

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 równoległe 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 zaostrozonym 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.