

ROZPRAWA DOKTORSKA

Molekularna oraz behawioralna charakterystyka nowych
mysich modeli ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3 (SCA3)

Paweł Michał Świtoński

Praca wykonana pod opieką promotora

Prof. dr. hab. Włodzimierza J. Krzyżosiaka

oraz promotora pomocniczego

Dr. Macieja Figla

Zakład Biomedycyny Molekularnej

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań 2014

*Dziękuję Panu Profesorowi Włodzimierzowi Krzyżosiakowi
za przekazaną wiedzę, ukierunkowanie zainteresowań
naukowych, cenne dyskusje w trakcie prowadzenia badań
oraz uwagi w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy.*

*Dziękuję Doktorowi Maciejowi Figłowi za opiekę naukową,
pomoc
i motywację do pracy.*

*Serdecznie dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu za
wsparcie i życzliwą atmosferę w pracy.*

Dorocie dziękuję za wyrozumiałość i nieustające wsparcie.

Spis treści

Streszczenie.....	4
Summary	6
1. Wykaz artykułów zawartych w rozprawie doktorskiej	8
2. Wprowadzenie	9
2.1 Mysz jako organizm modelowy	9
2.2 Ataksja rdzeniowo mózdkowa typu 3	10
2.3 Mysie modele SCA3.....	11
3. Cel pracy.....	14
4. Streszczenie prac i ich interpretacja na tle piśmiennictwa przedmiotu	15
Mouse ataxin-3 functional knock-out model	16
A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD	19
Mouse models of polyglutamine diseases: review and data table. Part I	22
Mouse models of polyglutamine diseases in therapeutic approaches: review and data table. Part II	22
5. Podsumowanie i perspektywy	26
6. Bibliografia.....	27
7. Oświadczenia współautorów o ich wkładzie w publikację	31

Streszczenie

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3) jest dziedzicznym neurodegeneracyjnym schorzeniem powodowanym ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń CAG znajdujących się w części kodującej genu *ATXN3*. Pacjenci chorujący na SCA3 posiadają zwykle 60-82 powtórzeń CAG, podczas gdy u osób zdrowych liczba powtórzeń nie przekracza 41. W obrazie klinicznym występuje ataksja mózdkowa, a także niedowład kończyn, spastyczność mięśni, ruchy dystoniczne i mimowolne skurcze mięśni. SCA3 należy do grupy chorób, w których ekspansja powtórzeń CAG w różnych, niepowiązanych ze sobą genach także prowadzi do akumulacji białek poliglutaminowych i rozwoju procesów neurodegeneracyjnych. Do schorzeń tych zalicza się chorobę Huntingtona, rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA), zanik jądra zębatego, czerwienno, gałki bladej i jądra Luysa (DRPLA) oraz pięć innych ataksji rdzeniowo-mózdkowych (SCA1, 2, 6, 7 i 17). Choroby te są obecnie nieuleczalne.

Czynnikiem inicjującym kaskadę molekularną prowadzącą do dysfunkcji i obumierania komórek nerwowych jest obecność zmutowanego białka z wydłużoną domeną poliglutaminową oraz ekspresja zmutowanego transkryptu z wydłużonymi powtórzeniami CAG tworzącymi stabilną strukturę typu spinka do włosów. Do poznanych patomechanizmów SCA3 i innych chorób neurozwyrodnieniowych należą zaburzenia bioenergetyczne, obecność inkluzji i wtrąceń białkowych, zaburzenia transkrypcyjne, czy rozregulowanie procesów odpowiedzialnych za „recykling” składników komórkowych (autofagia i system ubikwityna-proteasom).

Mysie modele chorób poliglutaminowych są niezwykle przydatne w badaniach związanych z poznawaniem patomechanizmów prowadzących do śmierci neuronów, jak i w poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych dla tych schorzeń. Większość genetycznych mysich modeli SCA3 wykazuje ekspresję zmutowanego cDNA ludzkiej ataksyny-3 lub jego fragmentu, przy czym ekspresja kontrolowana jest przez egzogenny promotor, najczęściej promotor białka prionowego lub promotor specyficzny dla neuronów Purkiniego kory mózdku. Modelem, który najdokładniej odzwierciedlałby podłoże genetyczne SCA3 byłaby mysz posiadająca mutację wprowadzoną do locus *Atxn3*, w której ekspresja jednej kopii zmutowanego genu podlegałaby kontroli endogennego promotora i naturalnych elementów regulatorowych.

Pierwsza próba stworzenia mysiego modelu SCA3 typu knock-in wykazującego ekspresję zmutowanej ataksyny-3 zakładała wprowadzenie ludzkiego cDNA ataksyny-3 wraz z 69 powtórzeniami CAG w miejsce mysich egzonów 2 i 3 w genie *Atxn3*. Pomimo prawidłowej integracji transgenu z mysim genomem, powstały w ten sposób zmodyfikowany allel nabrał właściwości knock-out, w efekcie czego homozygotyczne zwierzęta nie wykazywały ekspresji zarówno normalnej jak i zmutowanej ataksyny-3. Analiza RNA przeprowadzona w celu wyjaśnienia tego zjawiska pokazała, że powodem braku ekspresji produktu białkowego są zaburzenia splicingowe zachodzące podczas dojrzewania pre-mRNA transgenu. Mimo, że myszy knock-out ataksyny-3 nie prezentują zakładanego fenotypu

chorobowego, są one obecnie wykorzystywane w badaniach nad naturalną funkcją ataksyny-3.

Nowa strategia transgenezy zaprojektowana w celu stworzenia funkcjonalnego modelu knock-in SCA3 zakładała usunięcie ostatnich 14 tysięcy par zasad mysiego genu *Atn3*, z jednoczesnym zastąpieniem ich sekwencją kodującą ludzkie egzony od 7 do 11 wraz z 91 powtórzeniami CAG w egzonie 10. Powstałe myszy Ki91 wykazują ekspresję zmutowanej ataksyny-3 i prezentują szereg molekularnych, histopatologicznych i behawioralnych fenotypów odzwierciedlających objawy SCA3. Pomiary liczby powtórzeń CAG w transgenicznym zwierzętach wykazały, że ciąg powtórzeń przejawia niestabilność zarówno w transmisji międzypokoleniowej jak i somatycznej. Ataksyna-3 ulega u myszy Ki91 akumulacji w jądrach komórkowych komórek mózgu. Obserwowane jest również wytrącanie się zmutowanej ataksyny-3 w formie wewnątrzjądrowych inkluzji. U myszy Ki91 występują także wcześniej pojawiające się zaburzenia transkrypcyjne odzwierciedlone podwyższoną ekspresją genu *Serpina3n*. Dodatkowo analiza immunohistochemiczna pozwoliła zaobserwować zmiany neurozwyrodnieniowe przejawiające się degeneracją komórek Purkiniego w korze mózdzku oraz aktywacją astrocytów w mózdzku i istocie czarnej. Myszy Ki91 wykazują również późno pojawiające się zaburzenia w koordynacji ruchowej zaobserwowane na teście rotarod oraz w teście prętu statycznego. Model Ki91 wiernie odzwierciedla podłoże genetyczne oraz proces chorobowy obserwowany u pacjentów SCA3 i będzie przydatny w badaniach nad patogenezą i terapią chorób poliglutaminowych.

W celu lepszego zrozumienia i porównania wspólnych patomechanizmów odpowiedzialnych za degenerację i obumieranie neuronów w chorobach poliglutaminowych, dane na temat mysich modeli tych schorzeń zostały zebrane i przedstawione w formie prac przeglądowych i dołączonych do nich elektronicznych tabel. Zawarty jest w nich obszerny opis fenotypów prezentowanych przez zwierzęta, w tym informacje o ich nasileniu, czasie trwania i lokalizacji oraz efektywności stosowanych podejść terapeutycznych. Szczegółowy opis mysich modeli, wraz z informacją jak dobrze każdy z nich odzwierciedla daną jednostkę chorobową oraz możliwość porównania fenotypów w różnych modelach, mogą być przydatne w badaniach związanych z poznawaniem nowych patomechanizmów chorób neurodegeneracyjnych oraz poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych.

Summary

Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) is a dominantly inherited neurodegenerative disorder caused by the expansion of the CAG triplet repeats in the coding region of the *ATXN3* gene. Patients suffering from SCA3 carry an *ATXN3* allele with 60–82 CAG repeats, whereas healthy individuals present a non-pathogenic number of repeats, usually between 13 and 41 CAGs. The neurological symptoms that become evident in the third or fourth decade of life include ataxia, dystonia, muscle weakness, spasticity and ocular symptoms. SCA3 belongs to the group of polyglutamine diseases caused by the expansion of CAG repeats in the coding sequence of the respective genes. The polyglutamine disease family comprises Huntington's disease (HD), spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) and six spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6, 7 and 17. They share many similarities, including a common mutation type, selective neuronal vulnerability and misfolding and aggregation of polyglutamine protein. All polyglutamine diseases are currently incurable.

Pathogenesis of SCA3 is based on the toxic function of the mutant ataxin-3 protein that contains polyglutamine domain, as well as on the toxic properties of the mutant *ATXN3* transcript that carries a stable hairpin structure composed of CAG repeats. Although the exact mechanism of the disease remains elusive, several of its aspects, including proteotoxic stress, dysfunction of the protein elimination pathways, transcriptional deregulation and mitochondrial dysfunction have been thoroughly studied.

Mouse models of polyglutamine diseases have proved to be very useful in studying many aspects of neurodegenerative pathomechanisms and finding new targets for experimental therapies. Several mouse models that reproduce many features of SCA3 pathogenesis have been generated, but the majority of them express cDNA of human ataxin-3 driven by unrelated promoters, such as Purkinje cell-specific promoter, prion protein promoter and CMV promoter. This strategy leads to the unnatural expression pattern, both in tissues and during development. The truly valid SCA3 mouse model would have to carry the CAG mutation in the mouse *Atxn3* locus, thus the presence of endogenous promoter and regulatory flanking sequences and the lack of an excessive number of transgene copies would provide a natural expression pattern of mutant ataxin-3. Targeted modification of the *Atxn3* locus using knock-in strategy seems to be the method of choice.

In our first attempt to create mouse model that would be the closest genetic approximation of SCA3 we decided to introduce cDNA of human *ATXN3* gene carrying 69 CAG repeats into the mouse *Atxn3* locus, replacing mouse exons 2 and 3. Although the transgene was inserted correctly, the resulting allele acquired the knock-out properties and homozygous mice did not express both mutant and normal ataxin-3 protein. Analyses of RNA expression revealed that the entire locus consisting of human and mouse exons was expressed and alternatively spliced. Although transgenic mice do not demonstrate SCA3-like phenotypes, they are viable and fertile and are currently used to study natural functions of ataxin-3 protein.

