

Głównym celem badań, które prowadzę w ramach pracy doktorskiej jest poznanie przyczyny rozwoju choroby neurodegeneracyjnej, do jakich należy ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3) jest chorobą genetyczną, która występuje u pacjentów ze specjalnym typem mutacji. Mutacja ta polega na zwiększeniu liczby powtórzeń trójki nukleotydów CAG w genie *Ataksyny 3*. U osób zdrowych liczba tych powtórzeń wynosi od 14 do 42, podczas gdy u osób chorych zwiększa się do 50 – 90 i więcej. Pomimo, że znana jest mutacja leżąca u podłoża tej choroby, nadal nie wiadomo dlaczego dochodzi do neurodegeneracji w mózdku i innych regionach mózgu. Dlatego też choroby neurodegeneracyjne takie jak ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 czy Choroba Alzheimera lub Parkinsona pozostają nieuleczalne. SCA3 stanowi jednak łatwiejszy cel badań z uwagi na znaną mutację w pojedynczym genie prowadzącą do powstania choroby.

W swoich badaniach wykorzystuję myszy model SCA3, który został utworzony w Instytucie Chemii Bioorganicznej pod kierownictwem mojego promotora i nazwany został Ki91. Model ten powstał poprzez podmianę części mysiego genu *Ataksyny 3* (egzony 8-11) na kompatybilny fragment *Ataksyny 3* otrzymany z komórek skóry pobranych od pacjenta ze SCA3, zawierający 91 powtórzeń CAG. W celu dokładnego poznania rozwoju SCA3 w modelu Ki91 przeprowadziłam szereg testów behawioralnych. Utworzyłam kohortę myszy złożoną z 18 myszy kontrolnych i 18 myszy Ki91. Początek testów objął zwierzęta 2-miesięczne, a kolejne testy następowały cyklicznie co 2 miesiące, aż do ukończenia 18 miesiąca życia. Testy behawioralne oceniały sprawność motoryczną zwierząt, koordynację ruchową (test prętów statycznych, test prętów równoległych, Rotarod), różnice w chodzie (test śladów), siłę mięśniową, postawę ciała, występowanie przykurczy kończyn (testy punktowe) i kondycję psychiczną (test otwartego pola). Mierzona była także waga ciała. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na wyróżnienie 4 faz choroby: 1. faza pre-symptomatyczna (2 miesiące), w której brak jest objawów motorycznych lub innych, 2. faza charakteryzująca się spowolnieniem przyrostu masy ciała (4-10 miesięcy), 3. wczesna faza symptomatyczna (12-14 miesięcy), w której obserwowana jest zaburzona koordynacja ruchowa 4. Późna faza symptomatyczna (16-18 miesięcy), w której pogorszeniu ulega koordynacja ruchowa, występują zaburzenia chodu, postawy ciała, przykurcze kończyn, lęk i osłabiona siła mięśniowa.

Drugą istotną częścią moich badań jest analiza zmian na poziomie molekularnym, tzn. różnic w ilości białek w 2 regionach mózgu: korze mózgowej i mózdku, za pomocą spektrometrii mas LC-MS/MS (wysokoprzepustowa technika służąca identyfikacji różnych klas związków) i Western blot (klasyczna metoda analizy białek z wykorzystaniem przeciwciał). Głównym celem tego zadania jest wskazanie białek, które mogą przyczyniać się do rozwoju SCA3. Materiał do badań kolekcjonowałam z myszy w wiekach odpowiadających zwierzętom testowanym behawioralnie: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 i 18 miesięcy. Następnie, wykorzystując uzyskane wyniki i różne programy bioinformatyczne, analizowałam jakie procesy komórkowe i molekularne mogą wpływać na rozwój SCA3. Analizowałam także, w jakich typach komórek w mózgu i w jakich obszarach komórkowych są obecne zmienione białka oraz jak zmieniał się poziom białek w czasie. Ustaliłam, że zmiany w poziomie białek dotyczą głównie neuronów i że w największej ilości we wczesnych fazach choroby występują w pęcherzykach transportujących cząsteczki (egzosomy), cytoszkielecie („rusztowanie” komórki) i mitochondriach. W późniejszych fazach zwiększa się ilość białek, występujących w pęcherzykach degradujących białka i obumarłe organella komórkowe (lizosomy), a także w pęcherzykach synaptycznych i synapsach. Ponadto, białka o zmienionym poziomie zaangażowane są w wiele ważnych procesów biologicznych, w tym: produkcja energii komórkowej w mitochondriach, powstawanie i usuwanie białek, formowanie cytoszkieletu, transport wzdłuż aksonu (długa wypustka neuronu), przekazywanie synaptyczne i programowana śmierć komórki. Na podstawie tych wyników opracowałam hipotezę zaburzeń w transporcie organelli komórkowych wzdłuż aksonu, na skutek czego następuje obumieranie aksonów, a później także ciał komórek nerwowych. Obecnie kolekcjonuję aksony w hodowli neuronów *in vitro* otrzymanych z kory i mózdku, z których izolować będę białka do dalszej analizy. Białka, które znajdują się w aksonach w zmienionej ilości wskażą czy w SCA3 występuje zaburzenie transportu aksonalnego i których organelli lub białek dotyczy. Następnym pożądanym etapem badań byłaby wizualizacja transportu w aksonach za pomocą zaawansowanych technik mikroskopowych i hodowli neuronów.