezy wniosłaby analiza transkryptomu pojedynczych komórek mózgow SCA3. Moje obserwacje

zmian transkrypcyjnych u pre- i post-symptomatycznych zwierząt wskazują, że obserwowane zmiany transkrypcyjne są związane z uszkodzeniem komórek, a nie bezpośrednio z efektami działania zmutowanego białka ATXN3. Ponieważ zmiany transkrypcyjne pojawiają się po raz pierwszy u myszy objawowych (Wiatr et al., 2019), możemy wnioskować, że zmiany w mRNA pojawiają się w mózgu prawdopodobnie wtedy, gdy kompensacja degeneracji i utraty komórek nie jest już możliwa i jest rezultatem trwającego procesu chorobowego.

Białka zawierające długie ciągi poliQ mają plejotropowe funkcje, nabywają nowe lub tracą funkcje oryginalnego białka (McLoughlin et al., 2020). Deubikwitynaza ATXN3 i jej zmutowana forma są przykładem proteazy zaangażowanej w wiele procesów komórkowych związanych z degradacją białek. Taka plejotropia znajduje odzwierciedlenie w bardzo szerokim wpływie zmutowanej ATXN3 na proteom i fosfoproteom (Wiatr et al., 2021, 2019). Dlatego bardzo trudno jest wskazać sieć kluczowych mechanizmów patogennych i znaleźć skuteczną terapię. Ponadto dostępne modele mysie w badaniach poliQ nie są optymalne pod względem braku solidnej kombinacji cech przedklinicznych, motorycznych, molekularnych i neuropatologicznych. W istniejących modelach mysich trudno jest pogodzić wyraźnego fenotypu motoryczny i molekularny, dokładność konstruktów genetycznych, allel ludzki pełnej długości i brak allelu mysiego (Cemal K Cemal et al., 2002; Haas et al., 2022; Switonski et al., 2015b). Idealny model miałby wczesny behawioralny, molekularny fenotyp do testów przedklinicznych, całe ludzkie białko, nieprzerwany ciąg CAG w mRNA i wykazywałby ekspansji powtórzeń CAG. Wcześniej został wygenerowany myszy model Ki91 SCA3 (Wiatr et al., 2021, 2019) i nieznacznie zwiększono liczbę powtórzeń CAG (110-120), co dało model, który wykazał wiele zmian charakterystycznych dla SCA3. Jednak do przeprowadzenia efektywnych badań przedklinicznych potrzebny jest dodatkowy model SCA3 o jeszcze wcześniejszym i zaostrozonym fenotypie. Dlatego stosując model Ki91, jego cechą ekspansji i selektywną hodowlę tego modelu, uzyskaliśmy model Ki150 posiadający długi odcinek powtórzeń CAG (150-170) w humanizowanym genie *ATXN3* i szybciej występujący fenotyp. Myszy Ki150 prezentują szybkie pogorszenie fenotypu motorycznego już w wieku 4 tygodni i powstawanie wczesnych inkluzji ATXN3 w różnych tkankach mózgu, które występują w dużym zagęszczeniu. Liczne inkluzje mogą być wykorzystana jako fenotyp, który można w łatwy sposób kwantyfikować w celu oceny skuteczności terapii w modelu *in vitro* (Takeuchi and Nagai, 2017).

Agregacja białek, stres oksydacyjny i stany zapalne układu nerwowego są często identyfikowane w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym poliQ, SCA i chorobie Alzheimera (AD). Małe białka szoku cieplnego (ang.: HSP) oddziałują z nieprawidłowo sfałdowanymi i zagregowanymi białkami, w celu zmniejszenia toksyczności lub zwiększenia usuwania tych białek (Zhu and Reiser, 2018). Stan zapalny jest jednym z przejawów stresu oksydacyjnego, a proces zapalny może dodatkowo wywoływać stres oksydacyjny i zmniejszać zdolność antyoksydacyjną komórek. U pacjentów ze SCA3, w neuronach mostu wzrasta ekspresja cytokin prozapalnych, takich jak antagoniści receptora interleukiny (IL)-1 i IL-1 β , czemu towarzyszy zwiększona liczba reaktywnych astrocytów i aktywowanych komórek mikrogleju (B. O. Evert et al., 2006; Evert et al., 2001). W mysim modelu CMVMJD135 wykazano zmiany które wskazują na zwiększony stan aktywacji mikrogleju w mózgu i specyficzny dla choroby profil transkrypcyjny mikrogleju w SCA3 (Campos et al., 2022). W patogenezie SCA3 przewlekły stan zapalny w mózgu prowadzi również do przerwania bariery krew-mózg (Duarte Lobo et al., 2020).

Zaburzenia w prawidłowym procesie i regulacji syntezy białka jest powszechnym zjawiskiem w chorobach neurodegeneracyjnych (Evans et al., 2021; Gamarra et al., 2021). We wcześniejszych badaniach wykazano, nieprawidłowy poziom białek w mózgach myszy Ki91 (Wiatr et al., 2021, 2019). Prawidłowe funkcjonowanie komórki wymaga ściśle kontrolowanych procesów konwersji DNA do mRNA, a następnie właściwej translacji mRNA do białka. Synteza białek jest ważnym mechanizmem metabolicznym i regulacyjnym, który kontroluje homeostazę komórek, a dysfunkcja na tym etapie może mieć krytyczny wpływ na wiele procesów fizjologicznych. Coraz więcej dowodów sugeruje, że deregulacja translacyjna jest krytycznym czynnikiem w pojawieniu się kilku zaburzeń, a podobieństwa w progresji różnych chorób neurologicznych sugerują potencjalne podobieństwa między nimi (Baleriola and Hengst, 2015; Y.-C. Chen et al., 2019; Kwiatkowski et al., 2009). Podwyższony poziom fosforylacji białka S6 może świadczyć o intensywnej translacji białek posiadających sekwencję oligopirymidynową w mózgu myszy SCA3. Zauważalnie wyższa obecność białek Fmr1 i Fxr2 w sąsiedztwie inkluzji zmutowanej ATXN3 w obszarze istoty białej wskazuje na próbę kompensacji nadmiarowo prowadzonego procesu translacji spowodowanego obecnością zmutowanego białka ATXN3.

Neuropatologia w Ki150 i duża liczba inkluzji wskazują na intensywny proces interakcji ATXN3, różnych białek i ich kompleksów między sobą. Identyfikacja interakcji białkowych normalnej i zmutowanej ATXN3 może dostarczyć cennych informacji dotyczących patogenezy SCA3. Dotychczas odkryte białka wiążące się do ATXN3 zostały zidentyfikowane z udziałem badań przeprowadzonych głównie w sztucznych systemach nadekspresji *in vitro* lub na modelach zwierzęcych innych niż ssaki (Antonicka et al., 2020; Kristensen et al., 2018; Mazzucchelli et al., 2009b; Sowa et al., 2009; Weishäupl et al., 2019). Dlatego zbadałem oddziaływanie pomiędzy ATXN3 a innymi białkami w mózgu *in vivo* w układzie patogennym SCA3 wykorzystując myszy homozygotyczne posiadające tylko zmutowaną lub tylko normalną ludzką ATXN3. Kompleksy białkowe związane ze zmutowaną ATXN3 były generalnie identyfikowane we frakcjach cięższych w porównaniu z ATXN3 z prawidłowym traktem poliglutaminowym, co sugeruje intensywny wpływ zmutowanego białka na wzmożone tworzenie kompleksów białkowych. Frakcje wzbogacone w normalną i zmutowaną ATXN3 wykazywały zmieniony poziom białek należących do molekularnego kompleksu opiekuńczego CCT/TRiC (ang. *Chaperonin containing tailless complex polypeptide 1, tailless complex polypeptide 1 ring complex*), który jest kluczowym regulatorem agregacji białek poliQ (Darrow et al., 2015; Grantham, 2020). Niższy poziom białek kompleksu TCP1 jest powszechnie występującym zjawiskiem w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera i Huntingtona. Proces autofagii jest zaburzony przez mniejszą ilość poszczególnych podjednostek CCT, a wpływ CCT na agregację jest przede wszystkim konsekwencją hamowania autofagii (Pavel et al., 2016). Ponadto, nasze wyniki sugerują, że ATXN3 wykazuje tendencję do interakcji z kompleksami białkowymi o strukturze kolistej, takimi jak podjednostki CCT, proteasom i Camk2. Zakłócone oddziaływanie zmutowanej ATXN3 z kompleksami o budowie kolistej może być dodatkowym czynnikiem sprzyjającym do przejścia zmutowanego białka ATXN3 od agregatów pierścieniowych, co umożliwi dalsze tworzenie agregatów włóknistych i ich wytrącania w postaci inkluzji (Legleiter et al., 2010).

Dodatkowo, naszym celem było zidentyfikowanie utraty lub wzmocnienia interakcji białkowej zmutowanej ATXN3 (Q150) poprzez przeprowadzenie koimmunoprecypitacji w dwóch reprezentatywnych obszarach mózgu: mózdzku i korze mózdzku, które są istotne dla patogenezy SCA3 (Wiatr et al., 2021, 2019). Odkryłem, że wiele interakcji białkowych nie zachodzi w obecności wydłużonego rejonu poliQ w ATXN3. Jednymi z najważniejszych

interakcji zidentyfikowanych przez dwie różne strategie zarówno w mózdku, jak i korze mózgowej były kinazy białkowe zależne od wapnia (Camk2a i b), które odgrywają kluczową rolę w transporcie mitochondrialnym w aksonach (Woolums et al., 2020). Ponadto, zidentyfikowaliśmy nieprawidłową interakcję białek zaangażowanych w translację, metabolizm w mitochondriach oraz transport mitochondriów.

Zaburzenie transportu mitochondrialnego dobrze koresponduje z wcześniejszymi odkryciami w naszej grupie badawczej, które pokazały zaburzony metabolizmem energii i parametrów glikolizy i fosforylacji oksydacyjnej w pierwotnych neuronach mózdku myszy SCA3. W tych pracach zidentyfikowano również szereg zmienionych białek mitochondrialnych w mózdku SCA3 i błędną lokalizacją białek mitochondrialnych w aksonie SCA3 (Wiatr et al., 2021). Co więcej, w modelu komórkowym z nadekspresją wykazano zwiększoną interakcję kilku białek mitochondrialnych ze zmutowaną ATXN3 (Kristensen et al., 2018).

Mitochondria są wytwarzane głównie w ciele komórki i są dostarczane przez transport oparty na mikrotubulach wzdłuż aksonów (Davis and Clayton, 1996; Misgeld and Schwarz, 2017; Schwarz, 2013). Zaburzenie transportu mitochondrialnego w aksonach ostatecznie skutkuje niewystarczającym lokalnym zapotrzebowaniem na energię i degeneracją aksonów (Sheng and Cai, 2012). Rzeczywiście, defekty w transporcie mitochondrialnym są związane z wieloma chorobami neurodegeneracyjnymi, w tym z chorobą Alzheimera, Huntingtona i Parkinsona, ALS, Charcot-Marie-Tooth (Itoh et al., 2013; Kalmar et al., 2017; Otomo et al., 2022; Piccioni et al., 2002; Sheng and Cai, 2012, p. 2; Shirendeb et al., 2012; Stykel et al., 2018). Co więcej, zaburzenie funkcji mitochondriów prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w patogenezie SCA3 (Da Silva et al., 2019).

Moje odkrycia mogą świadczyć o tym, że utrata interakcji ATXN3 z dwoma kompleksami białkowymi o strukturze kołowej, a mianowicie CaMKII i CCT (chaperonin zawierający TCP-1)/TCP-1/TRiC zaburza transport mitochondrialny w neurytach SCA3. CaMKII jest ważnym regulatorem sygnalizacji wapniowej, która ma kluczowe znaczenie w regulacji transportu aksonalnego mitochondriów (Brault et al., 2019; Breuer and Atkinson, 1988; Saotome et al., 2008; Wang and Schwarz, 2009, p. 2). CaMKII kontroluje translokację mitochondrialną w mięśniach gładkich, a brak równowagi zależnego od CaMKII wejścia Ca²⁺ prowadzi do zakłócenia mitochondrialnego transportu aksonów i ostatecznie do zwyrodnienia aksonów (Nguyen et al., 2018; Woolums et al., 2020, p. 4). Dlatego, na aktywność CaMKII

prawdopodobnie wpływa obecność zmutowanej ATXN3, ponieważ wcześniej wykazaliśmy zmniejszoną fosforylację wielu jej docelowych miejsc białkowych oraz nieprawidłowego poziomu białka CaMKII w mózgu myszy SCA3 (Wiatr et al., 2019). Warto zauważyć, że wewnątrzkomórkowe poziomy Ca^{2+} są również modulowane przez obecność zmutowanej ATXN3 (Pellistri et al., 2013).