Next, we modified transgenic strategy and decided to exchange the less homologous 14 kb of the *Atxn3* genomic sequence containing exons 7 through 11, with human cDNA equivalent carrying 91 CAG repeats. Resulting heterozygous Ki91 mice expressed mutant ataxin-3 and displayed molecular, histological and behavioral phenotypes reflecting disease course observed in SCA3 patients. We observed both intergenerational and somatic instability of CAG repeats in the humanized allele. Mutant ataxin-3 showed nuclear accumulation in cell nuclei across the Ki91 brain and formed intranuclear inclusions. Ki91 animals showed transcriptional deregulation reflected in the early transcriptional induction of *Serpina3n* expression, a molecular sign of neurodegeneration and brain damage. Moreover, Ki91 mice showed astrogliosis in the cerebellar white matter and the substantia nigra that paralleled the cerebellar Purkinje cells neurodegeneration and a pronounced decrease in Calbindin D-28 k immunoreactivity. Molecular and cellular neuropathologies were accompanied by late behavioral deficits in motor coordination observed in rotarod and static rod. The Ki91 model will be very useful for studying the pathogenesis and responses to therapy of SCA3 and other polyglutamine disorders.

To better understand and compare the common themes of polyglutamine-induced neurodegeneration we gathered the most current knowledge about mouse models of polyglutamine diseases and presented it on the form of review publications and sortable data tables. They cover the behavioral, molecular, cellular, and anatomic characteristics of mouse models and therapeutic strategies employed in the treatment of polyglutamine disorders. Reviews provide precise characterization of polyglutamine disease models and allow for the exchange of data from various disease models, therefore may be helpful in discovering new disease mechanisms and effective therapeutic strategies.

1. Wykaz artykułów zawartych w rozprawie doktorskiej

1. Mouse ataxin-3 functional knock-out model

Switonski PM, Fiszer A, Kazmierska K, Kurpisz M, Krzyzosiak WJ, Figiel M.

Neuromolecular Med. 2011 Mar;13(1):54-65. doi: 10.1007/s12017-010-8137-3. Epub 2010 Oct 14

2. 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

Switonski PM, Szlachcic WJ, Krzyzosiak WJ, Figiel M.

Neurobiol Dis. 2014 Oct 6. pii: S0969-9961(14)00293-9. doi: 10.1016/j.nbd.2014.09.020.

3. Mouse models of polyglutamine diseases: review and data table. Part I

Figiel M, Szlachcic WJ, Switonski PM, Gabka A, Krzyzosiak WJ.

MolNeurobiol. 2012 Oct;46(2):393-429. doi: 10.1007/s12035-012-8315-4. Epub 2012 Sep 7. Review.

4. Mouse models of polyglutamine diseases in therapeutic approaches: review and data table. Part II

Switonski PM, Szlachcic WJ, Gabka A, Krzyzosiak WJ, Figiel M.

MolNeurobiol. 2012 Oct;46(2):430-66. doi: 10.1007/s12035-012-8316-3. Epub 2012 Sep 4. Review.

Artykuły nie wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

5. An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases

Fiszer A, Olejniczak M, Switonski PM, Wroblewska JP, Wisniewska-Kruk J, Mykowska A, Krzyzosiak WJ.

BMC Mol Biol. 2012 Mar 7;13:6. doi: 10.1186/1471-2199-13-6.

6. Mouse Models of SCA3 and Other Polyglutamine Repeat Ataxias

Maciej Figiel, Włodzimierz J. Krzyzosiak, Paweł M. Switonski and Wojciech J. Szlachcic.

Movement Disorders, 2014, Academic Press; 2 edition, ISBN-13: 978-0124051959

2. Wprowadzenie

2.1 Mysz jako organizm modelowy

Historia wykorzystania myszy w badaniach biomedycznych rozpoczęła się ponad sto lat temu, kiedy w 1902 roku francuski biolog Lucien Cuénot używając myszy potwierdził, iż ponownie odkryte przez botaników prawa Mendla mają zastosowanie również w mechanizmach dziedziczności zwierząt¹. W tamtych czasach myszy pochodziły głównie z hodowli amatorskiej i stanowiły jedynie niewielki udział wśród zwierząt używanych w badaniach naukowych. Pionierem wykorzystania myszy jako organizmów modelowych był C.C. Little, który dostrzegł potrzebę „ustandaryzowania” myszy, aby możliwym było otrzymywanie powtarzalnych rezultatów i prawidłowa interpretacja wyników w dziedzinie którą się zajmował – badaniach nad zgodnością tkankową. Aby otrzymać homogenne tło genetyczne, Little rozpoczął hodowle spokrewnionych ze sobą osobników uzyskując liczne szczepy wsobne, między innymi DBA i C57BL, które do dziś są intensywnie wykorzystywane w badaniach naukowych. Prace Little, Petera Gorera i Georga Snella doprowadziły w efekcie do odkrycia głównego kompleksu zgodności tkankowej i położyły podwaliny pod współczesną immunologię²⁻⁴. Sam C.C. Little połączył swoją fascynację nauką z naturą przedsiębiorcy zakładając w 1929 roku Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory, znane dziś jako Jackson Laboratory. Wykorzystując tam uzyskane przez siebie szczepy wsobne myszy prowadził prace związane z nowotworami i immunologią, a także dostarczał myszy laboratoryjne do badań prowadzonych na całym świecie. Federalne programy rządu Stanów Zjednoczonych w latach 50 i 60 XX wieku, zorientowane na stworzenie modelu zwierzęcego odpowiedniego do badań nad chorobami zakaźnymi i nowotworami, doprowadziły do skokowego zapotrzebowania na myszy, które posiadały niewielkie rozmiary, były tanie w hodowli i wykazywały szybki cykl reprodukcyjny⁵.

Zainteresowanie myszami w środowisku naukowym nie słabło aż do lat 80 XX wieku, kiedy to seria rewolucyjnych doniesień otworzyła zupełnie nowy rozdział w badaniach biomedycznych, czyniąc z myszy laboratoryjnej najpopularniejsze zwierzę wykorzystywane obecnie w nauce⁶. W 1980 roku laboratorium Franka Ruddle z uniwersytetu Yale opublikowało pracę w której do mysiej zygoty wstrzyknięto fragment obcego DNA, uzyskując w efekcie zdrowe zwierzę o zmodyfikowanym genomie⁷. Powstała transgeniczna mysz. Prace związane z wykorzystaniem technologii rekombinacji homologicznej w zarodkowych komórkach macierzystych prowadzone przez Olivera Smithiesia, Martina Evansa i Mario Capecchi umożliwiły uzyskanie myszy ze zmianą genetyczną wprowadzoną do konkretnego locus⁸⁻¹⁰. Poszczególne geny mogły być mutowane, usuwane bądź wprowadzane *de novo*. Myszy knock-out i knock-in zaczęły być wykorzystywane do szczegółowych badań związanych z ludzką biologią i patofizjologią, w tym do poznawania funkcji genów, modelowania ludzkich chorób i badań przedklinicznych¹¹. W 2002 roku opublikowana została sekwencja genomu myszy laboratoryjnej szczepu C57BL. Był to drugi po ludzkim genom ssaczy, którego sekwencja została poznana¹². Analiza porównawcza wykazała, że 80% ludzkich genów posiada swój bezpośredni mysi ortolog¹³. Najnowszym

rozdziałem w badaniach nad myszami jest The Knockout Mouse Project – przedsięwzięcie koordynowane przez amerykański NIH zakładające stworzenie publicznego repozytorium mysich komórek zarodkowych będących knock-outami wszystkich znanych mysich genów. Dziś badania z wykorzystaniem myszy laboratoryjnych stanowią blisko 60% wszystkich badań naukowych prowadzonych z użyciem zwierząt, a Jackson Laboratory sprzedaje obecnie 3 miliony myszy rocznie do blisko 20 000 ośrodków naukowych na całym świecie.

Pomimo ogromnej popularności myszy w badaniach biomedycznych nie bez znaczenia jest fakt, że mysz i człowieka dzieli 90 milionów lat niezależnej ewolucji. Obecność anatomicznych, fizjologicznych, genetycznych i rozwojowych różnic między tymi dwoma gatunkami należy mieć na uwadze wykorzystując myszy do badań nad aspektami biologii i patofizjologii człowieka^{14–17}.

2.2 Ataksja rdzeniowo mózdkowa typu 3

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3), zwana także chorobą Machado-Josepha, jest dziedzicznym schorzeniem neurodegeneracyjnym, którego objawy pojawiają się zwykle w czwartej i późniejszych dekadach życia. Jest to najczęściej występująca dziedziczna forma ataksji rdzeniowo-mózdkowej zarówno w Europie jak i USA. W obrazie klinicznym dominuje ataksja mózdkowa – utrata koordynacji ruchowej manifestowana nieprawidłowym chodem oraz szereg objawów piramidowych oraz pozapiramidowych – niedowład kończyn, spastyczność mięśni, ruchy dystoniczne i mimowolne skurcze mięśni. Objawy kliniczne są bezpośrednim następstwem zmian neurodegeneracyjnych zachodzących w obrębie określonych struktur układu nerwowego. W przebiegu SCA3 obserwowana jest dysfunkcja oraz degeneracja komórek nerwowych w obrębie mózdku oraz dróg rdzeniowo-mózdkowych, a także grupie jąder podkorowych, jądrach mostu oraz jądrach śródmózgowia – jądra czerwiennej i istoty czarnej. SCA3 jest obecnie chorobą nieuleczalną¹⁸.

Już w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku podczas pierwszych prób usystematyzowania opisu klinicznego SCA3 zwrócono uwagę na autosomalny dominujący sposób dziedziczenia tej choroby. Wiele zespołów podjęło próbę zmapowania locus SCA3, które udało się ostatecznie zlokalizować z dokładnością 3 cM na dłuższym ramieniu chromosomu 14¹⁹. W 1994 roku Kawaguchi i wsp. wykazali, że przyczyną SCA3 jest mutacja dynamiczna w locus *MJD1* (dziś znanego pod nazwą *ATXN3*), która prowadzi do powstania w jego obrębie nadmiernie wydłużonego ciągu trójnukleotydowych powtórzeń CAG²⁰. Ekspansja powtórzeń skutkująca powstaniem pięćdziesięciu lub większej liczby jednostek CAG jest już zwykle wystarczająca do wywołania objawów chorobowych, przy czym obserwuje się negatywną korelację między wiekiem pojawiania się objawów a długością ciągu powtórzeń CAG. U pacjentów z większą liczbą powtórzeń choroba rozwija się wcześniej i jest zazwyczaj ostrzejsza w swoim przebiegu.

