

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

Mgr inż. Karolina Świtońska-Kurkowska

## **STRESZCZENIE**

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

Nadrzędnym celem prowadzonych przeze mnie badań w ramach pracy doktorskiej, była identyfikacja molekularnych i komórkowych zaburzeń rozwoju mózgu w JOHD. Aby zrealizować główny cel mojej pracy, sformułowałam cele szczegółowe. Pierwszym z nich była identyfikacja zaburzonych procesów neurorozwojowych w komórkach JOHD jeszcze przed etapem rozwoju, na poziomie linii komórek macierzystych iPSC. Cel ten realizowałam z udziałem metod wysokoprzepustowych oraz analiz bioinformatycznych. W kolejnym ważnym punkcie mojej pracy, zgromadziłam szereg dostępnych literaturowo danych eksperymentalnych uzyskanych w badaniach wysokoprzepustowych komórek HD i innych chorób polyQ. Wykorzystując te dane, wykonałam liczne analizy *in silico* identyfikujące potencjalne (neuro)rozwojowe procesy

molekularne zaburzone w HD, zarówno na wielu etapach rozwoju jak i w dorosłym mózgu. Wykonane przeze mnie analizy *in silico* miały również na celu identyfikację wspólnego mianownika neurorozwojowych chorób polyQ. Kolejny etap moich badań obejmował wykorzystanie analizowanych wcześniej linii iPSC do wygenerowania fuzyjnych organoidów mózgowych, które odzwierciedlały wczesny etap rozwoju mózgu. Ostatnim celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie czy wybrane zaburzenia zidentyfikowane w fuzyjnych organoidach mózgowych HD można zaobserwować w materiale biologicznym pochodzącym z mysiego modelu HD (Hu<sup>128Q/21Q</sup>).

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

Wyniki późniejszych porównawczych analiz bioinformatycznych, podkreśliły stałe zaburzenie procesów (neuro)rozwojowych w komórkach JOHD, takich jak wieloetapowa morfogeneza zarodka, wzrost i wydłużanie neuronów oraz transmisja synaptyczna. Moje analizy wyodrębniły zmiany w genach zaangażowanych w procesy tworzenia neuronów, synaptogenezę oraz tworzenie macierzy zewnątrzkomórkowej, w modelach mysich niektórych chorób polyQ.

Wskazuje to na neurorozwojowe podobieństwa tej grupy schorzeń (Świtońska-Kurkowska et al., 2021).

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

Podsumowując, wykryte przeze mnie zmiany w danych RNA-seq wskazują na konkretne procesy (neuro)rozwoju obecne już w komórkach niezróżnicowanych. Opracowałam system organoidowy do obserwacji

patogenezy HD. Zidentyfikowałam zmiany molekularne i komórkowe na etapach pluripotencji i rozwoju mózgu HD. Wskazałam na szczególne populacje komórek nerwowych i ich markerów zmienionych w HD oraz zdefiniowałam marker TTR, którego podwyższony poziom zidentyfikowałam zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka. Świadczy to o tym, że może być on markerem występowania i ciężkości HD.