Z drugiej strony pokazano, że kompleks CCT zwiększa transport wsteczny (retrogradowy) wzdłuż aksonów poprzez modulowanie fosforylacji epitopu AT8 białka tau (Ser199, Ser202, Thr205) (Zhao et al., 2016). Epitop AT8 ma kluczowe znaczenie w regulacji ruchu mitochondriów, ponieważ zastąpienie go fosfomimetycznymi asparaginanami prowadzi do zahamowania transportu mitochondriów w neurycach komórek PC12 (Shahpasand et al., 2012). Wykazano również, że hiperfosforylacja tau jest powiązana ze zmniejszoną liczbą mitochondriów w aksonach korowych (Rodríguez-Martín et al., 2016). Dlatego, zaburzenie podjednostek kompleksu CCT/TCP-1/TRiC wynikające z zaburzonej interakcji ze zmutowaną ATXN3 może mieć bezpośredni wpływ na transport mitochondrialny w aksonach. Oprócz zaburzonej interakcji zmutowanej ATXN3 z CaMKII i CCT/TCP-1/TRiC, obecność inkluzji ATXN3, które wcześniej wykazano w aksonach mózgu, może również zmieniać mechanizmy transportu aksonów (Wiatr et al., 2021). Zaproponowany mechanizm nieprawidłowego transportu aksonalnego mitochondriów w neuronach SCA3 stanowi nowy cel dla przyszłych strategii terapeutycznych.

ATXN3 silnie oddziałuje z podjednostkami proteasomu (Weishäupl et al., 2019) oraz bierze aktywny udział w ścieżce proteasomalnej degradacji białek (Thrower et al., 2000). Ponadto, wykazano, że makroautofagia i proteasom są bezpośrednio zaangażowane w degradację zmutowanego białka ATXN3 (Jana et al., 2005; Matsumoto et al., 2004; Menzies et al., 2010; Nascimento-Ferreira et al., 2011). Interakcje ATXN3 zarówno normalnej i zmutowanej wskazują na nieprawidłowe działania wyspecjalizowanym procesowi autofagii. Pokazałem, że obie formy ATXN3 wiążą się do podjednostkami proteasomu i jest to wiązanie dość selektywnie dotyczące podjednostek A i B (PSMA2, PSMA3, PSMA6, PSMB1, PSMB4 i PSMB6 oddziałuje z ATXN3). Jest to wiązanie relatywnie silne, ponieważ w naszych eksperymentach wykazało stabilność mimo stosowania różnych chromatografi i buforów. Co interesujące, pokazano, że istnieje szczególny proces autofagii zwany proteofagią, który gra szczególną rolę w regeneracji proteasomu w aksonach. Wysunęliśmy hipotezę, że indukcja

proteofagii może przywrócić funkcjonalną aktywność proteasomu, poprzez jego odnawianie w komórce, a ponieważ zmutowana ATXN3 jest związana z proteasomem, można spodziewać się obniżenia poziomu samego zmutowanego białka. Z tego powodu, wybrano kilka inhibitorów białek proteasomalnych; dwa leki przeciwnowotworowe zatwierdzone przez FDA, bortezomib i karfilzomib (wiążą się z podjednostką A i B), wraz z VLX1570, który kontroluje podjednostkę proteasomu PSMD14. Taka selekcja była również oparta na znanej indukcji autofagii i proteofagii przez bortezomib (Goebel et al., 2020; Lopez-Reyes et al., 2021). Używając nietoksycznych stężeń inhibitorów, oceniłem obniżenie poziomu ATXN3 w komórkach fibroblastów pacjentów SCA3 (Ryc. 20). Linie komórkowe ludzkich fibroblastów SCA3 traktowałem wyżej wymienionymi związkami i wykazałem obniżenie zarówno zmutowanej, jak i normalnej ATXN3 za pomocą wszystkich inhibitorów. Co warto odnotować, efekt VLX1570 był mniej zauważalny. Taki efekt działania inhibitorów oraz zebrane wyniki mogą wskazywać, że jednym z podstawowych mechanizmów patologicznych SCA3 jest dysfunkcja usuwania proteasomu przez proteofagię, wynikająca z jego bezpośredniego oddziaływania ze zmutowaną ATXN3.

6. Wnioski

Zmiany transkrypcyjne u presymptomatycznych myszy Ki91 nie występują, a zidentyfikowane zmiany są zależne od tła genetycznego myszy. Zidentyfikowane późne zmiany transkrypcyjne są wynikiem trwającej patogenezy i zmian komórkowych, które dotyczą metabolizmu energetycznego, oligodendrocytów i mikrogleju. Ponadto, w badaniu transkryptomicznym komórek neuronalnych wyprowadzonych od pacjentów SCA3 zidentyfikowałem zmiany dotyczące oligodendrocytów. Mimo braku zmian w mRNA i zmian behawioralnych we wczesnej przedobjawowej fazie choroby, zidentyfikowałem zmienioną lokalizację i mikroagregaty zmutowanej ATXN3 w mózdzku i korze mózgowej, które są wczesnym objawem mogącym posłużyć jako marker w badaniach przedklinicznych. U myszy kontrolnych, ATXN3 lokalizuje równomiernie w całej komórce.

W kolejnym etapie realizacji badań wygenerowałem nowy model SCA3 Ki150 o zaostrowym fenotypie. Testy motoryczne, także wysoka gęstość i liczba inkluzji wskazują na wczesny fenotyp chorobowy myszy Ki150, które już w 1 miesiącu życia wykazywały obniżoną sprawność motoryczną. Dzięki temu w łatwy sposób można ocenić skuteczność testowanych terapii.

Dlatego model Ki150 jest modelem klasy przedklinicznej mogącym posłużyć do badań nad skuteczną terapią dla pacjentów SCA3.

W modelu Ki150 obserwuje się również wiele białek wiążących się ze zmutowaną ATXN3. Białka te są zaangażowane w ważne szlaki komórkowe takie jak translacja i transport mitochondriów wzdłuż aksonów biorących udział w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Kompleksy wiążące się do ATXN3 to białkowe chaperony, kinazy i proteasom, które wykazują kolistą strukturę 3D. Ponieważ koliste kompleksy odgrywają kluczową rolę w agregacji poliQ, dlatego dobraliśmy skuteczne leki wiążące się do tych struktur takich jak proteasom. Użycie takiej celowanej strategii terapeutycznej, spowodowało znaczące obniżenie poziomu zmutowanego białka ATXN3 w komórkach fibroblastów pacjentów SCA3.

7. Literatura

- Adanyeguh, I.M., Henry, P.-G., Nguyen, T.M., Rinaldi, D., Jauffret, C., Valabregue, R., Emir, U.E., Deelchand, D.K., Brice, A., Eberly, L.E., Öz, G., Durr, A., Mochel, F., 2015. In vivo neurometabolic profiling in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 7. *Mov Disord* 30, 662–670. <https://doi.org/10.1002/mds.26181>
- Akins, M.R., Berk-Rauch, H.E., Kwan, K.Y., Mitchell, M.E., Shepard, K.A., Korsak, L.I.T., Stackpole, E.E., Warner-Schmidt, J.L., Sestan, N., Cameron, H.A., Fallon, J.R., 2017. Axonal ribosomes and mRNAs associate with fragile X granules in adult rodent and human brains. *Human Molecular Genetics* 26, 192–209. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw381>
- Almeida, B., Abreu, I.A., Matos, C.A., Fraga, J.S., Fernandes, S., Macedo, M.G., Gutiérrez-Gallego, R., Pereira, P.J.B., Carvalho, A.L., Macedo-Ribeiro, S., 2015. SUMOylation of the brain-predominant Ataxin-3 isoform modulates its interaction with p97. *Biochim Biophys Acta* 1852, 1950–1959. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.010>
- Alves, S., Nascimento-Ferreira, I., Dufour, N., Hassig, R., Auregan, G., Nóbrega, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Pedroso de Lima, M.C., Déglon, N., de Almeida, L.P., 2010. Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado–Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3? *Human Molecular Genetics* 19, 2380–2394. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq111>
- Angelova, D.M., Brown, D.R., 2019. Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry* 151, 676–688. <https://doi.org/10.1111/jnc.14860>
- Antonicka, H., Lin, Z.-Y., Janer, A., Aaltonen, M.J., Weraarpachai, W., Gingras, A.-C., Shoubridge, E.A., 2020. A High-Density Human Mitochondrial Proximity Interaction Network. *Cell Metabolism* 32, 479–497.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.017>

- Antony, P.M.A., Mäntele, S., Mollenkopf, P., Boy, J., Kehlenbach, R.H., Riess, O., Schmidt, T., 2009. Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis* 36, 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.020>
- Araujo, J., Breuer, P., Dieringer, S., Krauss, S., Dorn, S., Zimmermann, K., Pfeifer, A., Klockgether, T., Wuellner, U., Evert, B.O., 2011. FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2928–2941. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr197>
- Ashkenazi, A., Bento, C.F., Ricketts, T., Vicinanza, M., Siddiqi, F., Pavel, M., Squitieri, F., Hardenberg, M.C., Imarisio, S., Menzies, F.M., Rubinsztein, D.C., 2017. Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy. *Nature* 545, 108–111. <https://doi.org/10.1038/nature22078>
- Babiloni, C., Frisoni, G.B., Del Percio, C., Zanetti, O., Bonomini, C., Cassetta, E., Pasqualetti, P., Miniussi, C., De Rosas, M., Valenzano, A., Cibelli, G., Eusebi, F., Rossini, P.M., 2009. Ibuprofen treatment modifies cortical sources of EEG rhythms in mild Alzheimer's disease. *Clinical Neurophysiology* 120, 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2009.02.005>
- Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., Boza-Serrano, A., 2018. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12.
- Baleriola, J., Hengst, U., 2015. Targeting Axonal Protein Synthesis in Neuroregeneration and Degeneration. *Neurotherapeutics* 12, 57–65. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0308-8>
- Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F.M., Oroz, L.G., Underwood, B.R., Pangalos, M.N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B.O., O'Kane, C.J., Rubinsztein, D.C., 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Human Molecular Genetics* 15, 433–442. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi458>
- Berke, S.J.S., Chai, Y., Marrs, G.L., Wen, H., Paulson, H.L., 2005. Defining the Role of Ubiquitin-interacting Motifs in the Polyglutamine Disease Protein, Ataxin-3*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 32026–32034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506084200>
- Berke, S.J.S., Paulson, H.L., 2003. Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPer hand on neurodegeneration. *Current Opinion in Genetics & Development* 13, 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(03\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00053-4)
- Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hübener, J., Boy, J., Rüttiger, L., Häbig, K., Poths, S., Bonin, M., Knipper, M., Schmidt, W.J., Wilbertz, J., Wolburg, H., Laccone, F., Riess, O., 2007. Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci* 27, 7418–7428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4540-06.2007>
- Bonanomi, M., Mazzucchelli, S., D'Urzo, A., Nardini, M., Konarev, P.V., Invernizzi, G., Svergun, D.I., Vanoni, M., Regonesi, M.E., Tortora, P., 2014. Interactions of ataxin-3 with its molecular partners in the protein machinery that sorts protein aggregates to the aggresome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 51, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.015>
- Bové, J., Martínez-Vicente, M., Vila, M., 2011. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci* 12, 437–452. <https://doi.org/10.1038/nrn3068>
- Boy, J., Leergaard, T.B., Schmidt, T., Odeh, F., Bichelmeier, U., Nuber, S., Holzmann, C., Wree, A., Prusiner, S.B., Bujard, H., Riess, O., Bjaalie, J.G., 2006. Expression mapping of tetracycline-responsive prion protein promoter: Digital atlas for generating cell-

- specific disease models. *NeuroImage* 33, 449–462. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.05.055>
- Boy, J., Schmidt, T., Schumann, U., Grasshoff, U., Unser, S., Holzmann, C., Schmitt, I., Karl, T., Laccone, F., Wolburg, H., Ibrahim, S., Riess, O., 2010. A transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 resembling late disease onset and gender-specific instability of CAG repeats. *Neurobiol Dis* 37, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.08.002>
- Boy, J., Schmidt, T., Wolburg, H., Mack, A., Nuber, S., Böttcher, M., Schmitt, I., Holzmann, C., Zimmermann, F., Servadio, A., Riess, O., 2009. Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet* 18, 4282–4295. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp381>
- Brault, M.L., Petit, J.D., Immel, F., Nicolas, W.J., Glavier, M., Brocard, L., Gaston, A., Fouché, M., Hawkins, T.J., Crowet, J.-M., Grison, M.S., Germain, V., Rocher, M., Kraner, M., Alva, V., Claverol, S., Paterlini, A., Helariutta, Y., Deleu, M., Lins, L., Tilsner, J., Bayer, E.M., 2019. Multiple C2 domains and transmembrane region proteins (MCTPs) tether membranes at plasmodesmata. *EMBO reports* 20, e47182. <https://doi.org/10.15252/embr.201847182>
- Breuer, A.C., Atkinson, M.B., 1988. Calcium dependent modulation of fast axonal transport. *Cell Calcium* 9, 293–301. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(88\)90010-3](https://doi.org/10.1016/0143-4160(88)90010-3)
- Brown, V., Small, K., Lakkis, L., Feng, Y., Gunter, C., Wilkinson, K.D., Warren, S.T., 1998. Purified Recombinant Fmrp Exhibits Selective RNA Binding as an Intrinsic Property of the Fragile X Mental Retardation Protein *. *Journal of Biological Chemistry* 273, 15521–15527. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15521>
- Buijsen, R.A.M., Toonen, L.J.A., Gardiner, S.L., van Roon-Mom, W.M.C., 2019. Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias. *Neurotherapeutics* 16, 263–286. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00696-y>
- Burnett, B., Li, F., Pittman, R.N., 2003. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3195–3205. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg344>
- Burnett, B.G., Pittman, R.N., 2005. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4330–4335. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407252102>
- Bussian, T.J., Aziz, A., Meyer, C.F., Swenson, B.L., van Deursen, J.M., Baker, D.J., 2018. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562, 578–582. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y>
- Caldeira, C., Oliveira, A.F., Cunha, C., Vaz, A.R., Falcão, A.S., Fernandes, A., Brites, D., 2014. Microglia change from a reactive to an age-like phenotype with the time in culture. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8.
- Campos, A.B., Duarte-Silva, S., Fernandes, B., das Neves, S.P., Marques, F., Teixeira-Castro, A., Neves-Carvalho, A., Monteiro-Fernandes, D., Portugal, C.C., Socodato, R., Summavielle, T., Ambrósio, A.F., Relvas, J.B., Maciel, P., 2022. Profiling Microglia in a Mouse Model of Machado–Joseph Disease. *Biomedicines* 10, 237. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020237>
- Carmona, V., Cunha-Santos, J., Onofre, I., Simões, A.T., Vijayakumar, U., Davidson, B.L., Pereira de Almeida, L., 2017. Unravelling Endogenous MicroRNA System Dysfunction as a New Pathophysiological Mechanism in Machado-Joseph Disease. *Molecular Therapy* 25, 1038–1055. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.021>