Znalezienie odpowiedzi na pytanie w jaki sposób nadmiernie wydłużony ciąg krótkiego trójnukleotydowego motywu prowadzi do rozwoju choroby zajęło licznym zespołom badawczym wiele lat, a niektóre aspekty tego problemu do dziś pozostają niewyjaśnione. Wydłużony ciąg powtórzeń CAG znajduje się w części ulegającej translacji genu *ATXN3*, kodującego niewielkie białko zwane ataksyną-3. Ekspresja zmutowanego genu *ATXN3* prowadzi zatem do powstania transkryptu z nadmiernie wydłużonym ciągiem CAG,

który z kolei ulega translacji do produktu białkowego zawierającego w swojej sekwencji ciąg złożony z powtarzających się reszt glutaminowych. Wydłużony ciąg poliglutaminowy wykazuje tendencję do agregacji i w postaci rozpuszczalnych oligomerów zmutowanego białka zaburza fizjologiczne funkcje wielu procesów komórkowych²¹. Zmutowana ataksyna-3 przechodząc do jądra komórkowego zakłóca poprawne działanie czynników transkrypcyjnych oraz czynników białkowych modulujących stan chromatyny, powodując rozregulowanie ekspresji genów. Zmiany te niosą ze sobą dalsze konsekwencje w postaci zaburzeń licznych procesów kluczowych dla sprawnego funkcjonowania neuronów, takich jak kontrola jakości białek, procesy energetyczne zachodzące w mitochondriach, kontrola apoptozy czy neurotransmisja^{22,23}. Dalsza agregacja ciągów poliglutaminowych prowadzi do wytrącenia się zmutowanej ataksyny-3 w postaci nierozpuszczalnych cytoplazmatycznych i jądrowych inkluzji. Inkluzje te sekwestrują inne czynniki białkowe, takie jak białka wiążące ubikwitynę, chaperony oraz czynniki autofagocytozy, powodując ich niedobór w kluczowych procesach metabolicznych^{24,25}. Obok zmutowanego poliglutaminowego białka, także zmutowany transkrypt zdaje się uczestniczyć w patogenezie SCA3. Znajdujący się w mRNA ataksyny-3 wydłużony ciąg powtórzeń CAG tworzy stabilną strukturę typu spinka do włosów. Struktury te sekwestrują znajdujące się w jądrze czynniki splicingowe i tym samym zaburzają poprawne składanie dojrzałych transkryptów licznych genów oraz stymulują apoptozę poprzez indukowanie stresu jądrowego^{26,27}.

SCA3 należy do grupy genetycznych chorób neurodegeneracyjnych powodowanych tym samym rodzajem mutacji. W chorobach tych ekspansja powtórzeń CAG w różnych, niepowiązanych ze sobą genach także prowadzi do akumulacji białek poliglutaminowych i rozwoju objawów chorobowych. Do schorzeń tych zalicza się chorobę Huntingtona, rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA), zanik jądra zębatego, czerwienno, galki bladej i jądra Luysa (DRPLA) oraz pięć innych ataksji rdzeniowo-mózdkowych (SCA1, 2, 6, 7 i 17).

2.3 Mysie modele SCA3

Zwierzęce modele wykazujące ekspresję zmutowanej ataksyny-3 lub jej fragmentów zostały stworzone aby poznawać fizjologiczne funkcje tego białka oraz badać mechanizmy prowadzące do rozwoju SCA3. Transgeniczne nicienie *C. elegans* oraz muszki *Drosophila* przyczyniły się do poznania patomechanizmów związanych z agregacją zmutowanej ataksyny-3, toksycznością ciągu poliglutaminowego oraz funkcją normalnej ataksyny-3²⁸⁻³⁰. Bezkręgowce te ze względu na możliwość stosunkowo prostej manipulacji genetycznej i łatwość hodowli są nieocenionym narzędziem w przesiewowym poszukiwaniu genetycznych modyfikatorów neurotoksyczności i związków terapeutycznych SCA3³¹. Jednak to myszy, które łączy z ludźmi nieporównywalnie większe podobieństwo molekularne, genetyczne i anatomiczne przodują w badaniach nad patogenezą i terapią SCA3.

Wszystkie oprócz jednego ze stworzonych dotąd genetycznych mysich modeli SCA3 wykazują ekspresję zmutowanego cDNA ludzkiej ataksyny-3 lub jego fragmentu, przy czym ekspresja kontrolowana jest przez egzogeny promotor, najczęściej promotor białka prionowego lub promotor specyficzny dla neuronów Purkiniego kory mózdzku (Tabela 1). Wyjątek stanowi model MJD84.2, w którym cały ludzki gen wraz z sekwencjami

otaczającymi oraz endogennym promotorem został zintegrowany z genomem myszy w postaci sztucznego chromosomu drożdżowego³². Mysie modele kolektywnie prezentują wiele cech SCA3 i przyczyniły się do zrozumienia wielu molekularnych i fenotypowych aspektów tego schorzenia. Hipoteza generowania toksycznych fragmentów z pełnej długości ataksyny-3 przez endoproteazy została zaproponowana przez Ikedę i współpracowników, którzy zaobserwowali, że ekspresja pełnej długości zmutowanej ataksyny-3 w neuronach Purkiniego w mózdzku nie powodowała patologicznych zmian, podczas gdy ekspresja skróconego fragmentu ataksyny-3 z wydłużonym ciągiem poliglutaminowym skutkowałą rozwojem zmian neuropatologicznych³³. Modele stworzone przez zespół Colomer Gould oraz przez zespół Riess'a pomogły w określeniu miejsc cięcia i oznaczeniu proteaz odpowiedzialnych za to zjawisko³⁴⁻³⁶. Ten sam model Riess'a wykazujący ekspresję zmutowanej ataksyny-3 z ciągiem 148 reszt glutaminowych wraz z podłączonym sygnałem eksportu lub importu jądrowego pomógł we wskazaniu jądra komórkowego jako miejsca patogenezy SCA3³⁷. Myszy opisane przez Chou i współpracowników wykazujące ekspresję ataksyny-3 z 79 resztami glutaminowymi zobrazowały istotę zmian transkrypcyjnych i ich kluczową rolę w rozwoju, a także leczeniu SCA3²². Mysi model opisany przez Huebener i współpracowników posiadający ekspresję fragmentu ataksyny-3 pozbawionej ciągu poliglutaminowego umożliwił studiowanie roli N-końcowej części ataksyny-3 w patogenezie SCA3³⁸. Jedyne jak dotąd opublikowane modele posiadające zbliżony do naturalnego wzór ekspresji zmutowanego białka z 84 resztami glutaminowymi został stworzony na bazie wektora YAC zawierającego pełnej długości gen *ATXN3* wraz z ludzkim promotorem i sekwencjami otaczającymi³². Model ten przyczynił się m.in. do prześledzenia roli zmian metabolicznych w patogenezie SCA3 oraz do wskazania zmutowanej ataksyny-3 jako czynnika zaburzającego wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazywania sygnału^{39,40}.

Tabela 1. Mysie modele SCA3

Nazwa modelu	Promotor	Obserwowane fenotypy	Lit.
148.19 CAG	Prnp (promotor białka prionowego)	Nieprawidłowy chód, nieprawidłowa postawa, zaburzenia eksploracyjne, drżenia, skrócona przeżywalność, problemy z płodnością.	37
148.NES	Prnp	Nieprawidłowy chód, normalna przeżywalność	37
148.NLS	Prnp	Nieprawidłowy chód, nieprawidłowa postawa, zaburzenia eksploracyjne, drżenia, degeneracja neuronów mózdzku, skrócona przeżywalność.	37
70.61 CAG	Prnp	Zaburzenia w teście rotarod, ataksja, nieprawidłowa postawa, nieprawidłowy chód, zaburzenia eksploracyjne, drżenia, degeneracja neuronów mózdzku, skrócona przeżywalność, utrata masy ciała.	37
ataxin-3-Q79	Prnp	Zaburzenia w teście rotarod, ataksja, nieprawidłowa postawa, nieprawidłowy chód, zaburzenia	22

Nazwa modelu	Promotor	Obserwowane fenotypy	Lit.
		eksploracyjne, degeneracja neuronów mózdzku, zaburzenia transkrypcyjne, skrócona przeżywalność, utrata masy ciała.	
CMVMJD94	CMV	Zaburzenia w teście rotarod, degeneracja neuronów we wzgórzu, mózdzku i moście, reaktywna glejoza.	41
deltaQ71b	Prnp	Zaburzenia w teście rotarod, ataksja, drżenia, nieprawidłowa postawa, skrócona przeżywalność, problemy z płodnością, utrata masy ciała.	34
HDPromMJD148	Htt (promotor szczyrzej huntingtyny)	Zaburzenia w teście rotarod, zaburzenia eksploracyjne, degeneracja neuronów mózdzku, zaburzenia uczenia się, spadek poziomu lęku.	42
MJD79	Pcp2 (Promotor Purkinje cell protein 2)	Brak obserwowalnych fenotypów.	33
MJD84.2	ATXN3 (promotor ludzkiej ataksyny-3)	Zaburzenia koordynacji ruchowej, nieprawidłowy chód, drżenia, obniżona siła uścisku, zaburzenia eksploracyjne, nieprawidłowa postawa, degeneracja i utrata neuronów w mózdzku i moście, utrata masy ciała.	32
polyQ69 (b line)	Pcp2	Zaburzenia w teście rotarod, nieprawidłowy chód, degeneracja komórek Purkiniego, zaburzenia uczenia się.	43
PrP/MJD77	Prnp	Zaburzenia w teście rotarod, nieprawidłowy chód, zaburzenia eksploracyjne, ruchy dystoniczne, degeneracja neuronów w mózdzku, zaburzenia uczenia się, spadek poziomu lęku, utrata masy ciała.	44
Q71-B	Prnp	Zaburzenia koordynacji ruchowej, nieprawidłowy chód, drżenia, drgawki, obniżona siła uścisku, zaburzenia eksploracyjne, nieprawidłowa postawa, utrata masy ciała, problemy z płodnością.	36
Q79C	Pcp2	Ataksja, nieprawidłowy chód, nieprawidłowa postawa, zaburzenia eksploracyjne, degeneracja neuronów w mózdzku.	33

Mimo szybkiego postępu w tworzeniu nowych modeli SCA3 i wyjaśnianiu kolejnych aspektów patogenezy z ich wykorzystaniem, jak dotąd nie został opublikowany model knock-in SCA3 posiadający zmodyfikowany mysz gen *Atxn3*. W modelu takim ekspresja zmutowanego białka zachodziłaby z jednej kopii genu w zdefiniowanym, endogennym locus,

tym samym znajdując się pod kontrolą naturalnych elementów regulatorowych. Ponieważ patogeneza SCA3 jest wypadkową wielu czynników m.in. długości ciągu poliglutaminowego, siły i lokalizacji ekspresji zmutowanego białka, a także czasu oddziaływania zmutowanej ataksyny-3 na neurony, model typu knock-in dzięki odpowiedniemu podłożu genetycznemu ma szansę przyczynić się do lepszego zrozumienia patomechanizmów SCA3.

