

## **Rola metylacji DNA i udziału alternatywnego splicingu w patogenezie ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 8 (SCA8) – choroby neurodegeneracyjnej spowodowanej ekspansją powtórzeń mikrosatelitarnych.**

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 8 (SCA8) jest rzadką chorobą neurodegeneracyjną, jedną z najczęściej obserwowanych ataksji rdzeniowo-mózdkowych w Polsce, ale wciąż mało poznaną. Genetyczną przyczyną tej choroby jest zwielokrotnienie regionu mikrosatelitarnych powtórzeń CTG zlokalizowanych w genie *ATXN8OS*. Takie ekspansje obejmujące również inne powtórzenia mikrosatelitarne nazywane są mutacjami dynamicznymi i wiadomo, że powodują szereg zaburzeń neurodegeneracyjnych. Gen *ATXN8OS* zawierający taką ekspansję ulega transkrypcji z powstaniem RNA o wydłużonym szlaku CUG. Wiadomo, że zwiększona liczba powtórzeń mikrosatelitarnych w regionach niekodujących prowadzi do mechanizmu nabycia toksycznej funkcji przez RNA. Dzieje się tak dlatego, że w obrębie RNA tworzą się nieprawidłowe struktury obejmujące region ekspansji a białka wiążące się z RNA (często będące czynnikami splicingowymi) są wychwytywane przez te struktury. Takie skupiska RNA i białek obserwujemy w komórkach pacjentów, a to może powodować nasilenie procesów związanych z alternatywnym składaniem genów.

Realizacja tego projektu przyczyni się do poszerzenia badań nad strukturą powtórzeń CTG w genie *ATXN8OS* oraz epigenetycznymi modyfikacjami tego regionu znanymi jako metylacja. Przypuszczamy, że metylacja może mieć wpływ na poziom ekspresji genów *ATXN8OS* i *ATXN8* oraz na dalsze konsekwencje mutacji. Wykorzystując nowatorską, wysokoprzepustową technologię zwaną sekwencjonowaniem nowej generacji z długimi odczytami, planujemy wykazać, że długość i struktura regionu mikrosatelitarnego w genie *ATXN8OS* i *ATXN8* może wpływać na poziom metylacji DNA tego regionu. Ponadto planujemy wykazać, że u pacjentów z SCA8 zaburzony poziom białek biorących udział w alternatywnym składaniu genów, prowadzi do tworzenia nieprawidłowych form białek – podobnie jak w przypadku dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1). W konsekwencji zwiększonego alternatywnego składania genów występowanie innych izoform białek może wpływać na nasilenie i przebieg choroby.

Badania kliniczne będą prowadzone przez doświadczonych klinicystów u 70 pacjentów z ataksją rdzeniowo- mózdkową typu 8 i będą oparte na zwalidowanych skalach neurologicznych. Jako grupa kontrolna do sekwencjonowania RNA zostaną wykorzystane wyniki z GEO (międzynarodowe repozytorium publiczne) danych transkryptomicznych RNAseq od 100 zdrowych osób, aby zminimalizować finansowe nakłady projektu. Sekwencjonowanie DNA i RNA oraz badanie poziomu metylacji zostaną przeprowadzone jako zadania laboratoryjne, a następnie wykonane zostaną obszerne analizy bioinformatyczne i statystyczne.

Planujemy również opracować pierwszy ludzki model SCA8 iPSC wywodzący się z komórek pacjentów z SCA8 i wyhodować neurony w celu przeprowadzenia analiz transkryptomu i białek wiążących się z RNA w modelu tkanki nerwowej. Przeprogramowanie ludzkich komórek somatycznych na indukowane ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste (hiPSC) jest zgodne z ostatnimi nowymi dyrektywami Unii Europejskiej, których celem jest zachęcenie do rozwijania alternatywnych modeli, które zastąpią badania na zwierzętach.

Wyniki projektu mogą mieć potencjalny wpływ na kwestie społeczne i ekonomiczne. Mogą one przynieść nowe możliwości przewidywania przebiegu choroby i wieku zachorowania. Osiągnięcia w dziedzinie chorób rzadkich przyczynią się do realizacji unijnej polityki w zakresie chorób rzadkich oraz polskiego Planu dla chorób rzadkich, których celem jest poprawa dostępu pacjentów do diagnostyki i wiedzy. Tematyka projektu jest zgodna z zainteresowaniami Europejskiej Sieci Referencyjnej ds. Rzadkich Zaburzeń Neurologicznych (ERN-RND), której IPiN jest członkiem. Ponadto członkowie zespołu badawczego są również zaangażowani w działalność Ataxia Global Initiative. Społeczność tych międzynarodowych stowarzyszeń będzie również wdrażać wyniki projektu, ponieważ jest zobowiązana do promowania, udostępniania danych i dostarczania informacji o badaniach naukowych pacjentom i opinii publicznej. Wyniki projektu będą rozpowszechniane na konferencjach krajowych i międzynarodowych, spotkaniach ERN-RND i AGI oraz poprzez artykuły naukowe w czasopismach Open Access. Współpraca ze stowarzyszeniami pacjenckimi oraz prowadzenie lekcji pokazowych w szkołach podczas Światowego Dnia Ataksji uzupełni sposoby upowszechniania wiedzy.

Cele projektu będą realizowane przez zespół naukowych profesjonalistów: kliniczne, molekularne i epidemiologiczne aspekty chorób neurodegeneracyjnych są przedmiotem badań w IPiN od ponad 25 lat. Strategia badawcza polega na zorganizowaniu dwóch współpracujących ze sobą podgrup odpowiedzialnych za 1) badania kliniczne (neurologzy i poradnicy genetyczni) oraz 2) badania molekularne (genetycy molekularni). Ponadto w realizację projektu włączają się studenci medycyny Wydziału Lekarskiego Uczelni Łazarskiego, co ułatwi im start kariery naukowej.