- Cemal, Cemal K., Carroll, C.J., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Ruddle, P., Al-Mahdawi, S., King, R.H.M., Pook, M.A., Huxley, C., Chamberlain, S., 2002. YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum Mol Genet* 11, 1075–1094. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1075>
- Cemal, Cemal K., Carroll, C.J., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Ruddle, P., Al-Mahdawi, S., King, R.H.M., Pook, M.A., Huxley, C., Chamberlain, S., 2002. YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum. Mol. Genet* 11, 1075–1094.
- Chai, Y., Berke, S.S., Cohen, R.E., Paulson, H.L., 2004. Poly-ubiquitin Binding by the Polyglutamine Disease Protein Ataxin-3 Links Its Normal Function to Protein Surveillance Pathways*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 3605–3611. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310939200>
- Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Bonini, N.M., Paulson, H.L., 1999. Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci* 19, 10338–10347.
- Chai, Yaohui, Koppenhafer, S.L., Shoesmith, S.J., Perez, M.K., Paulson, H.L., 1999. Evidence for Proteasome Involvement in Polyglutamine Disease: Localization to Nuclear Inclusions in SCA3/MJD and Suppression of Polyglutamine Aggregation in vitro. *Human Molecular Genetics* 8, 673–682. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.4.673>
- Chai, Y., Wu, L., Griffin, J.D., Paulson, H.L., 2001. The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J. Biol. Chem.* 276, 44889–44897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106575200>
- Chan, H.Y.E., Warrick, J.M., Gray-Board, G.L., Paulson, H.L., Bonini, N.M., 2000. Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics* 9, 2811–2820. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.19.2811>
- Chen, I.-C., Chang, C.-N., Chen, W.-L., Lin, T.-H., Chao, C.-Y., Lin, C.-H., Lin, H.-Y., Cheng, M.-L., Chiang, M.-C., Lin, J.-Y., Wu, Y.-R., Lee-Chen, G.-J., Chen, C.-M., 2019. Targeting Ubiquitin Proteasome Pathway with Traditional Chinese Medicine for Treatment of Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Am. J. Chin. Med.* 47, 63–95. <https://doi.org/10.1142/S0192415X19500046>
- Chen, W.-W., Zhang, X., Huang, W.-J., 2016. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports* 13, 3391–3396. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4948>
- Chen, X., Tang, T.-S., Tu, H., Nelson, O., Pook, M., Hammer, R., Nukina, N., Bezprozvanny, I., 2008. Deranged Calcium Signaling and Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *J. Neurosci.* 28, 12713–12724. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3909-08.2008>
- Chen, X.R., Heck, N., Lohof, A.M., Rochefort, C., Morel, M.-P., Wehrlé, R., Doulazmi, M., Marty, S., Cannaya, V., Avci, H.X., Mariani, J., Rondi-Reig, L., Vodjdani, G., Sherrard, R.M., Sotelo, C., Dusart, I., 2013. Mature Purkinje Cells Require the Retinoic Acid-Related Orphan Receptor- α (ROR α) to Maintain Climbing Fiber Mono-Innervation and Other Adult Characteristics. *J. Neurosci.* 33, 9546–9562. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2977-12.2013>
- Chen, Y.-C., Chang, Y.-W., Huang, Y.-S., 2019. Dysregulated Translation in Neurodevelopmental Disorders: An Overview of Autism-Risk Genes Involved in

- Translation. *Developmental Neurobiology* 79, 60–74. <https://doi.org/10.1002/dneu.22653>
- Chen, Y.-S., Hong, Z.-X., Lin, S.-Z., Harn, H.-J., 2020. Identifying Therapeutic Targets for Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado–Joseph Disease through Integration of Pathological Biomarkers and Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 3063. <https://doi.org/10.3390/ijms21093063>
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Chou, A.-H., Chen, Y.-L., Hu, S.-H., Chang, Y.-M., Wang, H.-L., 2014. Polyglutamine-expanded ataxin-3 impairs long-term depression in Purkinje neurons of SCA3 transgenic mouse by inhibiting HAT and impairing histone acetylation. *Brain Res.* 1583, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.08.019>
- Chou, A.-H., Yeh, T.-H., Ouyang, P., Chen, Y.-L., Chen, S.-Y., Wang, H.-L., 2008. Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol. Dis.* 31, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.011>
- Chyung, E., LeBlanc, H.F., Fallon, J.R., Akins, M.R., 2018. Fragile X granules are a family of axonal ribonucleoprotein particles with circuit-dependent protein composition and mRNA cargos. *J Comp Neurol* 526, 96–108. <https://doi.org/10.1002/cne.24321>
- Conceição, M., Mendonça, L., Nóbrega, C., Gomes, C., Costa, P., Hirai, H., Moreira, J.N., Lima, M.C., Manjunath, N., Pereira de Almeida, L., 2016. Intravenous administration of brain-targeted stable nucleic acid lipid particles alleviates Machado-Joseph disease neurological phenotype. *Biomaterials* 82, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.021>
- Connolly, B.S., Prashanth, L.K., Shah, B.B., Marras, C., Lang, A.E., 2012. A randomized trial of varenicline (chantix) for the treatment of spinocerebellar ataxia type 3. *Neurology* 79, 2218–2218. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318278a059>
- Costa, M. do C., Paulson, H.L., 2012. Toward understanding Machado-Joseph Disease. *Prog Neurobiol* 97, 239–257. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.006>
- Coutinho, P., Andrade, C., 1978. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28, 703–709. <https://doi.org/10.1212/wnl.28.7.703>
- Cunha-Santos, J., Duarte-Neves, J., Carmona, V., Guarente, L., Pereira de Almeida, L., Cavadas, C., 2016. Caloric restriction blocks neuropathology and motor deficits in Machado–Joseph disease mouse models through SIRT1 pathway. *Nat Commun* 7, 11445. <https://doi.org/10.1038/ncomms11445>
- da Silva Carvalho, G., Saute, J.A.M., Haas, C.B., Torrez, V.R., Brochier, A.W., Souza, G.N., Furtado, G.V., Gheno, T., Russo, A., Monte, T.L., Schumacher-Schuh, A., D’Avila, R., Donis, K.C., Castilhos, R.M., Souza, D.O., Saraiva-Pereira, M.L., Torman, V.L., Camey, S., Portela, L.V., Jardim, L.B., 2016. Cytokines in Machado Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia 3. *Cerebellum* 15, 518–525. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0719-z>
- Da Silva, J.D., Teixeira-Castro, A., Maciel, P., 2019. From Pathogenesis to Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Evading Potholes on the Way to Translation. *Neurotherapeutics* 16, 1009–1031. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00798-1>

- Darrow, M.C., Sergeeva, O.A., Isas, J.M., Galaz-Montoya, J.G., King, J.A., Langen, R., Schmid, M.F., Chiu, W., 2015. Structural Mechanisms of Mutant Huntingtin Aggregation Suppression by the Synthetic Chaperonin-like CCT5 Complex Explained by Cryoelectron Tomography*. *Journal of Biological Chemistry* 290, 17451–17461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655373>
- Davis, A.F., Clayton, D.A., 1996. In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 135, 883–893. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.883>
- de Rezende, T.J.R., D’Abreu, A., Guimarães, R.P., Lopes, T.M., Lopes-Cendes, I., Cendes, F., Castellano, G., França, M.C., 2015. Cerebral cortex involvement in Machado-Joseph disease. *Eur. J. Neurol.* 22, 277–283, e23-24. <https://doi.org/10.1111/ene.12559>
- Deacon, R.M.J., 2013. Measuring Motor Coordination in Mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e2609. <https://doi.org/10.3791/2609>
- Diallo, A., Jacobi, H., Cook, A., Labrum, R., Durr, A., Brice, A., Charles, P., Marelli, C., Mariotti, C., Nanetti, L., Panzeri, M., Rakowicz, M., Sobanska, A., Sulek, A., Schmitz-Hübsch, T., Schöls, L., Hengel, H., Melegh, B., Filla, A., Antenora, A., Infante, J., Berciano, J., van de Warrenburg, B.P., Timmann, D., Boesch, S., Pandolfo, M., Schulz, J.B., Bauer, P., Giunti, P., Kang, J.-S., Klockgether, T., Tezenas du Montcel, S., 2018. Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol* 17, 327–334. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30042-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30042-5)
- do Carmo Costa, M., Luna-Cancalon, K., Fischer, S., Ashraf, N.S., Ouyang, M., Dharia, R.M., Martin-Fishman, L., Yang, Y., Shakkottai, V.G., Davidson, B.L., Rodríguez-Lebrón, E., Paulson, H.L., 2013. Toward RNAi Therapy for the Polyglutamine Disease Machado–Joseph Disease. *Molecular Therapy* 21, 1898–1908. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.144>
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Doss-Pepe, E.W., Stenroos, E.S., Johnson, W.G., Madura, K., 2003. Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6469–6483.
- Duarte Lobo, D., Nobre, R.J., Oliveira Miranda, C., Pereira, D., Castelhana, J., Sereno, J., Koeppen, A., Castelo-Branco, M., Pereira de Almeida, L., 2020. The blood-brain barrier is disrupted in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: evidence from transgenic mice and human post-mortem samples. *Acta Neuropathologica Communications* 8, 152. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00955-0>
- Durr, A., 2010. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *The Lancet Neurology* 9, 885–894. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70183-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70183-6)
- Dürr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien, J., Serdaru, M., Penet, C., Agid, Y., Brice, A., 1996. Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol* 39, 490–499. <https://doi.org/10.1002/ana.410390411>