3. Cel pracy

Celem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej było stworzenie modelu knock-in SCA3 oraz scharakteryzowanie go zarówno pod kątem fenotypu molekularnego, jak i pod kątem przewidywanych zaburzeń neuropatologicznych i motorycznych. Analizy te stanowiąc będą podstawę do dalszych badań nad patogenezą i potencjalną terapią SCA3 i innych chorób neurodegeneracyjnych człowieka, a także do poznawania fizjologicznych procesów komórkowych w których zaangażowana jest ataksyna-3.

4. Streszczenie prac i ich interpretacja na tle piśmiennictwa przedmiotu

Choroby neurodegeneracyjne stają się coraz większym problemem w rozwijających się i rozwiniętych społeczeństwach. Jak podaje Harvard NeuroDiscovery Center, obecnie 5 milionów amerykańców cierpi na chorobę Alzheimera (AD), 1 milion na chorobę Parkinsona (PD), 400 tysięcy na stwardnienie rozsiane i po 30 tysięcy na stwardnienie zanikowe boczne (ALS) i chorobę Huntingtona⁴⁵. W Polsce szacuje się, że choroba Alzheimera dotyka 250 tysięcy ludzi, z chorobą Parkinsona zmagają się 60 tysięcy pacjentów, u blisko 40 tysięcy zdiagnozowano stwardnienie rozsiane, a chorobę Huntingtona u 3 tysięcy osób. Ponieważ schorzenia te zazwyczaj ujawniają się na późniejszych etapach życia, liczba osób cierpiących na choroby neurodegeneracyjne będzie w starzejących się społeczeństwach niewątpliwie wzrastać. Dużym wyzwaniem jest zatem poznanie mechanizmów prowadzących do postępującej śmierci neuronów, a także znalezienie nowych metod skutecznego leczenia chorób neurodegeneracyjnych.

Choroby poliglutaminowe, a wśród nich SCA3, stanowią szczególny przypadek schorzeń neurodegeneracyjnych, w których etiologia jest jednoznacznie zdefiniowana. W przeciwieństwie do choroby Alzheimera czy Parkinsona, choroby poliglutaminowe są chorobami monogenowymi, w których mutacja w części kodującej genu prowadzi do powstawania zmutowanych transkryptów i białek negatywnie wpływających na prawidłowe funkcjonowanie komórki. Konsekwencją monogenowego charakteru chorób poliglutaminowych jest możliwość ich stosunkowo wiarygodnego odzwierciedlenia z wykorzystaniem genetycznych modeli mysich. Kilka różnego rodzaju myszy transgenicznym modelujących SCA3 zostało wygenerowanych na przestrzeni ostatnich dziesięciu lat. Wszystkie modele stworzono z wykorzystaniem genu ludzkiej ataksyny-3 (lub jego fragmentu), który uległ losowej integracji z genomem mysim (Tabela 1). Zastosowanie sztucznych promotorów pozwoliło z jednej strony na wydajną i silną ekspresję transgeny, z drugiej jednak strony wprowadziło nienaturalny wzór jego ekspresji, niekiedy znacznie odbiegający od wzoru ekspresji endogennej ataksyny-3. Wśród istniejących modeli innych chorób poliglutaminowych, takich jak HD, SCA1, SCA2, SCA6, SCA7, SCA17 i SBMA dostępne są myszy knock-in, w których zmutowany ciąg powtórzeń CAG został wprowadzony do endogennego locus określonego genu odpowiedzialnego za rozwój schorzenia⁴⁶. Modele knock-in charakteryzują się zazwyczaj łagodniejszym fenotypem w porównaniu z modelami wykazującymi nadekspresję zmutowanego transgeny, lecz przebieg choroby jest bardziej zbliżony do tego obserwowanego u pacjentów. Modele te ze względu na naturalny wzór ekspresji transgeny umożliwiają identyfikację patomechanizmów zachodzących w subpopulacjach neuronów, które podlegają degeneracji w określonej jednostce chorobowej, a także pozwalają z większą dokładnością analizować mechanizmy związane z takimi zjawiskami jak niestabilność ciągu powtórzeń, czy alternatywny splicing. Mimo niezaprzeczalnej przydatności istniejących modeli SCA3 w zrozumieniu wielu patofizjologicznych aspektów tego schorzenia, model knock-in ma szansę być niezwykle ważnym dodatkiem do kolekcji dostępnych już mysich modeli.

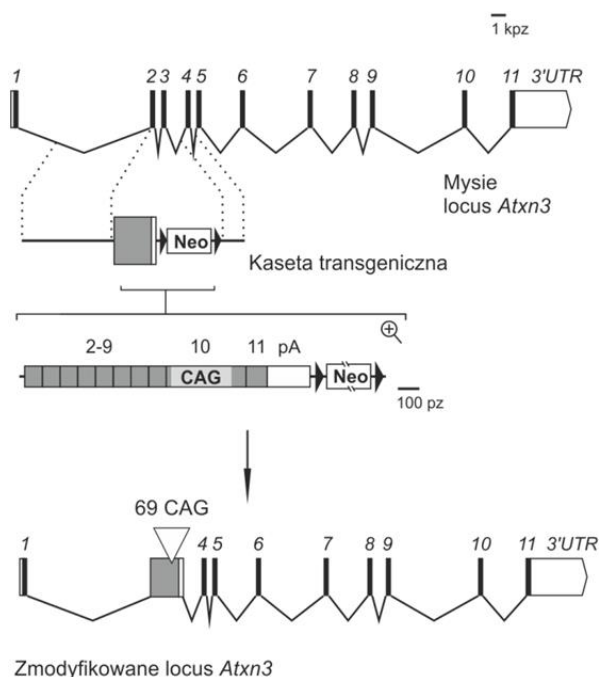
Mouse ataxin-3 functional knock-out model

Switonski, PM; Fiszer, A; Kazmierska, K; Kurpisz, M; Krzyzosiak, WJ; Figiel, M
Neuromolecular Medicine

Volume: 13 Issue: 1 Pages: 54-65

DOI: 10.1007/s12017-010-8137-3

Pierwsza próba stworzenia mysiego modelu SCA3 typu knock-in wykazującego ekspresję ludzkiej zmutowanej ataksyny-3 przedstawiona została w artykule *Mouse Ataxin-3 Functional Knock-Out Model*, opublikowanym w *NeuroMolecularMedicine*. Opisana w pracy strategia stworzenia transgeniczných zwierząt zakładała wprowadzenie do mysiego locus *Atxn3* fragmentu DNA stanowiącego sekwencję ludzkich egzonów ataksyny-3: od egzonu 2 do egzonu 11. W egzonie 10 znajdował się ciąg złożony z 69 trójnukleotydowych powtórzeń CAG. Fragment ten został wklonowany do wektora targetującego, a następnie wprowadzony do mysich komórek zarodkowych, by na drodze rekombinacji homologicznej ulec integracji z genomem w miejscu mysich egzonów 2 oraz 3 genu *Atxn3* (Ryc. 1). Obecność sekwencji kodującej miejsce poliadenylacji wirusa SV40, umiejscowionej za sekwencją cDNA zmutowanej ataksyny-3, miało w założeniu służyć jako sygnał do dokończenia procesu dojrzewania mRNA i zakończenia transkrypcji.



Ryc. 1

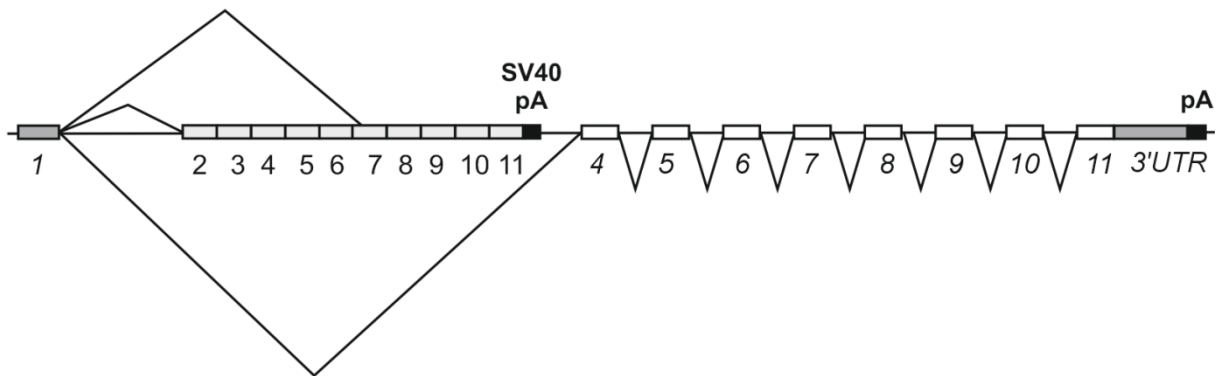
Schemat przedstawiający strategię transgenezy użytej do wygenerowania myszy K300. Egzony mysie opisane są kursywą, egzony ludzkie normalną czcionką. pA – sygnał poliadenylacji.

Tkanki pobrane od zwierząt nazwanych K300 zostały przeanalizowane pod kątem ekspresji zmutowanego transgenu. Analiza western blot oraz barwienia immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał służących do wykrycia ataksyny-3 pokazały, że zarówno zmutowana jak i normalna ataksyna-3 nie ulega ekspresji w żadnej z przebadanych tkanek. Tym samym zmiana wprowadzona w locus ataksyny-3 mająca doprowadzić do ekspresji zmutowanego białka spowodowała, że zmodyfikowany allel nabrał właściwości knock-out ataksyny-3. Analiza RNA przeprowadzona w celu wyjaśnienia tego

zjawiska pokazała, że powodem braku ekspresji produktu białkowego są zaburzenia splicingowe zachodzące podczas dojrzewania pre-mRNA ataksyny-3. Mimo obecności sygnału poliadenylacji znajdującego się za sekwencją ludzkiego egzonu 11, transkrypcji ulegają także mysie egzony i introny ataksyny-3 znajdujące się w zmodyfikowanym locus. Analizy RT-PCR wskazały na powstawanie alternatywnych form splicingowych, przy czym dominującą formą jest ta, w której egzon 1 łączy się bezpośrednio z mysim egzonom 4. (Ryc. 2) Sekwencja kodująca ludzkie egzony wraz z 69 powtórzeniami CAG w egzonie 10 ulega w formie intronu eliminacji z dojrzałego mRNA. Myszy homozygotyczne będące funkcjonalnymi knock-outami ataksyny-3 nie prezentują zauważanego fenotypu behawioralnego, są zdolne do rozmnażania i nie wykazują skróconej przeżywalności. Pomimo braku ekspresji zmutowanej ataksyny-3, a tym samym braku u zwierząt fenotypów odzwierciedlających SCA3, myszy K300 są wykorzystywane do badań dotyczących nie w pełni jeszcze poznanych naturalnych funkcji ataksyny-3.

Normalna przeżywalność zwierząt K300 oraz brak wyraźnego fenotypu pozostaje w zgodzie z wynikami innych badań dotyczących knock-outu genu kodującego ataksynę-3 i wskazuje na brak krytycznego zaangażowania tego białka podczas rozwoju zarodkowego. Nicienie *C. elegans* z unieczynnionym ortologiem ludzkiego i mysiego genu kodującego ataksynę-3 nie wykazują wyraźnego morfologicznego i biochemicznego fenotypu, pomimo zaobserwowanej deregulacji transkrypcyjnej szeregu genów związanych ze szlakiem ubikwityna-proteasom, zaangażowanych w przekazywanie sygnału, a także genów kodujących białka strukturalne i umożliwiające ruch nicieni⁴⁷. Podobny brak problemów z płodnością i przeżywalnością oraz brak zaznaczonego fenotypu behawioralnego zaobserwowany został u myszy knock-out *Atxn3*⁴⁸. U zwierząt tych zidentyfikowany został nieznacznie zwiększony poziom ubikwitynacji białek w lizatach tkankowych, potwierdzając deubikwitynującą aktywność enzymatyczną ataksyny-3. Zwiększonego poziomu ubikwitynacji nie udało się jednak zaobserwować w myszach K300. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tych różnic może być kompensacja funkcji ataksyny-3 przez jeden z kilkudziesięciu enzymów deubikwitynujących kodowanych przez mysi genom, jak i różnice w stosowanych metodach detekcji ubikwitynowanych białek. W modelu komórkowym, w którym ataksyna-3 została wyciszona za pomocą siRNA lub shRNA zaobserwowano wyraźne zaburzenia w organizacji cytoszkieletu oraz właściwościach adhezyjnych komórek^{49,50}. Otwarta pozostaje odpowiedź na pytanie, czy dyskretny fenotyp związany z organizacją cytoszkieletu może być również zaobserwowany w organizmach knock-out *Atxn3*, czy też jest on niwelowany przez mechanizmy adaptacyjne w odpowiedzi na długotrwały brak ataksyny-3 w organizmie.

Pomimo prawidłowo zintegrowanego transgenu w mysim locus *Atxn3*, zaburzenia splicingowe skutkują u myszy K300 brakiem ekspresji oczekiwanego produktu białkowego. W analizie RT-PCR udało się zidentyfikować trzy wykrywalne formy splicingowe, w które zaangażowany był egzon 1 (Ryc. 2). Dominującą formą splicingową jest cząsteczka, w której egzon 1 łączy się bezpośrednio z mysim egzonom 4. Drugą z wykrywalnych form, chociaż ulegającą ekspresji ze znacznie mniejszą wydajnością niż forma 1/4, jest cząsteczka, w której akceptor splicingowy pojawia się w ludzkim egzonie 7. Oczekiwana forma splicingowa, w której dochodzi do połączenia egzonu 1 z ludzkim egzonom 2 stanowi jedynie znikomy udział wśród wszystkich wykrywalnych cząsteczek mRNA ataksyny-3.



Ryc. 2

Formy splicingowe ataksyny-3 wykryte w transgenicznym zwierzętach K300. Egzony mysie opisane są kursywą, egzony ludzkie normalną czcionką. pA -sygnał poliadenylacji.

Mechanizm w którym pojawiają się formy splicingowe zawierające mysie egzony musi być związany ze zmniejszoną wydajnością rozpoznawania przez kompleks polimerazy II sygnału poliadenylacji znajdującego się tuż za ludzkim egzonem 11. Etapy dojrzewania mRNA, w tym splicing, poliadenylacja oraz terminacja transkrypcji zwykle przebiegają kotranskrypcyjnie i są od siebie zależne, pozostając w sieci wzajemnych regulacji⁵¹. Liczne badania wskazują, że sygnał poliadenylacji może poprawnie funkcjonować jeśli znajduje się w określonym kontekście splicingowym^{52,53}. Umieszczenie sygnału poliadenylacji w sekwencji intronowej skutkuje inhibicją jego funkcji umożliwiając normalny splicing, co wskazuje, że sygnał poliadenylacji nie jest rozpoznany, jeśli znajduje się pomiędzy miejscami splicingowymi 5' oraz 3'. W zwierzętach K300 obecność silnego miejsca akceptorowego 3' na granicy intron 3/ egzon 4 znajdującego się tuż za sygnałem poliadenylacji oraz dostępność miejsca donorowego 5' na granicy egzon 1/ intron 1 może być powodem znacząco osłabionego rozpoznawania sygnału poliadenylacji. Skutkuje to brakiem terminacji transkrypcji i dalszą transkrypcją mysich egzonów i intronów ataksyny-3 przez polimerazę II. Brak możliwości splicingu egzonu 4 (posiadającego silne miejsce splicingowe 3') z egzonem 3 powoduje, że egzon ten ulega preferencyjnemu splicingowi z egzonem 1, w praktyce eliminując pożądany splicing egzonu 1 z egzonem 2 (posiadającym słabe miejsce splicingowe 3').

Obecność formy splicingowej 1/4, w której nie dochodzi do przesunięcia ramki odczytu umożliwia powstanie skróconego produktu białkowego. Faktycznie, śladowe ilości ataksyny-3 o masie molekularnej odpowiadającej białku pozbawionemu sekwencji kodowanej przez egzony 2 i 3 wykrywalne są w jądrach samców K300. Badania określające katalityczne funkcje ataksyny-3 sugerują jednak, że białko to pozbawione kluczowych aminokwasów wchodzących w skład centrum katalitycznego nie jest zdolne do pełnienia swoich funkcji enzymatycznych^{54,55}.

A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD

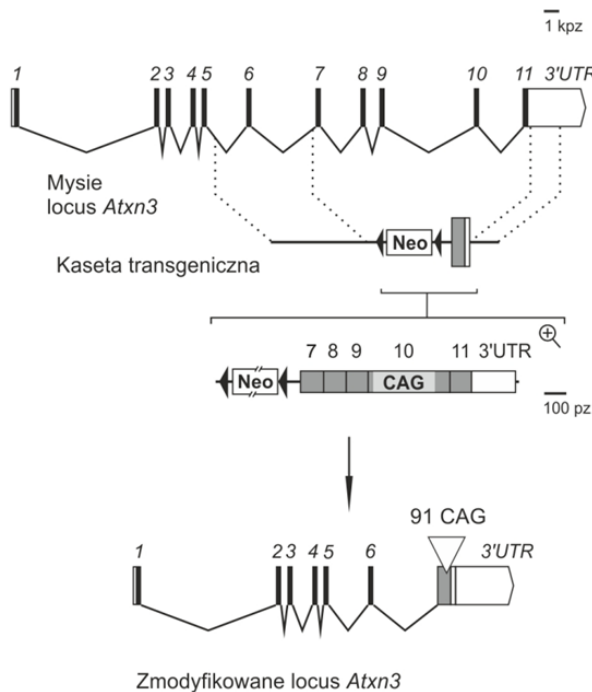
Switonski, PM; Szlachcic, WJ; Krzyzosiak, WJ; Figiel, M

Neurobiology Of Disease

W druku

DOI: 10.1016/j.nbd.2014.09.020

Doświadczenia zdobyte podczas generowania myszy K300 pozwoliły na zaprojektowanie nowej strategii w celu stworzenia funkcjonalnego modelu knock-in SCA3. Nowa strategia transgenezy zakładała usunięcie ostatnich 14 tysięcy par zasad mysiego genu *Atxn3*, w których zawierało się pięć ostatnich egzonów genu, wraz z zastąpieniem ich sekwencją kodującą ludzkie egzony wraz z 91 powtórzeniami CAG w egzonie 10 (Ryc. 3). Ponieważ pierwsze egzony mysiego genu *Atxn3* kodują sekwencję białka homologiczną z sekwencją ludzką, powstały w ten sposób hybrydowy gen koduje ataksynę-3 posiadającą sekwencję ludzkiego białka. Wykorzystanie naturalnego sygnału poliadenylacji znajdującego się w rejonie 3'UTR genu mysiej ataksyny-3 miało za zadanie zminimalizować ryzyko zaburzeń transkrypcyjnych jakie wystąpiły w modelu K300.



Ryc. 3

Schemat przedstawiający strategię transgenezy użytej do wygenerowania myszy Ki91. Egzony mysie opisane są kursywą, egzony ludzkie normalną czcionką.