- Evans, H.T., Taylor, D., Kneynsberg, A., Bodea, L.-G., Götz, J., 2021. Altered ribosomal function and protein synthesis caused by tau. *Acta Neuropathologica Communications* 9, 110. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01208-4>
- Evert, Bernd O., Araujo, J., Vieira-Saecker, A.M., Vos, R.A.I. de, Harendza, S., Klockgether, T., Wüllner, U., 2006a. Ataxin-3 Represses Transcription via Chromatin Binding, Interaction with Histone Deacetylase 3, and Histone Deacetylation. *J. Neurosci.* 26, 11474–11486. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2053-06.2006>
- Evert, Bernd O., Araujo, J., Vieira-Saecker, A.M., Vos, R.A.I. de, Harendza, S., Klockgether, T., Wüllner, U., 2006b. Ataxin-3 Represses Transcription via Chromatin Binding, Interaction with Histone Deacetylase 3, and Histone Deacetylation. *J. Neurosci.* 26, 11474–11486. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2053-06.2006>
- Evert, B. O., Schelhaas, J., Fleischer, H., de Vos, R. a. I., Brunt, E.R., Stenzel, W., Klockgether, T., Wüllner, U., 2006. Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neuropathol* 25, 272–281.
- Evert, B.O., Vogt, I.R., Kindermann, C., Ozimek, L., Vos, R.A.I. de, Brunt, E.R.P., Schmitt, I., Klockgether, T., Wüllner, U., 2001. Inflammatory Genes Are Upregulated in Expanded Ataxin-3-Expressing Cell Lines and Spinocerebellar Ataxia Type 3 Brains. *J. Neurosci.* 21, 5389–5396. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-15-05389.2001>
- Evert, B.O., Vogt, I.R., Vieira-Saecker, A.M., Ozimek, L., de Vos, R.A.I., Brunt, E.R.P., Klockgether, T., Wüllner, U., 2003. Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 1006–1018.
- Fahl, C.N., Branco, L.M.T., Bergo, F.P.G., D’Abreu, A., Lopes-Cendes, I., França, M.C., 2015. Spinal cord damage in Machado-Joseph disease. *Cerebellum* 14, 128–132. <https://doi.org/10.1007/s12311-014-0619-7>
- Farshim, P.P., Bates, G.P., 2018. Mouse Models of Huntington’s Disease. *Methods Mol Biol* 1780, 97–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7825-0_6
- Gamarra, M., de la Cruz, A., Blanco-Urrejola, M., Baleriola, J., 2021. Local Translation in Nervous System Pathologies. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 15.
- Gao, R., Chakraborty, A., Geater, C., Pradhan, S., Gordon, K.L., Snowden, J., Yuan, S., Dickey, A.S., Choudhary, S., Ashizawa, T., Ellerby, L.M., La Spada, A.R., Thompson, L.M., Hazra, T.K., Sarkar, P.S., 2019. Mutant huntingtin impairs PNKP and ATXN3, disrupting DNA repair and transcription. *eLife* 8, e42988. <https://doi.org/10.7554/eLife.42988>
- Gao, R., Liu, Y., Silva-Fernandes, A., Fang, X., Paulucci-Holthauzen, A., Chatterjee, A., Zhang, H.L., Matsuura, T., Choudhary, S., Ashizawa, T., Koeppe, A.H., Maciel, P., Hazra, T.K., Sarkar, P.S., 2015. Inactivation of PNKP by mutant ATXN3 triggers apoptosis by activating the DNA damage-response pathway in SCA3. *PLoS Genet.* 11, e1004834. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004834>
- Gardiner, S.L., Boogaard, M.W., Trompet, S., de Mutsert, R., Rosendaal, F.R., Gussekloo, J., Jukema, J.W., Roos, R.A.C., Aziz, N.A., 2019. Prevalence of Carriers of Intermediate and Pathological Polyglutamine Disease-Associated Alleles Among Large Population-Based Cohorts. *JAMA Neurol* 76, 650–656. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.0423>
- Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Lima, M., Zhou, Y.-X., Soong, B.-W., Watanabe, M., Giunti, P., Stevanin, G., Riess, O., Sasaki, H., Hsieh, M., Nicholson, G.A., Brunt, E., Higgins, J.J., Lauritzen, M., Tranebjaerg, L., Volpini, V., Wood, N., Ranum, L., Tsuji, S., Brice, A., Sequeiros, J.,

- Rouleau, G.A., 2001. Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease Mutation: A Worldwide Haplotype Study. *Am J Hum Genet* 68, 523–528.
- Gibson, E.M., Purger, D., Mount, C.W., Goldstein, A.K., Lin, G.L., Wood, L.S., Inema, I., Miller, S.E., Bieri, G., Zuchero, J.B., Barres, B.A., Woo, P.J., Vogel, H., Monje, M., 2014. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* 344, 1252304. <https://doi.org/10.1126/science.1252304>
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2010. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell* 140, 918–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Goebel, T., Mausbach, S., Tuermer, A., Eltahir, H., Winter, D., Gieselmann, V., Thelen, M., 2020. Proteophagy in Mammalian Cells Can Function Independent of ATG5/ATG7 *. *Molecular & Cellular Proteomics* 19, 1120–1131. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.001983>
- Gossen, M., Bujard, H., 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5547–5551. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5547>
- Goti, D., Katzen, S.M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haïem, L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kakizuka, A., Sharp, A.H., Ross, C.A., Mouton, P.R., Colomer, V., 2004. A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci* 24, 10266–10279. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2734-04.2004>
- Goto, J., Watanabe, M., Ichikawa, Y., Yee, S.-B., Ihara, N., Endo, K., Igarashi, S., Takiyama, Y., Gaspar, C., Maciel, P., Tsuji, S., Rouleau, G.A., Kanazawa, I., 1997. Machado–Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neuroscience Research* 28, 373–377. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(97\)00056-4](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(97)00056-4)
- Grantham, J., 2020. The Molecular Chaperone CCT/TRiC: An Essential Component of Proteostasis and a Potential Modulator of Protein Aggregation. *Front Genet* 11, 172. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00172>
- Gray, N.K., Hrabáľková, L., Scanlon, J.P., Smith, R.W.P., 2015. Poly(A)-binding proteins and mRNA localization: who rules the roost? *Biochemical Society Transactions* 43, 1277–1284. <https://doi.org/10.1042/BST20150171>
- Guyenet, S.J., Furrer, S.A., Damian, V.M., Baughan, T.D., Spada, A.R.L., Garden, G.A., 2010. A Simple Composite Phenotype Scoring System for Evaluating Mouse Models of Cerebellar Ataxia. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e1787. <https://doi.org/10.3791/1787>
- Haas, E., Incebacak, R.D., Hentrich, T., Huridou, C., Schmidt, T., Casadei, N., Maringer, Y., Bahl, C., Zimmermann, F., Mills, J.D., Aronica, E., Riess, O., Schulze-Hentrich, J.M., Hübener-Schmid, J., 2022. A Novel SCA3 Knock-in Mouse Model Mimics the Human SCA3 Disease Phenotype Including Neuropathological, Behavioral, and Transcriptional Abnormalities Especially in Oligodendrocytes. *Mol Neurobiol* 59, 495–522. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02610-8>
- Harris, G.M., Dodelzon, K., Gong, L., Gonzalez-Alegre, P., Paulson, H.L., 2010. Splice isoforms of the polyglutamine disease protein ataxin-3 exhibit similar enzymatic yet different aggregation properties. *PLoS One* 5, e13695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013695>

- Hartley, S.W., Mullikin, J.C., 2016. Detection and visualization of differential splicing in RNA-Seq data with JunctionSeq. *Nucleic Acids Res* 44, e127. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw501>
- Hartley, S.W., Mullikin, J.C., 2015. QoRTs: a comprehensive toolset for quality control and data processing of RNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 16, 224. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0670-5>
- Hayashi, M., Kobayashi, K., Furuta, H., 2003. Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado-Joseph disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 57, 205–213. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1819.2003.01102.x>
- Herzog, L.K., Kevei, É., Marchante, R., Böttcher, C., Bindesbøll, C., Lystad, A.H., Pfeiffer, A., Gierisch, M.E., Salomons, F.A., Simonsen, A., Hoppe, T., Dantuma, N.P., 2020. The Machado–Joseph disease deubiquitylase ataxin-3 interacts with LC3C/GABARAP and promotes autophagy. *Aging Cell* 19, e13051. <https://doi.org/10.1111/accel.13051>
- Hockly, E., Woodman, B., Mahal, A., Lewis, C.M., Bates, G., 2003. Standardization and statistical approaches to therapeutic trials in the R6/2 mouse. *Brain Research Bulletin* 61, 469–479. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00185-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00185-0)
- Hou, X., Gong, X., Zhang, L., Li, T., Yuan, H., Xie, Y., Peng, Y., Qiu, R., Xia, K., Tang, B., Jiang, H., 2019. Identification of a potential exosomal biomarker in spinocerebellar ataxia Type 3/Machado–Joseph disease. *Epigenomics* 11, 1037–1056. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0081>
- Huang, F., Zhang, L., Long, Z., Chen, Z., Hou, X., Wang, C., Peng, H., Wang, J., Li, J., Duan, R., Xia, K., Chuang, D.-M., Tang, B., Jiang, H., 2014. miR-25 alleviates polyQ-mediated cytotoxicity by silencing ATXN3. *FEBS Letters* 588, 4791–4798. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.013>
- Hyrskyluoto, A., Bruelle, C., Lundh, S.H., Do, H.T., Kivinen, J., Rappou, E., Reijonen, S., Waltimo, T., Petersén, Å., Lindholm, D., Korhonen, L., 2014. Ubiquitin-specific protease-14 reduces cellular aggregates and protects against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of the proteasome and ER stress-activated kinase IRE1 α . *Human Molecular Genetics* 23, 5928–5939. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu317>
- Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., Kakizuka, A., 1996. Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet* 13, 196–202. <https://doi.org/10.1038/ng0696-196>
- Ito, N., Kamiguchi, K., Nakanishi, K., Sokolovskya, A., Hirohashi, Y., Tamura, Y., Murai, A., Yamamoto, E., Kanaseki, T., Tsukahara, T., Kochin, V., Chiba, S., Shimohama, S., Sato, N., Torigoe, T., 2016. A novel nuclear DnaJ protein, DNAJC8, can suppress the formation of spinocerebellar ataxia 3 polyglutamine aggregation in a J-domain independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 474, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.152>
- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., Sesaki, H., 2013. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in Cell Biology* 23, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.10.006>
- Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K., Nukina, N., 2005. Co-chaperone CHIP Associates with Expanded Polyglutamine Protein and Promotes Their Degradation by Proteasomes. *J. Biol. Chem.* 280, 11635–11640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412042200>

- Joers, J.M., Deelchand, D.K., Lyu, T., Emir, U.E., Hutter, D., Gomez, C.M., Bushara, K.O., Eberly, L.E., Öz, G., 2018. Neurochemical abnormalities in premanifest and early spinocerebellar ataxias. *Ann Neurol* 83, 816–829. <https://doi.org/10.1002/ana.25212>
- Kalmar, B., Innes, A., Wanisch, K., Kolaszynska, A.K., Pandraud, A., Kelly, G., Abramov, A.Y., Reilly, M.M., Schiavo, G., Greensmith, L., 2017. Mitochondrial deficits and abnormal mitochondrial retrograde axonal transport play a role in the pathogenesis of mutant Hsp27-induced Charcot Marie Tooth Disease. *Human Molecular Genetics* 26, 3313–3326. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx216>
- Kazachkova, N., Raposo, M., Ramos, A., Montiel, R., Lima, M., 2017. Promoter Variant Alters Expression of the Autophagic BECN1 Gene: Implications for Clinical Manifestations of Machado-Joseph Disease. *Cerebellum* 16, 957–963. <https://doi.org/10.1007/s12311-017-0875-4>
- Khan, L.A., Bauer, P.O., Miyazaki, H., Lindenberg, K.S., Landwehrmeyer, B.G., Nukina, N., 2006. Expanded polyglutamines impair synaptic transmission and ubiquitin–proteasome system in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurochemistry* 98, 576–587. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03895.x>
- Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L., 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 12, 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Klickstein, J.A., Mukkavalli, S., Raman, M., 2020. AggreCount: an unbiased image analysis tool for identifying and quantifying cellular aggregates in a spatially defined manner. *Journal of Biological Chemistry* 295, 17672–17683. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015398>
- Klockgether, T., Mariotti, C., Paulson, H.L., 2019. Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers* 5, 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0074-3>
- Klockgether, T., Schöls, L., Abele, M., Bürk, K., Topka, H., Andres, F., Amoiridis, G., Lüdtke, R., Riess, O., Laccone, F., Dichgans, J., 1999. Age related axonal neuropathy in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease (SCA3/MJD). *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 66, 222–224. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.222>
- Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tüting, T., Hoffmann, P., Klockgether, T., Evert, B.O., Wüllner, U., Brüstle, O., 2011. Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature* 480, 543–546. <https://doi.org/10.1038/nature10671>
- Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J., Brüstle, O., 2009. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3225–3230. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808387106>
- Konno, A., Shuvaev, A.N., Miyake, N., Miyake, K., Iizuka, A., Matsuura, S., Huda, F., Nakamura, K., Yanagi, S., Shimada, T., Hirai, H., 2014. Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells. *Cerebellum* 13, 29–41. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0516-5>
- Kopito, R.R., 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10, 524–530. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01852-3](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01852-3)
- Kristensen, L.V., Oppermann, F.S., Rauen, M.J., Fog, K., Schmidt, T., Schmidt, J., Harmuth, T., Hartmann-Petersen, R., Thirstrup, K., 2018. Mass spectrometry analyses of normal and

- polyglutamine expanded ataxin-3 reveal novel interaction partners involved in mitochondrial function. *Neurochem. Int.* 112, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.013>
- Kwiatkowski, T.J., Bosco, D.A., LeClerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G.A., Hosler, B.A., Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E., Brown, R.H., 2009. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 323, 1205–1208. <https://doi.org/10.1126/science.1166066>
- Kwon, H.S., Koh, S.-H., 2020. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration* 9, 42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
- Lee, B.-H., Lee, M.J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Chen, P.-C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gygi, S.P., Wilson, S.M., King, R.W., Finley, D., 2010. Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 467, 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature09299>
- Legleiter, J., Mitchell, E., Lotz, G.P., Sapp, E., Ng, C., DiFiglia, M., Thompson, L.M., Muchowski, P.J., 2010. Mutant Huntingtin Fragments Form Oligomers in a Polyglutamine Length-dependent Manner in Vitro and in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 14777–14790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.093708>
- Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R.N., Chakravarti, D., 2002a. Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem* 277, 45004–45012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205259200>
- Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R.N., Chakravarti, D., 2002b. Ataxin-3 Is a Histone-binding Protein with Two Independent Transcriptional Corepressor Activities. *J. Biol. Chem.* 277, 45004–45012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205259200>
- Li, W., 2013. Phagocyte dysfunction, tissue aging and degeneration. *Ageing Research Reviews* 12, 1005–1012. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.05.006>
- Linnemann, C., Tezenas du Montcel, S., Rakowicz, M., Schmitz-Hübsch, T., Szymanski, S., Berciano, J., van de Warrenburg, B.P., Pedersen, K., Depondt, C., Rola, R., Klockgether, T., García, A., Mutlu, G., Schöls, L., 2016. Peripheral Neuropathy in Spinocerebellar Ataxia Type 1, 2, 3, and 6. *Cerebellum* 15, 165–173. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0684-6>
- Lomonosova, E., Chinnadurai, G., 2008. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 Suppl 1, S2-19. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.39>
- Lopes, T.M., D'Abreu, A., França, M.C., Yasuda, C.L., Betting, L.E., Samara, A.B., Castellano, G., Somazz, J.C., Balthazar, M.L.F., Lopes-Cendes, I., Cendes, F., 2013. Widespread neuronal damage and cognitive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurol* 260, 2370–2379. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-6998-8>
- Lopez-Reyes, R.G., Quinet, G., Gonzalez-Santamarta, M., Larrue, C., Sarry, J.-E., Rodriguez, M.S., 2021. Inhibition of the proteasome and proteaphagy enhances apoptosis in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. *FEBS Open Bio* 11, 48–60. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12950>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- Lu, M.-K., Chen, J.-C., Chen, C.-M., Duann, J.-R., Ziemann, U., Tsai, C.-H., 2017. Impaired Cerebellum to Primary Motor Cortex Associative Plasticity in Parkinson's Disease and Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Front Neurol* 8, 445. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00445>
- Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P.P., Polo, S., Hodsdon, M.E., De Camilli, P., 2005. Deubiquitinating function of ataxin-3: Insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 12700–12705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506344102>
- Marcelo, A., Brito, F., Carmo-Silva, S., Matos, C.A., Alves-Cruzeiro, J., Vasconcelos-Ferreira, A., Koppenol, R., Mendonça, L., de Almeida, L.P., Nóbrega, C., 2019. Cordycepin activates autophagy through AMPK phosphorylation to reduce abnormalities in Machado–Joseph disease models. *Human Molecular Genetics* 28, 51–63. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy328>
- Masino, L., Musi, V., Menon, R.P., Fusi, P., Kelly, G., Frenkiel, T.A., Trottier, Y., Pastore, A., 2003. Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Letters* 549, 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00748-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00748-8)
- Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., Nakayama, K.I., 2004. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J.* 23, 659–669. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600081>
- Mazzucchelli, S., De Palma, A., Riva, M., D'Urzo, A., Pozzi, C., Pastori, V., Comelli, F., Fusi, P., Vanoni, M., Tortora, P., Mauri, P., Regonesi, M.E., 2009a. Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2485–2492. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.08.003>
- Mazzucchelli, S., De Palma, A., Riva, M., D'Urzo, A., Pozzi, C., Pastori, V., Comelli, F., Fusi, P., Vanoni, M., Tortora, P., Mauri, P., Regonesi, M.E., 2009b. Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2485–2492. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.08.003>
- McLoughlin, H.S., Moore, L.R., Paulson, H.L., 2020. Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiology of Disease* 134, 104635. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104635>
- Mendonça, L.S., Nóbrega, C., Hirai, H., Kaspar, B.K., Pereira de Almeida, L., 2015. Transplantation of cerebellar neural stem cells improves motor coordination and neuropathology in Machado-Joseph disease mice. *Brain* 138, 320–335. <https://doi.org/10.1093/brain/awu352>
- Mendonça, L.S., Nóbrega, C., Tavino, S., Brinkhaus, M., Matos, C., Tomé, S., Moreira, R., Henriques, D., Kaspar, B.K., Pereira de Almeida, L., 2019. Ibuprofen enhances synaptic function and neural progenitors proliferation markers and improves neuropathology and motor coordination in Machado–Joseph disease models. *Human Molecular Genetics* 28, 3691–3703. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz097>
- Menzies, F.M., Huebener, J., Renna, M., Bonin, M., Riess, O., Rubinsztein, D.C., 2010. Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain* 133, 93–104. <https://doi.org/10.1093/brain/awp292>
- Misgeld, T., Schwarz, T.L., 2017. Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron* 96, 651–666. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.055>

- Moore, L.R., Keller, L., Bushart, D.D., Delatorre, R.G., Li, D., McLoughlin, H.S., do Carmo Costa, M., Shakkottai, V.G., Smith, G.D., Paulson, H.L., 2019. Antisense oligonucleotide therapy rescues aggregates formation in a novel spinocerebellar ataxia type 3 human embryonic stem cell line. *Stem Cell Research* 39, 101504. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101504>
- Mosher, K.I., Wyss-Coray, T., 2014. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology, Alzheimer's Disease – Amyloid, Tau and Beyond* 88, 594–604. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.008>
- Mueller, T., Breuer, P., Schmitt, I., Walter, J., Evert, B.O., Wüllner, U., 2009. CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3. *Human Molecular Genetics* 18, 3334–3343. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp274>
- Nascimento-Ferreira, I., Santos-Ferreira, T., Sousa-Ferreira, L., Auregan, G., Onofre, I., Alves, S., Dufour, N., Colomer Gould, V.F., Koeppe, A., Déglon, N., Pereira de Almeida, L., 2011. Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain* 134, 1400–1415. <https://doi.org/10.1093/brain/awr047>
- Nguyen, E.K., Koval, O.M., Noble, P., Broadhurst, K., Allamargot, C., Wu, M., Strack, S., Thiel, W.H., Grumbach, I.M., 2018. CaMKII (Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II) in Mitochondria of Smooth Muscle Cells Controls Mitochondrial Mobility, Migration, and Neointima Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38, 1333–1345. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310951>
- Nicastro, G., Habeck, M., Masino, L., Svergun, D.I., Pastore, A., 2006. Structure validation of the Josephin domain of ataxin-3: Conclusive evidence for an open conformation. *J Biomol NMR* 36, 267–277. <https://doi.org/10.1007/s10858-006-9092-z>
- Nicastro, G., Masino, L., Esposito, V., Menon, R.P., De Simone, A., Fraternali, F., Pastore, A., 2009. Josephin domain of ataxin-3 contains two distinct ubiquitin-binding sites. *Biopolymers* 91, 1203–1214. <https://doi.org/10.1002/bip.21210>
- Nicastro, G., Menon, R.P., Masino, L., Knowles, P.P., McDonald, N.Q., Pastore, A., 2005. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: Structural determinants for molecular recognition. *PNAS* 102, 10493–10498. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501732102>
- Nicastro, G., Todi, S.V., Karaca, E., Bonvin, A.M.J.J., Paulson, H.L., Pastore, A., 2010. Understanding the Role of the Josephin Domain in the PolyUb Binding and Cleavage Properties of Ataxin-3. *PLOS ONE* 5, e12430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012430>
- Nóbrega, C., Codêso, J.M., Mendonça, L., Pereira de Almeida, L., 2019a. RNA Interference Therapy for Machado–Joseph Disease: Long-Term Safety Profile of Lentiviral Vectors Encoding Short Hairpin RNAs Targeting Mutant Ataxin-3. *Human Gene Therapy* 30, 841–854. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.157>
- Nóbrega, C., Mendonça, L., Marcelo, A., Lamazière, A., Tomé, S., Despres, G., Matos, C.A., Mehmet, F., Langui, D., den Dunnen, W., de Almeida, L.P., Cartier, N., Alves, S., 2019b. Restoring brain cholesterol turnover improves autophagy and has therapeutic potential in mouse models of spinocerebellar ataxia. *Acta Neuropathol* 138, 837–858. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02019-7>
- Nuber, S., Petrasch-Parwez, E., Winner, B., Winkler, J., Hörsten, S. von, Schmidt, T., Boy, J., Kuhn, M., Nguyen, H.P., Teismann, P., Schulz, J.B., Neumann, M., Pichler, B.J., Reischl, G., Holzmann, C., Schmitt, I., Bornemann, A., Kuhn, W., Zimmermann, F., Servadio, A.,

- Riess, O., 2008. Neurodegeneration and Motor Dysfunction in a Conditional Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 28, 2471–2484. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3040-07.2008>
- Olzmann, J.A., Li, L., Chin, L.S., 2008. Aggresome formation and neurodegenerative diseases: therapeutic implications. *Curr Med Chem* 15, 47–60. <https://doi.org/10.2174/092986708783330692>
- Onofre, I., Mendonça, N., Lopes, S., Nobre, R., de Melo, J.B., Carreira, I.M., Januário, C., Gonçalves, A.F., de Almeida, L.P., 2016. Fibroblasts of Machado Joseph Disease patients reveal autophagy impairment. *Sci Rep* 6, 28220. <https://doi.org/10.1038/srep28220>
- Otomo, A., Ono, S., Sato, K., Mitsui, S., Shimakura, K., Kimura, H., Hadano, S., 2022. High-throughput quantitative analysis of axonal transport in cultured neurons from SOD1H46R ALS mice by using a microfluidic device. *Neuroscience Research* 174, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2021.07.005>
- Ou, Z., Luo, M., Niu, X., Chen, Y., Xie, Y., He, W., Song, B., Xian, Y., Fan, D., OuYang, S., Sun, X., 2016. Autophagy Promoted the Degradation of Mutant ATXN3 in Neurally Differentiated Spinocerebellar Ataxia-3 Human Induced Pluripotent Stem Cells. *BioMed Research International* 2016, e6701793. <https://doi.org/10.1155/2016/6701793>
- Park, H., Kim, H.-J., Jeon, B.S., 2015. Parkinsonism in spinocerebellar ataxia. *Biomed Res Int* 2015, 125273. <https://doi.org/10.1155/2015/125273>
- Patel, R.K., Jain, M., 2012. NGS QC Toolkit: A Toolkit for Quality Control of Next Generation Sequencing Data. *PLOS ONE* 7, e30619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030619>
- Paulson, H.L., Perez, M.K., Trottier, Y., Trojanowski, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.L., Fischbeck, K.H., Pittman, R.N., 1997. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19, 333–344.
- Paulson, H.L., Shakkottai, V.G., Clark, H.B., Orr, H.T., 2017. Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments. *Nat Rev Neurosci* 18, 613–626. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.92>
- Pavel, M., Imarisio, S., Menzies, F.M., Jimenez-Sanchez, M., Siddiqi, F.H., Wu, X., Renna, M., O’Kane, C.J., Crowther, D.C., Rubinsztein, D.C., 2016. CCT complex restricts neuropathogenic protein aggregation via autophagy. *Nat Commun* 7, 13821. <https://doi.org/10.1038/ncomms13821>
- Pedroso, J.L., Braga-Neto, P., Felício, A.C., Dutra, L.A., Santos, W.A.C., do Prado, G.F., Barsottini, O.G.P., 2011. Sleep disorders in machado-joseph disease: frequency, discriminative thresholds, predictive values, and correlation with ataxia-related motor and non-motor features. *Cerebellum* 10, 291–295. <https://doi.org/10.1007/s12311-011-0252-7>
- Pellistri, F., Bucciantini, M., Invernizzi, G., Gatta, E., Penco, A., Frana, A.M., Nosi, D., Relini, A., Regonesi, M.E., Gliozzi, A., Tortora, P., Robello, M., Stefani, M., 2013. Different ataxin-3 amyloid aggregates induce intracellular Ca²⁺ deregulation by different mechanisms in cerebellar granule cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 3155–3165. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.08.019>
- Pertea, M., Kim, D., Pertea, G.M., Leek, J.T., Salzberg, S.L., 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* 11, 1650–1667. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.095>

- Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.-C., Mendell, J.T., Salzberg, S.L., 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat. Biotechnol.* 33, 290–295. <https://doi.org/10.1038/nbt.3122>
- Peterson, R.T., Schreiber, S.L., 1998. Translation control: Connecting mitogens and the ribosome. *Current Biology* 8, R248–R250. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70152-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70152-6)
- Piccioni, F., Pinton, P., Simeoni, S., Pozzi, P., Fascio, U., Vismara, G., Martini, L., Rizzuto, R., Poletti, A., 2002. Androgen receptor with elongated polyglutamine tract forms aggregates that alter axonal trafficking and mitochondrial distribution in motor neuronal processes. *FASEB J* 16, 1418–1420. <https://doi.org/10.1096/fj.01-1035fje>
- Ramani, B., Harris, G.M., Huang, R., Seki, T., Murphy, G.G., Carmo Costa, M. do, Fischer, S., Saunders, T.L., Xia, G., McEachin, R.C., Paulson, H.L., 2017. A knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 exhibits prominent aggregate pathology and aberrant splicing of the disease gene transcript. *Hum Mol Genet* 26, 3232–3233. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx176>
- Ramani, B., Harris, G.M., Huang, R., Seki, T., Murphy, G.G., Costa, M. do C., Fischer, S., Saunders, T.L., Xia, G., McEachin, R.C., Paulson, H.L., 2015. A knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 exhibits prominent aggregate pathology and aberrant splicing of the disease gene transcript. *Hum Mol Genet* 24, 1211–1224. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu532>
- Raposo, M., Bettencourt, C., Maciel, P., Gao, F., Ramos, A., Kazachkova, N., Vasconcelos, J., Kay, T., Rodrigues, A.J., Bettencourt, B., Bruges-Armas, J., Geschwind, D., Coppola, G., Lima, M., 2015. Novel candidate blood-based transcriptional biomarkers of machado-joseph disease. *Movement Disorders* 30, 968–975. <https://doi.org/10.1002/mds.26238>
- Reina, C.P., Zhong, X., Pittman, R.N., 2010. Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet* 19, 235–249. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp482>
- Rodrigues, A.-J., do Carmo Costa, M., Silva, T.-L., Ferreira, D., Bajanca, F., Logarinho, E., Maciel, P., 2010. Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 1154–1163. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.07.004>
- Rodríguez-Martín, T., Pooler, A.M., Lau, D.H.W., Mórotz, G.M., De Vos, K.J., Gilley, J., Coleman, M.P., Hanger, D.P., 2016. Reduced number of axonal mitochondria and tau hypophosphorylation in mouse P301L tau knockin neurons. *Neurobiology of Disease* 85, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.007>
- Romano, S., Coarelli, G., Marcotulli, C., Leonardi, L., Piccolo, F., Spadaro, M., Frontali, M., Ferraldeschi, M., Vulpiani, M.C., Ponzelli, F., Salvetti, M., Orzi, F., Petrucci, A., Vanacore, N., Casali, C., Ristori, G., 2015. Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 14, 985–991. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00201-X)
- Rüb, U., Brunt, E.R., de Vos, R. a. I., Del Turco, D., Del Tredici, K., Gierga, K., Schultz, C., Ghebremedhin, E., Bürk, K., Auburger, G., Braak, H., 2004. Degeneration of the central vestibular system in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients and its possible clinical significance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 402–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2004.00554.x>
- Rüb, U., de Vos, R. a. I., Brunt, E.R., Schultz, C., Paulson, H., Del Tredici, K., Braak, H., 2002a. Degeneration of the external cuneate nucleus in spinocerebellar ataxia type 3

- (Machado-Joseph disease). *Brain Res* 953, 126–134. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03278-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03278-x)
- Rüb, U., de Vos, R. a. I., Schultz, C., Brunt, E.R., Paulson, H., Braak, H., 2002b. Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain* 125, 2115–2124. <https://doi.org/10.1093/brain/awf208>
- Rüb, U., Del Turco, D., Del Tredici, K., de Vos, R. a. I., Brunt, E.R., Reifenger, G., Seifried, C., Schultz, C., Auburger, G., Braak, H., 2003. Thalamic involvement in a spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) and a spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patient, and its clinical relevance. *Brain* 126, 2257–2272. <https://doi.org/10.1093/brain/awg234>
- Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J.C., Seidel, K., Korf, H.-W., Deller, T., 2013. Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol* 104, 38–66. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.01.001>
- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, Å., Aspenstrom, P., Rizzuto, R., Hajnóczky, G., 2008. Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 20728–20733. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808953105>
- Saute, J.A.M., de Castilhos, R.M., Monte, T.L., Schumacher-Schuh, A.F., Donis, K.C., D'Ávila, R., Souza, G.N., Russo, A.D., Furtado, G.V., Gheno, T.C., de Souza, D.O.G., Portela, L.V.C., Saraiva-Pereira, M.-L., Camey, S.A., Torman, V.B.L., de Mello Rieder, C.R., Jardim, L.B., 2014. A randomized, phase 2 clinical trial of lithium carbonate in Machado-Joseph disease. *Movement Disorders* 29, 568–573. <https://doi.org/10.1002/mds.25803>
- Scaglione, K.M., Zavodszky, E., Todi, S.V., Patury, S., Xu, P., Rodríguez-Lebrón, E., Fischer, S., Konen, J., Djarmati, A., Peng, J., Gestwicki, J.E., Paulson, H.L., 2011. Ube2w and ataxin-3 coordinately regulate the ubiquitin ligase CHIP. *Mol Cell* 43, 599–612. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.036>
- Scali, C., Prospero, C., Bracco, L., Piccini, C., Baronti, R., Ginestroni, A., Sorbi, S., Pepeu, G., Casamenti, F., 2002. Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE2 are elevated in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 23, 523–530. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00346-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00346-3)
- Schmidt, J., Mayer, A.K., Bakula, D., Freude, J., Weber, J.J., Weiss, A., Riess, O., Schmidt, T., n.d. Vulnerability of frontal brain neurons for the toxicity of expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy437>
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G.B., Schmitt, I., Trottier, Y., Auburger, G., Laccone, F., Klockgether, T., Völpel, M., Epplen, J.T., Schöls, L., Riess, O., 1998. An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol* 8, 669–679. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x>
- Schmidt, T., Lindenberg, K.S., Krebs, A., Schöls, L., Laccone, F., Herms, J., Rechsteiner, M., Riess, O., Landwehrmeyer, G.B., 2002. Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 51, 302–310. <https://doi.org/10.1002/ana.10101>
- Schmitt, I., Linden, M., Khazneh, H., Evert, B.O., Breuer, P., Klockgether, T., Wuellner, U., 2007. Inactivation of the mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, 734–739. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.062>

- Schwarz, T.L., 2013. Mitochondrial Trafficking in Neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a011304. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011304>
- Seidel, K., den Dunnen, W.F.A., Schultz, C., Paulson, H., Frank, S., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Deller, T., Kampinga, H.H., Rüb, U., 2010. Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathol* 120, 449–460. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0717-7>
- Seidel, K., Siswanto, S., Fredrich, M., Bouzrou, M., den Dunnen, W.F.A., Özerden, I., Korf, H.-W., Melegh, B., de Vries, J.J., Brunt, E.R., Auburger, G., Rüb, U., 2017. On the distribution of intranuclear and cytoplasmic aggregates in the brainstem of patients with spinocerebellar ataxia type 2 and 3. *Brain Pathol* 27, 345–355. <https://doi.org/10.1111/bpa.12412>
- Seidel, K., Vinet, J., den Dunnen, W.F.A., Brunt, E.R., Meister, M., Boncoraglio, A., Zijlstra, M.P., Boddeke, H.W.G.M., Rüb, U., Kampinga, H.H., Carra, S., 2012. The HSPB8-BAG3 chaperone complex is upregulated in astrocytes in the human brain affected by protein aggregation diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38, 39–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01198.x>
- Seshagiri, D.V., Botta, R., Sasidharan, A., Kumar Pal, P., Jain, S., Yadav, R., Kutty, B.M., 2018. Assessment of Sleep Spindle Density among Genetically Positive Spinocerebellar Ataxias Types 1, 2, and 3 Patients. *Ann Neurosci* 25, 106–111. <https://doi.org/10.1159/000484516>
- Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M., Hisanaga, S., 2012. Regulation of Mitochondrial Transport and Inter-Microtubule Spacing by Tau Phosphorylation at the Sites Hyperphosphorylated in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 32, 2430–2441. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5927-11.2012>
- Shakkottai, V.G., Costa, M. do C., Dell'Orco, J.M., Sankaranarayanan, A., Wulff, H., Paulson, H.L., 2011. Early Changes in Cerebellar Physiology Accompany Motor Dysfunction in the Polyglutamine Disease Spinocerebellar Ataxia Type 3. *J. Neurosci.* 31, 13002–13014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2789-11.2011>
- Sheng, Z.-H., Cai, Q., 2012. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13, 77–93. <https://doi.org/10.1038/nrn3156>
- Shi, Y., Huang, F., Tang, B., Li, J., Wang, J., Shen, L., Xia, K., Jiang, H., 2014. MicroRNA profiling in the serums of SCA3/MJD patients. *International Journal of Neuroscience* 124, 97–101. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.827679>
- Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y., Ishiguro, H., Sakoe, K., Ooshima, T., Sato, A., Ikeuchi, T., Oyake, M., Sato, T., Aoyagi, Y., Hozumi, I., Nagatsu, T., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Goto, J., Kanazawa, I., Davidson, I., Tanese, N., Takahashi, H., Tsuji, S., 2000. Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat Genet* 26, 29–36. <https://doi.org/10.1038/79139>
- Shirendeb, U.P., Calkins, M.J., Manczak, M., Anekonda, V., Dufour, B., McBride, J.L., Mao, P., Reddy, P.H., 2012. Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 21, 406–420. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr475>
- Silva-Fernandes, A., Costa, M. do C., Duarte-Silva, S., Oliveira, P., Botelho, C.M., Martins, L., Mariz, J.A., Ferreira, T., Ribeiro, F., Correia-Neves, M., Costa, C., Maciel, P., 2010. Motor

- uncoordination and neuropathology in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease lacking intranuclear inclusions and ataxin-3 cleavage products. *Neurobiol Dis* 40, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.021>
- Sittler, A., Muriel, M.-P., Marinello, M., Brice, A., den Dunnen, W., Alves, S., 2018. Deregulation of autophagy in postmortem brains of Machado-Joseph disease patients. *Neuropathology* 38, 113–124. <https://doi.org/10.1111/neup.12433>
- Sowa, A.S., Martin, E., Martins, I.M., Schmidt, J., Depping, R., Weber, J.J., Rother, F., Hartmann, E., Bader, M., Riess, O., Tricoire, H., Schmidt, T., 2018. Karyopherin α -3 is a key protein in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 controlling the nuclear localization of ataxin-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E2624–E2633. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716071115>
- Sowa, M.E., Bennett, E.J., Gygi, S.P., Harper, J.W., 2009. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* 138, 389–403. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.042>
- Streit, W.J., Xue, Q.-S., 2009. Life and Death of Microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 371. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9163-5>
- Stykel, M.G., Humphries, K., Kirby, M.P., Czaniecki, C., Wang, T., Ryan, T., Bamm, V., Ryan, S.D., 2018. Nitration of microtubules blocks axonal mitochondrial transport in a human pluripotent stem cell model of Parkinson's disease. *The FASEB Journal* 32, 5350–5364. <https://doi.org/10.1096/fj.201700759RR>
- Suga, N., Katsuno, M., Koike, H., Banno, H., Suzuki, K., Hashizume, A., Mano, T., Iijima, M., Kawagashira, Y., Hirayama, M., Nakamura, T., Watanabe, H., Tanaka, F., Sobue, G., 2014. Schwann cell involvement in the peripheral neuropathy of spinocerebellar ataxia type 3. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40, 628–639. <https://doi.org/10.1111/nan.12055>
- Switonski, P.M., Szlachcic, W.J., Krzyzosiak, W.J., Figiel, M., 2015a. A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines the genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD. *Neurobiol. Dis.* 73, 174–188. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.020>
- Switonski, P.M., Szlachcic, W.J., Krzyzosiak, W.J., Figiel, M., 2015b. A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines the genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD. *Neurobiol. Dis.* 73, 174–188. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.020>
- Takeuchi, T., Nagai, Y., 2017. Protein Misfolding and Aggregation as a Therapeutic Target for Polyglutamine Diseases. *Brain Sciences* 7, 128. <https://doi.org/10.3390/brainsci7100128>
- Tamanini, F., Willemsen, R., van Unen, L., Bontekoe, C., Galjaard, H., Oostra, B.A., Hoogeveen, A.T., 1997. Differential Expression of FMR1, FXR1 and FXR2 Proteins in Human Brain and Testis. *Human Molecular Genetics* 6, 1315–1322. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.8.1315>
- Teixeira-Castro, A., Jalles, A., Esteves, S., Kang, S., da Silva Santos, L., Silva-Fernandes, A., Neto, M.F., Briemann, R.M., Bessa, C., Duarte-Silva, S., Miranda, A., Oliveira, S., Neves-Carvalho, A., Bessa, J., Summavielle, T., Silverman, R.B., Oliveira, P., Morimoto, R.I., Maciel, P., 2015. Serotonergic signalling suppresses ataxin 3 aggregation and neurotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease. *Brain* 138, 3221–3237. <https://doi.org/10.1093/brain/awv262>

- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M., 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19, 94–102. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.94>
- Todi, S.V., Scaglione, K.M., Blount, J.R., Basrur, V., Conlon, K.P., Pastore, A., Elenitoba-Johnson, K., Paulson, H.L., 2010. Activity and Cellular Functions of the Deubiquitinating Enzyme and Polyglutamine Disease Protein Ataxin-3 Are Regulated by Ubiquitination at Lysine 117. *J Biol Chem* 285, 39303–39313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181610>
- Todi, S.V., Winborn, B.J., Scaglione, K.M., Blount, J.R., Travis, S.M., Paulson, H.L., 2009. Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3. *The EMBO Journal* 28, 372–382. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.289>
- Toonen, L.J.A., Overzier, M., Evers, M.M., Leon, L.G., van der Zeeuw, S.A.J., Mei, H., Kielbasa, S.M., Goeman, J.J., Hettne, K.M., Magnusson, O.T., Poirel, M., Seyer, A., 't Hoen, P.A.C., van Roon-Mom, W.M.C., 2018. Transcriptional profiling and biomarker identification reveal tissue specific effects of expanded ataxin-3 in a spinocerebellar ataxia type 3 mouse model. *Mol Neurodegener* 13, 31. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0261-9>
- Tort, A.B.L., Portela, L.V.C., Rockenbach, I.C., Monte, T.L., Pereira, M.L., Souza, D.O., Rieder, C.R.M., Jardim, L.B., 2005. S100B and NSE serum concentrations in Machado Joseph disease. *Clinica Chimica Acta* 351, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.08.010>
- Tremblay, P., Meiner, Z., Galou, M., Heinrich, C., Petromilli, C., Lisse, T., Cayetano, J., Torchia, M., Mobley, W., Bujard, H., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., 1998. Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 12580–12585. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12580>
- Trottier, Y., Cancel, G., An-Gourfinkel, I., Lutz, Y., Weber, C., Brice, A., Hirsch, E., Mandel, J.-L., 1998. Heterogeneous Intracellular Localization and Expression of Ataxin-3. *Neurobiology of Disease* 5, 335–347. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0208>
- Uchihara, T., Fujigasaki, H., Koyano, S., Nakamura, A., Yagishita, S., Iwabuchi, K., 2001. Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias--triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol* 102, 149–152. <https://doi.org/10.1007/s004010100364>
- Vos, M.J., Zijlstra, M.P., Kanon, B., van Waarde-Verhagen, M.A.W.H., Brunt, E.R.P., Oosterveld-Hut, H.M.J., Carra, S., Sibon, O.C.M., Kampinga, H.H., 2010. HSPB7 is the most potent polyQ aggregation suppressor within the HSPB family of molecular chaperones. *Human Molecular Genetics* 19, 4677–4693. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq398>
- Wang, H., Ying, Z., Wang, G., 2012. Ataxin-3 regulates aggresome formation of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) by editing K63-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem* 287, 28576–28585. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.299990>
- Wang, T.-Y., Jao, C.-W., Soong, B.-W., Wu, H.-M., Shyu, K.-K., Wang, P.-S., Wu, Y.-T., 2015. Change in the cortical complexity of spinocerebellar ataxia type 3 appears earlier than clinical symptoms. *PLoS ONE* 10, e0118828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118828>
- Wang, X., Schwarz, T.L., 2009. The Mechanism of Ca²⁺-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility. *Cell* 136, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.046>

- Wang, Z., 2018. Experimental and Clinical Strategies for Treating Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuroscience* 371, 138–154. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.051>
- Warrick, J.M., Chan, H.Y.E., Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L., Bonini, N.M., 1999. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet* 23, 425–428. <https://doi.org/10.1038/70532>
- Watanabe, M., Hoshino, C., Konno, A., Fukuzaki, Y., Matsuzaki, Y., Ishitani, T., Hirai, H., 2019. Pharmacological enhancement of retinoid-related orphan receptor α function mitigates spinocerebellar ataxia type 3 pathology. *Neurobiology of Disease* 121, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.014>
- Watanabe, M., Matsuzaki, Y., Nakajima, Y., Ozawa, A., Yamada, M., Hirai, H., 2018. Contribution of Thyrotropin-Releasing Hormone to Cerebellar Long-Term Depression and Motor Learning. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12.
- Watchon, M., Yuan, K.C., Mackovski, N., Svahn, A.J., Cole, N.J., Goldsbury, C., Rinkwitz, S., Becker, T.S., Nicholson, G.A., Laird, A.S., 2017. Calpain Inhibition Is Protective in Machado–Joseph Disease Zebrafish Due to Induction of Autophagy. *J. Neurosci.* 37, 7782–7794. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1142-17.2017>
- Watkins-Chow, D.E., Pavan, W.J., 2008. Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strain. *Genome Res.* 18, 60–66. <https://doi.org/10.1101/gr.6927808>
- Weeks, S.D., Grasty, K.C., Hernandez-Cuebas, L., Loll, P.J., 2011. Crystal Structure of a Josephin-Ubiquitin Complex: EVOLUTIONARY RESTRAINTS ON ATAXIN-3 DEUBIQUITINATING ACTIVITY *. *Journal of Biological Chemistry* 286, 4555–4565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.177360>
- Weiler, I.J., Irwin, S.A., Klintsova, A.Y., Spencer, C.M., Brazelton, A.D., Miyashiro, K., Comery, T.A., Patel, B., Eberwine, J., Greenough, W.T., 1997. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5395–5400.
- Weishäupl, D., Schneider, J., Peixoto Pinheiro, B., Ruess, C., Dold, S.M., von Zweydford, F., Gloeckner, C.J., Schmidt, J., Riess, O., Schmidt, T., 2019. Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms. *J. Biol. Chem.* 294, 644–661. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005801>
- Wiatr, K., Marczak, Ł., Pérot, J.-B., Brouillet, E., Flament, J., Figiel, M., 2021. Broad Influence of Mutant Ataxin-3 on the Proteome of the Adult Brain, Young Neurons, and Axons Reveals Central Molecular Processes and Biomarkers in SCA3/MJD Using Knock-In Mouse Model. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14, 74. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.658339>
- Wiatr, K., Piasecki, P., Marczak, Ł., Wojciechowski, P., Kurkowiak, M., Płoski, R., Rydzanicz, M., Handschuh, L., Jungverdorben, J., Brüstle, O., Figlerowicz, M., Figiel, M., 2019. Altered Levels of Proteins and Phosphoproteins, in the Absence of Early Causative Transcriptional Changes, Shape the Molecular Pathogenesis in the Brain of Young Presymptomatic Ki91 SCA3/MJD Mouse. *Mol Neurobiol* 56, 8168–8202. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01643-4>
- Winborn, B.J., Travis, S.M., Todi, S.V., Scaglione, K.M., Xu, P., Williams, A.J., Cohen, R.E., Peng, J., Paulson, H.L., 2008. The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J. Biol. Chem.* 283, 26436–26443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803692200>

- Woolums, B.M., McCray, B.A., Sung, H., Tabuchi, M., Sullivan, J.M., Ruppell, K.T., Yang, Y., Mamah, C., Aisenberg, W.H., Saavedra-Rivera, P.C., Larin, B.S., Lau, A.R., Robinson, D.N., Xiang, Y., Wu, M.N., Sumner, C.J., Lloyd, T.E., 2020. TRPV4 disrupts mitochondrial transport and causes axonal degeneration via a CaMKII-dependent elevation of intracellular Ca²⁺. *Nat Commun* 11, 2679. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16411-5>
- Yamada, M., Hayashi, S., Tsuji, S., Takahashi, H., 2001. Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol.* 101, 140–144.
- Yiu, E.M., Tai, G., Peverill, R.E., Lee, K.J., Croft, K.D., Mori, T.A., Scheiber-Mojdehkar, B., Sturm, B., Pranschberger, M., Vogel, A.P., Rance, G., Stephenson, S.E.M., Sarsero, J.P., Stockley, C., Lee, C.-Y.J., Churchyard, A., Evans-Galea, M.V., Ryan, M.M., Lockhart, P.J., Corben, L.A., Delatycki, M.B., 2015. An open-label trial in Friedreich ataxia suggests clinical benefit with high-dose resveratrol, without effect on frataxin levels. *J Neurol* 262, 1344–1353. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7719-2>
- Zesiewicz, T.A., Greenstein, P.E., Sullivan, K.L., Wecker, L., Miller, A., Jahan, I., Chen, R., Perlman, S.L., 2012. A randomized trial of varenicline (Chantix) for the treatment of spinocerebellar ataxia type 3. *Neurology* 78, 545–550. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318247cc7a>
- Zhao, X., Chen, X.-Q., Han, E., Hu, Y., Paik, P., Ding, Z., Overman, J., Lau, A.L., Shahmoradian, S.H., Chiu, W., Thompson, L.M., Wu, C., Mobley, W.C., 2016. TRiC subunits enhance BDNF axonal transport and rescue striatal atrophy in Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E5655–E5664. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603020113>
- Zhemkov, V.A., Kulminskaya, A.A., Bezprozvanny, I.B., Kim, M., 2016. The 2.2-Angstrom resolution crystal structure of the carboxy-terminal region of ataxin-3. *FEBS Open Bio* 6, 168–178. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12029>
- Zhou, J., Lei, L., Shi, Y., Wang, J., Jiang, H., Shen, L., Tang, B., 2011. Serum concentrations of NSE and S100B in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 36, 504–510. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-7347.2011.06.006>
- Zhou, L., Wang, H., Chen, D., Gao, F., Ying, Z., Wang, G., 2014. p62/sequestosome 1 regulates aggresome formation of pathogenic ataxin-3 with expanded polyglutamine. *Int J Mol Sci* 15, 14997–15010. <https://doi.org/10.3390/ijms150914997>
- Zhou, Y.-F., Liao, S.-S., Luo, Y.-Y., Tang, J.-G., Wang, J.-L., Lei, L.-F., Chi, J.-W., Du, J., Jiang, H., Xia, K., Tang, B.-S., Shen, L., 2013. SUMO-1 Modification on K166 of PolyQ-Expanded aTaxin-3 Strengthens Its Stability and Increases Its Cytotoxicity. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054214>
- Zhu, Z., Reiser, G., 2018. The small heat shock proteins, especially HspB4 and HspB5 are promising protectants in neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International* 115, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.006>

8. Spis tabel

Tabela 1. Spis badań klinicznych potencjalnych terapii SCA3..... 32

Tabela 2. Lista przeciwciał użytych w pracy doktorskiej..... 37

Tabela 3. Oligonukleotydy użyte w niniejszej pracy znajdują się w poniższej tabeli.....	41
Tabela 4. Lista deregulowanych transkryptów zidentyfikowanych przez RNAseq w mózdku 2 miesięcznych myszy Ki91 SCA3/MJD (n = 4).....	54
Tabela 5. Lista deregulowanych transkryptów zidentyfikowanych przez RNAseq w mózdku 2 miesięcznych myszy Ki91 SCA3/MJD (n = 4).....	55
Tabela 6. Zidentyfikowane geny o zmienionych wariantach splicingowych w genach zidentyfikowane z pomocą JunctionSeq w mózdku i korze mózgowej myszy 2 miesięcznych (n = 4).....	58
Tabela 7. Białka deregulowane we frakcjach kompleksów białkowych 282-218 kDa.....	77
Tabela 8. Białka deregulowane we frakcjach kompleksów białkowych 115-89 kDa.....	78
Tabela 9. Odziaływanie białka ATXN3 z podjednostkami proteasomu.....	82

9. Spis rycin

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie białka ATXN3. ATXN3 jest białkiem o długości 376 aminokwasów składającym się z N-końcowej katalitycznej JD i C-końcowej domeny wiążącej ubikwitynę. JD zawiera miejsce katalityczne deubikwitynazy (ang. Deubiquitinase, DUB) w C14, dwa jądrowe sygnały eksportu (ang. nuclear export signals, NES) w pozycjach 77 i 141, jak również dwa miejsca wiązania ubikwityny (Ub). Białko ATXN3 jest modyfikowane potranslacyjnie przez fosforylację w S77 i ubikwitynę w K117. C-końcowa domena wiążąca ubikwitynę zawiera dwa lub trzy motywy oddziałujące z ubikwityną (ang. ubiquitin-interacting motifs, UIMs), sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) w pozycji 273 i odcinek poliglutaminowy o zmiennej długości. Jest najczęściej modyfikowany potranslacyjnie przez fosforylację w S236, S256, S340 i S352.....	18
Rycina 2. Schemat traktowania kultur fibroblastów SCA3 związkami niskocząsteczkowymi.	52
Rycina 3. Lokalizacja genetyczna zmienionych genów (niebieskie słupki) w zależności od tła genetycznego 129sv/FVB wokół transgenicznego <i>locus</i> (czerwony słupek).....	54
Rycina 4. Geny zidentyfikowane przez RNAseq analizowano metodą qPCR przy użyciu dwóch szczepów kontrolnych C57BL/6 (C57) i FVB w celu wykluczenia wpływu tła genetycznego na poziom ekspresji genów. Wyniki zarówno w (A) mózdku oraz (B) korze mózgowej wskazują na istotny wpływ tła genetycznego na poziom ekspresji wykrytych zmian transkryptycznych	

(n = 4, n = 4 na tkankę; tkanka myszy C57BL6 (C57) lub FVB była kontrolą dla tkanek myszy Ki91; test t-Studenta dla prób niezależnych $p < 0,05$, słupki błędów: SEM). 56

Rycina 5. Poziom ekspresji tych samych genów co w przypadku myszy 2 miesięcznych określono w tkanki mózgowej 4-miesięcznych myszy kontrolnych i myszy Ki91. Różnice w poziomach ekspresji genów dla (A) mózdzku (B) kory mózgowej nie osiągnęły spójnej istotności statystycznej w kontrolach i tkankach (n = 4, tkanki myszy C57BL6 (C57) oraz FVB była kontrolą dla tkanek myszy Ki91; test t-Studenta dla prób niezależnych $p < 0,05$, słupki błędów: SEM). 57