Heterozygotyczne myszy nazwane Ki91 zostały przeanalizowane pod kątem prezentowanych fenotypów chorobowych. W pierwszej kolejności analizie poddana została stabilność zmutowanego ciągu powtórzeń CAG. W SCA3 i innych chorobach wywoływanych ekspansją trójnukleotydowych powtórzeń obserwuje się zmianę liczby powtórzeń podczas podziałów komórkowych. Obserwowana jest niestabilność somatyczna (związana z podziałami mitotycznymi) i międzypokoleniowa (związana z podziałami mejotycznymi). Towarzyszy temu zjawisko antycypacji – przekazywanie allelu z coraz większą liczbą powtórzeń skutkuje ostrzejszym i szybszym ujawnianiem się choroby w następnym

pokoleniu. Pomiary liczby powtórzeń w nowonarodzonych zwierzętach Ki91 wskazują, że ciąg ten przejawia niestabilność zarówno w transmisji międzypokoleniowej jak i somatycznej. Co interesujące, wzór niestabilności somatycznej jest silnie skorelowany z płcią osobnika przekazującego allel. Kiedy transgeniczne samce krzyżowane są z samicami typu dzikiego, w przeważającej większości transmisji obserwowane jest wydłużenie ciągu powtórzeń o 1 do 6 jednostek CAG na pokolenie. Przeciwna sytuacja ma miejsce kiedy to samice przekazują zmodyfikowany allel. W transmisjach matczynych obserwowane jest głównie skracanie ciągu powtórzeń o kilka jednostek CAG na pokolenie. Fenotyp ten jest odzwierciedleniem sytuacji występującej u pacjentów cierpiących na choroby poliglutaminowe. Tendencja w kierunku skracania ciągu powtórzeń w transmisjach matczynych oraz tendencja w kierunku jego wydłużania w transmisjach ojcowskich obserwowana jest w HD, SCA1, SCA7, DRPLA i do pewnego stopnia także w SCA3⁵⁶⁻⁶¹. Fenomen ten związany jest najprawdopodobniej z różnicami w metabolizmie DNA podczas spermatogenezy i oogenezy. Myszy Ki91 wykazują również postępującą z wiekiem niestabilność somatyczną, której wzór porównywalny jest ze wzorem niestabilności somatycznej obserwowanej u pacjentów SCA3. Podobnie jak u ludzi względnie wysoka niestabilność obserwowana jest w moście mózgu, prążkowie, wątrobie, nerkach i jądrach, natomiast ciąg CAG jest stabilny w korze mózgowej mózdzku, mięśniach szkieletowych, płucach i śledzionie^{62,63}.

Analizy western blot przeprowadzone z wykorzystaniem tkanek pochodzących od myszy Ki91 potwierdziły, że zmutowana ataksyna-3 posiadająca wydłużoną domenę poliglutaminową ulega ekspresji w praktycznie wszystkich analizowanych próbkach. Barwienia immunofluorescencyjne przeprowadzone na skrawkach mózgow pokazują, że ataksyna-3 ulega u myszy Ki91 akumulacji w jądrach komórkowych komórek mózgu. Obserwowane jest również wytrącanie się zmutowanej ataksyny-3 w formie wewnątrzjądrowych inkluzji. Fenotyp ten potwierdza, że jądrowa lokalizacja ataksyny-3 jest istotna w patogenezie SCA3 i daje podstawy do spekulacji nad normalną funkcją tego białka. Migracja ataksyny-3 do jądra obserwowana jest również w komórkach poddanych stresowi termicznemu i oksydacyjnemu, jak i również w mysim modelu wykazującym nadekspresję zmutowanej ataksyny-3^{42,64}. Ponadto, badania dowiodły, że migracja ataksyny-3 do jądra regulowana jest dzięki jej fosforylacji przez kinazy CK2 i GSK3, przy czym obecność poliglutaminowej mutacji nie wpływa na ten proces⁶⁵⁻⁶⁷. Zważywszy na postulowaną rolę ataksyny-3 w regulowaniu ekspresji genów można przypuszczać, że w odpowiedzi na stres proteotoksyczny, ataksyna-3 kierowana jest do jądra komórkowego w celu stymulacji ekspresji genów przeciwdziałających temu stresowi. Ekspresja zmutowanej ataksyny-3 może zatem być sama w sobie induktorem stresu proteotoksycznego, co stymuluje mechanizm translokacji poliglutaminowego białka do jądra, gdzie przyjmuje ono strukturę typu „beta-sheet”, agregując w toksyczne rozpuszczalne oligomery i nierozpuszczalne inkluzje⁶⁸.

Analiza genów kandydatów, które ulegają deregulacji w SCA3 i innych chorobach poliglutaminowych pokazała, że gen *Serpina3n* ulega podwyższonej ekspresji w mózgu myszy Ki91 oraz w kulturach astrocytów wyprowadzonych z tych zwierząt. Analiza qPCR wykazała, że deregulacja ta występuje na poziomie transkrypcyjnym. Fakt, że podwyższona ekspresja genu *Serpina3n* obserwowana jest w izolowanych kulturach komórkowych, wskazuje, że jest to autonomiczna zmiana spowodowana czynnikiem wewnątrzkomórkowym, takim jak ekspresja zmutowanej ataksyny-3. Podwyższona ekspresja genu *Serpina3n* była

również obserwowana przy równoczesnym obniżeniu ekspresji deacetylaz histonowych HDAC1 i HDAC2 (dane mikromacierzowe GSE20100). Wiadomo również, że zmutowana ataksyna-3 poza funkcjami deubikwitynującymi wpływa także na aktywność deacetylaz histonów, w rezultacie regulując ekspresję genów²³. Powyższe obserwacje wskazują, że obecność poliglutaminowej mutacji może interferować z naturalną funkcją ataksyny-3 w regulacji transkrypcyjnej genu *Serpina3n* i prawdopodobnie innych genów. Tematem wymagającym dalszych badań jest odpowiedź na pytanie czy podwyższona ekspresja *Serpina3n* moduluje proces chorobowy SCA3, a jeśli tak to czy działa w sposób pozytywny - jako jeden z mechanizmów obronnych - czy w sposób negatywny - jako jeden z czynników patogenezы. Obserwacje wskazujące na podwyższenie ekspresji *Serpina3n* i ludzkiego ortologu *SERPINA3* w innych chorobach neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, SCA1 czy choroba Huntingtona, wspierają pogląd o potencjalnie ważnej roli tego białka w procesach neurodegeneracyjnych⁶⁹⁻⁷².

Zwierzęta Ki91 wykazują objawy neurodegeneracyjne występujące w mózdku. W analizie immunohistochemicznej sygnał od Calbindyny (markera komórek Purkinjego) jest obniżony w mózdkach Ki91 w porównaniu do kontroli typu dzikiego. Wielkość obniżenia sygnału różni się w różnych częściach mózdku. Szczególnie mocny spadek sygnału dla Calbindyny obserwowany jest w części kaudalnej mózdku (lobula X). Szczegółowa analiza morfologii i liczby komórek Purkinjego u zwierząt Ki91 wskazała na istnienie licznej populacji neuronów Purkinjego z cechami degeneracji (brak jądrowej immunoreaktywności na Calbindynę oraz nieobecność dendrytu głównego) oraz niewielką utratę komórek Purkinjego. Zmianom neurodegeneracyjnym towarzyszy zwiększona obecność zaangażowanych w procesy neurozapalne astrocytów. W chorobach neurozwyrodnieniowych lokalna aktywacja astrocytów jest powiązana z degeneracją neuronów i często występuje u pacjentów SCA3.

Odpowiednikami ludzkich symptomów chorobowych są u myszy zaburzenia behawioralno-motoryczne, do pomiaru których zastosowane zostały odpowiednie testy pozwalające na ilościową analizę m.in. zaburzeń koordynacji, fenotypu ataktycznego oraz aktywności ruchowej gryzoni. Dodatkowo zwierzęta były systematycznie ważone w celu detekcji ewentualnych zaburzeń w utrzymywaniu prawidłowej masy ciała. Wyniki pokazały, że zwierzęta Ki91 wykazują późno pojawiające się (90 tydzień życia) zaburzenia w koordynacji ruchowej zaobserwowane na teście rotarod oraz w teście prętu statycznego. Podobny późno pojawiający się fenotyp jest obserwowany w mysim modelu SCA3 z nadekspresją pełnej długości ataksyny-3, jak i w modelach knock-in innych chorób poliglutaminowych. Obserwacje te zgodne są z rozwojem symptomów chorobowych obserwowanych u pacjentów chorób poliglutaminowych, w przypadku których objawy zwykle ujawniają się w czwartej i późniejszych dekadach życia.

Pierwszy zhumanizowany model knock-in posiada zatem tło genetyczne najbardziej zbliżone do naturalnego ze wszystkich dostępnych obecnie mysich modeli SCA3, a także prezentuje molekularne, histopatologiczne i behawioralne fenotypy odzwierciedlające postępujące objawy obserwowane u pacjentów SCA3.

Mouse models of polyglutamine diseases: review and data table. Part I

Figiel, M; Szlachcic; Switonski, PM; Gabka, A; Krzyzosiak, WJ
Molecular Neurobiology
Volume: 46 Issue: 2 Pages: 393-429
DOI: 10.1007/s12035-012-8315-4

Mouse models of polyglutamine diseases in therapeutic approaches: review and data table. Part II

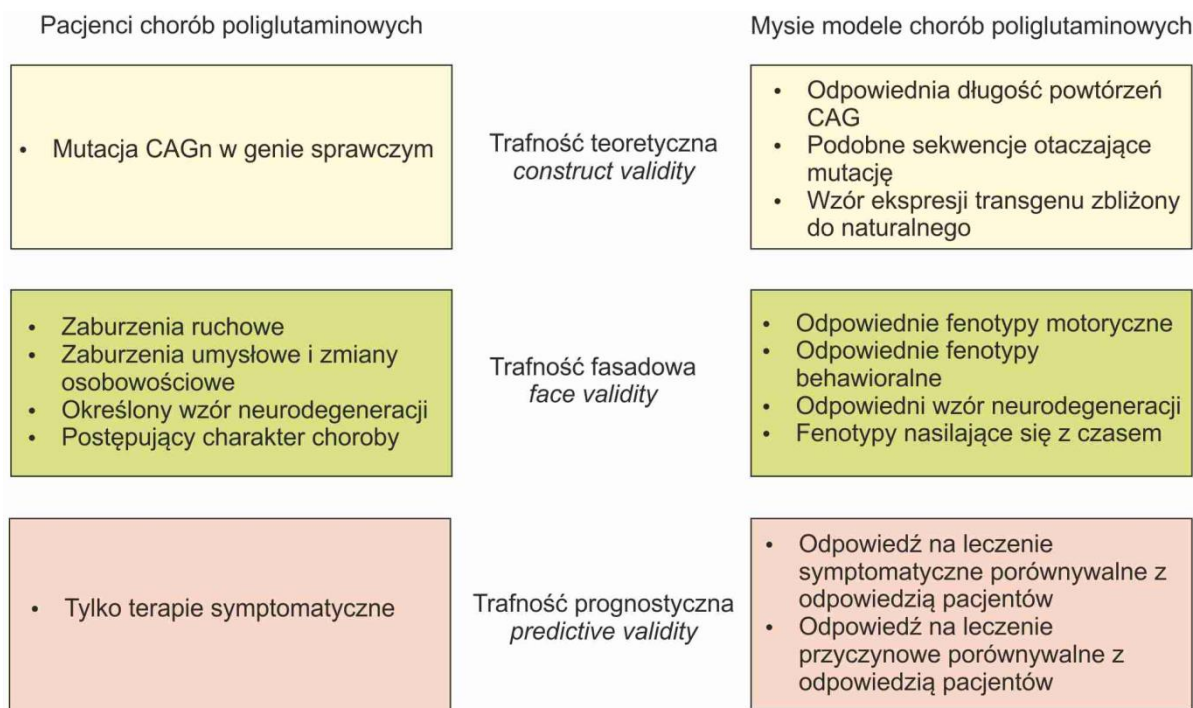
Switonski, PM; Szlachcic, WJ; Gabka, A; Krzyzosiak, WJ; Figiel, M
Molecular Neurobiology
Volume: 46 Issue: 2 Pages: 430-466
DOI: 10.1007/s12035-012-8316-3

Wiele molekularnych, histologicznych i neurologicznych objawów różnych chorób neurodegeneracyjnych wykazuje wyraźne podobieństwa, wskazując na istnienie wspólnych patomechanizmów odpowiedzialnych za degenerację i obumieranie neuronów. Wśród mechanizmów tych wymienić można zaburzenia bioenergetyczne, obecność inkluzji i wtrąceń białkowych, czy rozregulowanie procesów odpowiedzialnych za „recykling” składników komórkowych (autofagia i system ubikwityna-proteasom). Patomechanizmy te są wspólnym motywem dla wielu chorób neurozwyrodnieniowych, m.in. choroby Alzheimera, Parkinsona, chorób poliglutaminowych, ALS czy choroby Creutzfeldta-Jakoba i odzwierciedlają naturę wyspecjalizowanych komórek jakimi są neurony. Jako komórki postmitotyczne wykazujące wysokie zapotrzebowanie na energię niezbędną do ciągłego prowadzenia dynamicznej gospodarki jonowej są one silnie uzależnione od prawidłowego funkcjonowania mitochondriów i komórkowych systemów kontroli jakości⁷³. Studiowanie chorób poliglutaminowych będących schorzeniami o zdefiniowanej etiologii stwarza możliwość uzyskania szerokiego spojrzenia na podstawy procesów neurodegeneracyjnych i poszukiwanie nowych celów terapeutycznych dla szerokiego spektrum chorób neurozwyrodnieniowych.

Technologia umożliwiająca celowaną ingerencję w genom myszy umożliwia wygenerowanie w transgenicznym zwierzętach patofizjologicznych stanów odzwierciedlających ludzkie choroby. Modele te umożliwiają zarówno poszerzanie istniejącej już wiedzy na temat przyczyn stojących za powstawaniem i rozwojem ludzkich chorób, a także pozwalają na przedkliniczną ocenę efektywności i toksyczności potencjalnych terapeutów. Od 1995 roku, kiedy Harry Orr opublikował pracę opisującą pierwszy genetyczny model choroby poliglutaminowej⁷⁴, powstała ponad setka różnych mysich modeli odzwierciedlających dziewięć znanych obecnie chorób wywoływanych ekspansją powtórzeń CAG. Kompleksowa informacja o strategiach użytych do ich wygenerowania, architekturze transgenów, fenotypach prezentowanych przez zwierzęta oraz podejściach terapeutycznych z ich wykorzystaniem została zgromadzona i przedstawiona w dwóch pracach przeglądowych opublikowanych w czasopiśmie *Molecular Neurobiology*. W części pierwszej przedstawione są wszystkie genetyczne mysie modele chorób poliglutaminowych stworzone na przestrzeni

ostatnich dwudziestu lat. Każdy model posiada dokładny opis konstruktu genetycznego, który został wykorzystany do jego stworzenia, w tym informacje na temat zastosowanego promotora, długości ciągu powtórzeń CAG i sekwencji otaczającej trójnukleotydową mutację. Dodatkowo zebrane są informacje dotyczące obecności i tempa rozwoju fenotypów chorobowych prezentowanych przez myszy. W części pierwszej pracy przeglądowej zawarta jest również obszerna dyskusja dotycząca wpływu konstruktów genetycznych na stopień odzwierciedlenia ludzkiej choroby z wykorzystaniem myszy, a także dyskusja odnosząca się do porównania neurologicznych i nie neurologicznych fenotypów obecnych w różnych mysich modelach chorób poliglutaminowych. Druga część pracy przeglądowej zorientowana jest na aspekty terapeutyczne chorób poliglutaminowych z wykorzystaniem mysich modeli tych schorzeń. Zebrane zostały informacje na temat przedklinicznych prób terapeutycznych, zawierające szczegółowe opisy leków/podejść terapeutycznych wraz z ich wpływem na prezentowane przez myszy fenotypy chorobowe. Wszystkie próby przedklinicznej terapii pogrupowane zostały w zależności od tego, któremu aspektowi patomechanizmu biorącego udział w neurodegeneracji przeciwdziałają. Tym samym prezentowana jest informacja na temat wspólnych dla chorób poliglutaminowych procesów komórkowych, których rozregulowanie prowadzi do śmierci neuronów i rozwoju choroby. W części drugiej pracy przeglądowej zawarta jest także dyskusja na temat przydatności mysich modeli w poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych i określaniu skuteczności eksperymentalnych terapii. Istotnym dodatkiem do obu prac są elektroniczne tabele porządkujące zebrane dane. Zawarty w nich szczegółowy opis fenotypów prezentowanych przez zwierzęta, w tym informacja o ich nasileniu, czasie trwania i lokalizacji oraz efektywności stosowanych podejść terapeutycznych znacząco ułatwiają porównywanie ze sobą danych na temat poszczególnych mysich modeli.

Przy analizie mysich modeli chorób poliglutaminowych można zauważyć, że modele obrazujące to samo schorzenie często znacząco różnią się pod względem prezentowanych fenotypów chorobowych. Stopień w jakim model prawidłowo odzwierciedla dane schorzenie można opisać korzystając z kryteriów zaproponowanych oryginalnie przez Paula Willnera do opisu mysich modeli ludzkich zaburzeń psychicznych⁷⁵. Kryteria te pozwalają ocenić jak trafnie dany model odzwierciedla jednostkę chorobową w kontekście: a) mechanizmów molekularnych prowadzących do rozwoju choroby (trafność teoretyczna, construct validity), b) podobieństwa fenotypów prezentowanych przez model do objawów chorobowych występujących u pacjentów (trafność fasadowa, face validity) oraz c) podobieństwa modelu do ludzkiego organizmu w kontekście odpowiedzi na interwencję terapeutyczną przeciwdziałającą chorobie (trafność prognostyczna, predictive validity) – Ryc. 4.



Ryc. 4

Kryteria pomocne w określeniu stopnia odzwierciedlenia danej choroby poliglutaminowej przez myszy model.

Fakt, że choroby poliglutaminowe mają charakter monogenowy znacząco ułatwia tworzenie wiarygodnych mysich modeli tych schorzeń. Podobnie jak u pacjentów, obecność wydłużonego ciągu powtórzeń CAG w sekwencji genów sprawczych prowadzi do rozwoju choroby. Trafność teoretyczna takich modeli jest więc stosunkowo wysoka w porównaniu do modeli chorób o nie w pełni zidentyfikowanej etiologii, w których objawy podobne do tych obserwowanych u ludzi wywołuje się w oparciu o inne mechanizmy molekularne, np. uszkodzając neurony dopaminergiczne toksynami w mysich modelach choroby Parkinsona czy immunizując myszy glikoproteinami mieliny w modelach stwardnienia rozsianego^{76,77}. Pomimo zdefiniowanego podłoża genetycznego, różne modele tej samej choroby poliglutaminowej mogą różnić się między sobą w charakterze trafności teoretycznej ze względu na różnice konstrukcjach genetycznych użytych do stworzenia zwierząt. Wykorzystanie sztucznych promotorów pozwala na wydajną ekspresję zmutowanych genów oraz umożliwia studiowanie patomechanizmów tkankowo-specyficznych lub komórkowo-specyficznych, wpływając jednak znacząco na nasilenie fenotypów w porównaniu do modeli wykorzystujących naturalne promotory. Podobnie, transgeneza fragmentem, a nie pełnej długości genem jest niewątpliwie łatwiejsza technicznie (dla przykładu cDNA ludzkiej huntingtyny liczy ponad 13 tysięcy par zasad), jednak skrócone poliglutaminowe peptydy wykazują zwiększoną cytotoxycywność w porównaniu do ich pełnej długości odpowiedników. Stopniem nasilenia fenotypów można także manipulować dostosowując długość samego ciągu powtórzeń CAG, jako że podobnie jak u ludzi obserwuje się negatywną korelację

między siłą objawów a długością mutacji. Wśród mysich modeli choroby Huntingtona obecne są myszy z 48 powtórzeniami CAG jak i takie z ponad 400 powtórzeniami CAG^{78,79}.

Wszystkie z powyższych manipulacji wpływają w znacznym stopniu na czas występowania i nasilenie fenotypów chorobowych a tym samym na trafność fasadową modeli. Za przykład posłużyć może mysz R6/2 – najczęściej wykorzystywany w badaniach model choroby Huntingtona. Myszy te wykazują nadekspresję jedynie pierwszego egzonu ludzkiej huntingtyny z około 150 powtórzeniami CAG⁸⁰. Fenotyp chorobowy odzwierciedlający wiele objawów choroby Huntingtona jest u tych zwierząt niezwykle nasilony, rozwijając się w ciągu pierwszych kilkunastu tygodni życia zwierzęcia. W modelu R6/2 odnotowuje się jednak także fenotypy nie obserwowane u pacjentów takie jak poważne problemy z płodnością, szeroka, nie zlokalizowana neuropatologia obejmująca obszary mózgu nie zajęte w chorobie Huntingtona, czy drastycznie skrócona przeżywalność. Po przeciwnej stronie można umieścić model knock-in choroby Huntingtona posiadający 150 powtórzeń CAG wprowadzonych do pierwszego egzonu mysiej huntingtyny. Fenotyp chorobowy rozwija się wolno, a poszczególne objawy pojawiają się dopiero jak myszy osiągną wiek 1- 1.5 roku⁸¹. Mimo dostrzegalnej różnicy w trafności fasadowej, otwartym pytaniem jest czy różnice między dwoma mysimi modelami są istotne w świetle znacznie większych różnic fizjologicznych i anatomicznych między organizmem mysim i ludzkim.