Rycina 6. Zmiany splicingowe w mózdzku myszy Ki91 wykryte za pomocą danych RNAseq analizowanych z użyciem narzędzia JunctionSeq wskazują na zmiany głównie w obrębie genów zlokalizowanych na chromosomach 12 i 19, dodatkowo zidentyfikowano zmiany w obrębie Kmt2d (chromosom 15) oraz Bclaf1 (chromosom 10) (n=4). 60

Rycina 7. Zmiany splicingowe w korze mózgowej myszy Ki91 wykryte za pomocą narzędzia JunctionSeq wskazują na zmiany w obrębie genów zlokalizowanych na chromosomach 12 i 19 (n=4). 61

Rycina 8. Zmiany transkrypcyjne występują u 10- i 14-miesięcznych objawowych homozygotycznych myszy Ki91 SCA3/MJD i są związane ze zmianami związanymi z określonymi typami komórek. U 10-miesięcznych myszy Ki91 analiza wykazała podwyższony poziom Psat1 i Olig1 w mózdzku i korze mózgowej (A). Gen Mag związany z oligodendrocytami ujawnił podwyższony poziom w korze mózgowej. Plp1 wykazywał obniżony poziom w korze mózgowej 10-miesięcznych myszy Ki91, co sugeruje utratę dorosłych oligodendrocytów podczas progresji choroby. Czternastomiesięczne myszy Ki91 wykazują bardziej wyraźne zmiany w poziomach mRNA (B). W mózdzku poziom Cd68, markera mikrogleju, wykazywał podwyższony poziom ekspresji. Geny związane z metabolizmem, Apt2b1 i Ca2, są obniżone. Gen o wysokiej ekspresji w dorosłych oligodendrocytach-Plp1 jest również obniżony w mózdzku. W korze mózgowej poziom transkryptów charakterystycznych dla prekursorów oligodendrocytów jest podwyższony (Olig1, Olig2), a z drugiej strony obniżony poziom transkryptów charakterystycznych dla dorosłych oligodendrocytów (Plp1 i Cldn11) oraz podwyższony poziom Mag. Nie wykryliśmy zmian transkrypcyjnych charakterystycznych dla markerów neuronalnych zarówno w mózgach myszy Ki91 w wieku 10, jak i 14 miesięcy. Obserwujemy również zmieniony poziom genów charakterystycznych dla metabolizmu (Psat1, Qdpr), (Test t dla dwóch prób, $p < 0,05$, słupki błędów: SEM, n=4). 63

Rycina 9. Komórki neuronalne zróżnicowane z linii komórek iPSC pochodzących od pacjentów SCA3 wykazały zmiany mRNA podobne do późnych zmian u myszy Ki91 SCA3/MJD. Marker prekursorów oligodendrocytów i neuronów, OLIG1, był podwyższony u jednego pacjenta, a OLIG2 był podwyższony w hodowlach neuronalnych od obu pacjentów. PLP1, który jest wysoce ekspresowany w dojrzałych oligodendrocytach, był obniżony u pacjentów z SCA3. Marker PSAT1 był nieznacznie podwyższony u obu pacjentów. Wartości p (niesparowany test t-Studenta; dwie techniczne powtórzenia hodowli komórkowej na pacjenta) obliczono w celu oceny różnic między pacjentem a grupą kontrolną; jednak kryteria statystyczne zastosowania testu t nie zostały spełnione ze względu na małą liczbę dostępnych pacjentów (pacjenci n= 2; pacjenci bez zmian n = 2) (Test t dla dwóch prób p<0,05, słupki błędów: SEM). 64

Rycina 10. Lokalizacja jądrowa ATXN3 u 2-miesięcznych bezobjawowych myszy Ki91 SCA3/MJD. Skrawki mózgu ujawniły niewielką liczbę komórek z pozytywnym sygnałem ATXN3 (kolor zielony; przeciwciało 1H9) w (A) istocie białej mózdzku i (B) korze mózgowej, gdzie ATXN3 lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym (kolor niebieski; Hoechst 33342) myszy Ki91, podczas gdy w próbkach kontrolnych ATXN3 lokalizuje się równomiernie w całej komórce. Ponadto mikrografia przedstawia lokalizację mikroagregatów (strzałki) w jądrze komórkowym myszy Ki91. (n=3). 65

Rycina 11. Ekspansja CAG podczas generowania mysiego modelu Ki150 SCA3. (A) Liczba powtórzeń CAG najwyższego allelu w miotach. (B) Reprezentatywny przykład ekspansji genetycznej CAG w humanizowanym genie ATXN3 między modelami mysimi Ki91 i Ki150. (B). 66

Rycina 12. Analizy Western Blot lisatów kory mózgowej wykazały ekspresję poliQ-ekspandowanej ATXN3 (Ki150) i nieekspandowanej ATXN3 w wieku 2 miesięcy w homozygotycznym zmutowaniu ATXN3 Ki150 osiąga około 100 kDa. Na próbkach myszy Ki150 zaznaczono genomyczną ilość powtórzeń CAG w allelach zmutowanej ATXN3. 67

Rycina 13. Postępujący spadek motoryki w modelu Ki50 SCA3 knock-in jest szybki i postępujący. W teście prętów statycznych (A, B) „czas obrotu” i „czas przejścia” mierzono na sześciu prętach o malejącej średnicy (średnicę prętów oznaczono jako \varnothing w mm). (A) 1-miesięczne zwierzęta potrzebowały więcej czasu, aby włączyć pręt 6 reprezentujący najwyższy poziom trudności, a wraz z postępem choroby więcej prętów stanowiło wyzwanie dla myszy Ki150; Ostatecznie w wieku 8 miesięcy myszy Ki150 potrzebował więcej czasu na przejście na wszystkich prętach. (B) Podobnie jak w przypadku parametru „czasu na obrót” 1-miesięczne

myszy Ki91 potrzebowały znacznie więcej czasu na przejście na pręcie 6, ale także 1, podczas gdy starsze 8-miesięczne myszy potrzebowały więcej czasu na wszystkich prętach (C) Motor Niekoordynację w przyspieszonym rotarodzie (4–40 obr./min w ciągu 5 min) Ki150 przedstawił już w wieku 1 miesiąca. (D) W teście punktacji 5-miesięczne myszy Ki150 wykazywały fenotyp SCA3: brak koordynacji, zaburzenia chodu, kifoza i zaciskanie kończyn tylnych (E) Zmniejszenie przyrostu masy ciała u Ki150 zaobserwowano w wieku 8 miesięcy; Dwukierunkowy ANOVA z testem post hoc Bonferroniego ($p \leq 0,05$; całkowita liczba powtórzeń biologicznych: $n = 16$, $n = 8$ na genotyp), słupki błędów: SEM. Gwiazdki oznaczają dwukierunkowy test ANOVA (post hoc Bonferroni) dla danego wieku myszy (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). ANOVA z testem post hoc Bonferroniego dla wszystkich testów oprócz masy ciała wynosiła $p < 0.0001$.

..... 68

Rycina 14. Lokalizacja komórkowa ATXN3 w myszach kontrolnych i mysim modelu Ki150. Widoczna jest znaczna ilość inkluzji w (A) mózdku, (B) korze mózgowej i (C) hipokampie. (D) Największa ilość inkluzji na skrawkach mózgowi Ki150 na mm^2 znajduje się w hipokampie. Test t-Studenta dla prób niezależnych (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$), ($n=3$). 70

Rycina 15. Zwiększona immunodetekcja Cd11b w mózdku 8 miesięcznych myszy Ki150 świadcząca o nadmiernej aktywacji mikrogleju. $n=3$ 70

Rycina 16. Zmiany w poziomach markerów translacji na skrawkach mózgowi 8 miesięcznych myszy Ki150. Barwienie immunofluorescencyjne skrawków mózgowi Ki150 z pomocą przeciwciał naczelnowanych na procesie translacji. Barwienie przeciwciałem wykrywającym fosforylowane białko S6 wykazało obserwowalnie wyższy poziom sygnału (kolor zielony, królicze przeciwciało wykrywające fosforylacje (Ser235/236) białka rybosomalnego S6) w mózdku, hipokampie i korze mózgowej (kolor niebieski: Hoechst 33342) (A-C). Białe strzałki wskazują miejsca intensywnej fosforylacji S6. W istocie białej mózdku na skrawkach mózgowi Ki150 mysie przeciwciało wykrywające białko Fxr2 (kolor zielony) wykazuje silniejszy sygnał fluorescencji pewnych komórek (zaznaczone białą strzałką) w bezpośrednim sąsiedztwie agregatów zmutowanej ATXN3 (kolor czerwony, królicze przeciwciało wykrywające ATXN3, (kolor niebieski: Hoechst 33342)) (D). Również w istocie białej mózdku na skrawkach mózgowi Ki150 mysie przeciwciało anty-Fmr1 wykrywa komórki pozytywne na Fmr1 (kolor zielony) również w sąsiedztwie inkluzji ATXN3 (kolor czerwony) zaznaczono białą strzałką, kolor niebieski: Hoechst 33342 (E). Barwienie immunofluorescencyjne białka Pabpc1 wskazuje na silniejszy poziom fluorescencji (kolor zielony) w komórkach Purkiniego na skrawkach mózgowi

myszy Ki150 w porównaniu do myszy kontrolnych. Jądra komórkowe są zabarwione z pomocą Hoechst 33342 (kolor niebieski) (n=3). 72

Rycina 17. Chromatografia size exclusion (SEC) lizatów całego mózgu myszy Ki21 i Ki150. (A) Profil elucji SEC (A280 w mAU). (B) Próżniowy dotblot z barwieniem ponceau frakcji białkowych odpowiadających zakresowi wielkości > 600-22 kDa). Analizę SEC przeprowadzono przez wstrzyknięcie objętości próbki 2,2 ml na kolumnę Superdex 200 16/60 podłączoną do systemu chromatograficznego AKTA. Całkowita liczba powtórzeń biologicznych: n = 6, n = 3 na genotyp..... 74

Rycina 18. ATXN3 jest dystrybuowana w dużych kompleksach białkowych po frakcjonowaniu chromatograficznym. (A) Lizaty całego mózgu po frakcjonowaniu kompleksów białkowych metodą chromatografii wykluczania (SEC) rozdzielono na podstawie wielkości w zakresie (1021-22 kDa) i podzielono na 31 frakcji. Membrany nitrocelulozowe inkubowano z przeciwciałem przeciw ATXN3. Sygnał wskazuje na dystrybucję ATXN3 we frakcjach kompleksów białkowych w próbkach mysich mózgowi Ki21 i Ki150. Na podstawie wyników dot blot możemy wyróżnić 3 piki ze szczególnie wysokim poziomem białka ATXN3. Pierwszy (898-789 kDa), drugi (248-192 kDa) i trzeci (101-78 kDa). (B) W trzecim pikie (101-78 kDa) poziom mutanta Atxn3 w mózgowi Ki150 jest znacznie niższy niż w kontrolnych lizatach mózgowych Ki21. Test t dla dwóch prób (*p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001), słupki błędów: SEM, n=3. 76

Rycina 19. Sieci białek tworzących kompleksy z ATXN3 zidentyfikowane metodą chromatografii jonowymiennej (IEC) i wielkości metodą chromatografii wykluczania (SEC), a następnie LC-MS/MS. Sieci zostały wygenerowane przy użyciu bazy danych String i klastrowania (<https://string-db.org/>). 79

Rycina 20. Analiza proteomiczna białek oddziałujących ze zmutowaną i prawidłową ATXN3 z wykorzystaniem LC-MS/MS ujawnia 3 zestawy białek o znacznie osłabionym oddziaływaniu ze zmutowaną ATXN3 w mózdzku i korze mózgowej Ki150. Sieć białek wykazujących osłabioną interakcję ze ATXN3 w mózdzku (A i B) i korze mózgowej (A, B i C) myszy Ki150 wygenerowano przy użyciu bazy danych String (<https://string-db.org/>). Pierwszy klaster zawierał białka związane z Zaburzenia w prawidłowym procesie i regulacji syntezy acją w mózdzku (A, B) i korze mózgowej (A, B). Zmutowana ATXN3 wykazywała bardzo słabe interakcje z białkami mitochondrialnymi w mózdzku Ki150 (C i D) i korze mózgowej Ki150 (C i D). Trzeci zestaw białek o zmniejszonej interakcji ze zmutowaną ATXN3 (Q150) w korze mózgowej bierze udział w

transporcie mitochondrialnym (E i F). Test t dla dwóch prób ($p \leq 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); słupki błędów: SEM, n=4. 82

Rycina 21. Inhibitory białek proteasomalnych, Bortezomib i Carfilzomib, oraz inhibitor USP14 VLX1570 (kontrolujący deubikwitynazę proteasomalną PSMD14), obniżają toksyczność zmutowanego białka ATXN3. Linie komórkowe ludzkich fibroblastów SCA3 traktowano przez 72 godziny wskazanymi stężeniami inhibitorów i kontrolą DMSO. Efekt VLX1570 był mniej wyraźny). Test t dla dwóch prób ($p \leq 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); słupki błędów: SEM, n=4..... 84