Trafność prognostyczna mysich modeli, a więc odpowiedź na pytanie czy przedkliniczna terapia z użyciem modelu będzie równie skuteczna w przypadku zastosowania jej na ludziach nie jest łatwa do opisanie. Aby ustalić trafność prognostyczną modelu należy porównać wyniki uzyskane na zwierzętach z wynikami badań klinicznych, co w przypadku chorób poliglutaminowych jest o tyle utrudnione, że stosunkowo niewiele badań klinicznych było przeprowadzonych z wykorzystaniem pacjentów. Niemniej jednak mysie modele chorób poliglutaminowych są intensywnie wykorzystywane do poszukiwania nowych leków czy interwencji terapeutycznych mogących opóźnić czy wręcz powstrzymać rozwój choroby.

Porównując ze sobą mysie modele chorób poliglutaminowych dostrzec można prawidłowość: im wyższa trafność teoretyczna modelu, tym wierniej odzwierciedla on kliniczny obraz choroby obserwowanej u ludzi. Modele z ekspresją genu pełnej długości, znajdującą się pod kontrolą endogennego promotora w otoczeniu naturalnych sekwencji regulatorowych (modele knock-in, modele wygenerowane z użyciem chromosomów BAC i YAC), nie będą rozwijać silnych i szybko postępujących fenotypów chorobowych, które będą obecne u transgenicznych modeli wykazujących nadekspresję skróconego fragmentu zmutowanego genu (myszy R6/2, N171-82Q, SCA3 148.19 CAG). Fenotypy te będą jednak bliższe naturalnym i pozwolą na dokładniejsze studiowanie procesów prowadzących do neurodegeneracji. Z drugiej strony, modele „szybsze” są preferowane w eksperymentalnych terapiach, gdzie silnie zaznaczone, chociaż odbiegające od naturalnego fenotypy wykorzystywane są do sprawnej oceny skuteczności i efektywności terapii.

5. Podsumowanie i perspektywy

Mysie modele chorób poliglutaminowych dostarczyły wielu informacji na temat patomechanizmów odpowiedzialnych za neurodegenerację, a także umożliwiły wskazanie celów terapeutycznych stanowiących podstawę do rozwoju nowych terapii hamujących rozwój tych chorób. Większość stworzonych dotąd mysich modeli SCA3 wykazywała nadekspresję zmutowanej ataksyny-3 i brak było modelu knock-in który możliwie najwierniej odzwierciedlałby tło genetyczne SCA3 oraz obraz kliniczny tej choroby. W toku prac zmierzających do wygenerowania takiego modelu uzyskano dwie transgeniczne linie – mysz K300 będąca funkcjonalnym knock-outem ataksyny-3 oraz mysz Ki91 stanowiącą zhumanizowany knock-in SCA3.

Obie linie myszy są obecnie wykorzystywane w badaniach związanych z naturalną funkcją ataksyny-3 oraz poznawaniem indukowanych przez zmutowaną ataksynę-3 nowych szlaków molekularnych odpowiedzialnych za procesy neurodegeneracyjne. Kanoniczną funkcją ataksyny-3 jest jej aktywność deubikwitynująca i zaangażowanie w system kontroli jakości białek w szlaku ubikwityna-proteasom. Coraz więcej dowodów wskazuje jednak na to, że białko to związane jest z regulacją ekspresji genów, zarówno w normalnych warunkach jak i w odpowiedzi na stres. W trwających obecnie pracach związanych z poznaniem mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zaangażowanie ataksyny-3 w regulację transkrypcyjną, udało się zidentyfikować podwyższoną ekspresję genu *serpina3n*, która występuje zarówno u zwierząt K300 jak i myszy Ki91. Obecność zwiększonej ekspresji tego genu zarówno w przypadku braku ataksyny-3 (knock-out) jak i obecności jedynie zmutowanej ataksyny-3 (knock-in) sugeruje, że w normalnych warunkach ataksyna-3 może być zaangażowana w supresję ekspresji genów, przy czym poliglutaminowa mutacja może tę funkcję osłabiać. Modele K300 i Ki91 umożliwiają zatem detekcję patomechanizmów SCA3 związaną z utratą funkcji przez zmutowane białko.

Dodatkowym aspektem w którym wykorzystywane będą zwierzęta Ki91 jest eksperymentalna terapia SCA3 i innych chorób poliglutaminowych z użyciem alleloselektywnych oligonukleotydów umożliwiających obniżanie ekspresji jedynie zmutowanej formy genu^{82,83}. Model służący do oceny alleloselektywnej terapii powstanie poprzez skrzyżowanie myszy Ki91 z myszą Ki21, posiadającej niepatogenny ciąg powtórzeń CAG w mysim locus *Atn3*. Zwierzęta takie będą przydatne zarówno do testowania oligonukleotydów celujących w rejon powtórzeń, jak i tych rozróżniających allele dzięki obecności polimorfizmu SNP⁸⁴, ponieważ myszy Ki91 i Ki21 posiadają 5 różniących je wariantów SNP obecnych w transgenie ataksyny-3.

6. Bibliografia

1. Cuénot, L. Notes et revues. *Arch. Zool. Expérimentale Générale* **XXVII**, (1902).
2. Little, C. C. The genetics of tumor transplantation. *Biol. Lab. Mouse* 279–309 (1941).
3. Gorer, P. A. The genetic and antigenetic basis of tumour transplantation. *J. Pathol. Bacteriol.* 691–697 (1937).
4. Snell, G. D. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* **49**, 87–108 (1948).
5. Engber, D. The Mouse Trap - the dangers of using one lab animal to study every disease. *Slate* at <http://www.slate.com/articles/health_and_science/the_mouse_trap/2011/11/lab_mice_are_they_limiting_our_understanding_of_human_disease_.html>
6. European Union. Seventh Report from the Commission to the Council and the European Parliament on the Statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union. (2013).
7. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A. & Ruddle, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 7380–7384 (1980).
8. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156 (1981).
9. Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503–512 (1987).
10. Doetschman, T. *et al.* Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**, 576–578 (1987).
11. Bouabe, H. & Okkenhaug, K. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1064**, 315–336 (2013).
12. Mouse Genome Sequencing Consortium *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520–562 (2002).
13. Church, D. M. *et al.* Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol.* **7**, e1000112 (2009).
14. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 2731–2738 (2004).
15. Madisson, E. *et al.* Differences in gene expression between mouse and human for dynamically regulated genes in early embryo. *PLoS One* **9**, e102949 (2014).
16. Ginis, I. *et al.* Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **269**, 360–380 (2004).
17. Treuting, P. M. & Dintzis, S. M. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas.* (Academic Press, 2011).
18. Rüb, U. *et al.* Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog. Neurobiol.* **104**, 38–66 (2013).
19. Stevanin, G. *et al.* The gene for spinal cerebellar ataxia 3 (SCA3) is located in a region of approximately 3 cM on chromosome 14q24.3-q32.2. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 193–201 (1995).
20. Kawaguchi, Y. *et al.* CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet.* **8**, 221–228 (1994).
21. Costa, M. do C. & Paulson, H. L. Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog. Neurobiol.* **97**, 239–257 (2012).

22. Chou, A.-H. *et al.* Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol. Dis.* **31**, 89–101 (2008).
23. Evert, B. O. *et al.* Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 11474–11486 (2006).
24. Donaldson, K. M. *et al.* Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8892–8897 (2003).
25. Nascimento-Ferreira, I. *et al.* Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain J. Neurol.* **134**, 1400–1415 (2011).
26. Tsoi, H., Lau, T. C.-K., Tsang, S.-Y., Lau, K.-F. & Chan, H. Y. E. CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13428–13433 (2012).
27. Mykowska, A., Sobczak, K., Wojciechowska, M., Kozłowski, P. & Krzyzosiak, W. J. CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8938–8951 (2011).
28. Chan, H. Y. E., Warrick, J. M., Andriola, I., Merry, D. & Bonini, N. M. Genetic modulation of polyglutamine toxicity by protein conjugation pathways in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2895–2904 (2002).
29. Warrick, J. M. *et al.* Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell* **93**, 939–949 (1998).
30. Teixeira-Castro, A. *et al.* Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2996–3009 (2011).
31. Bilen, J. & Bonini, N. M. Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **3**, 1950–1964 (2007).
32. Cemal, C. K. *et al.* YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1075–1094 (2002).
33. Ikeda, H. *et al.* Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat. Genet.* **13**, 196–202 (1996).
34. Colomer Gould, V. F. *et al.* A mutant ataxin-3 fragment results from processing at a site N-terminal to amino acid 190 in brain of Machado-Joseph disease-like transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* **27**, 362–369 (2007).
35. Hübener, J. *et al.* Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum. Mol. Genet.* **22**, 508–518 (2013).
36. Goti, D. *et al.* 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. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 10266–10279 (2004).
37. Bichelmeier, U. *et al.* Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 7418–7428 (2007).
38. Hübener, J. *et al.* N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation. *Brain J. Neurol.* **134**, 1925–1942 (2011).
39. Chen, X. *et al.* Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 12713–12724 (2008).
40. Griffin, J. L., Cemal, C. K. & Pook, M. A. Defining a metabolic phenotype in the brain of a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia 3. *Physiol. Genomics* **16**, 334–340 (2004).
41. Silva-Fernandes, A. *et al.* 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 (2010).
42. Boy, J. *et al.* 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 (2010).

43. Torashima, T. *et al.* Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep.* **9**, 393–399 (2008).
44. Boy, J. *et al.* Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4282–4295 (2009).
45. Harvard NeuroDiscovery Center. The challenge of neurodegenerative diseases. at <http://www.neurodiscovery.harvard.edu/challenge/challenge_2.html>
46. Figiel, M., Szlachcic, W. J., Switonski, P. M., Gabka, A. & Krzyzosiak, W. J. Mouse models of polyglutamine diseases: review and data table. Part I. *Mol. Neurobiol.* **46**, 393–429 (2012).
47. Rodrigues, A.-J. *et al.* Functional genomics and biochemical characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 1126–1136 (2007).
48. Schmitt, I. *et al.* Inactivation of the mouse *Atxn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 734–739 (2007).
49. Rodrigues, A.-J. *et al.* Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 1154–1163 (2010).
50. Neves-Carvalho, A. *et al.* Dominant negative effect of polyglutamine expansion perturbs normal function of ataxin-3 in neuronal cells. *Hum. Mol. Genet.* (2014). doi:10.1093/hmg/ddu422
51. Bentley, D. L. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 163–175 (2014).
52. Niwa, M., Rose, S. D. & Berget, S. M. In vitro polyadenylation is stimulated by the presence of an upstream intron. *Genes Dev.* **4**, 1552–1559 (1990).
53. Cooke, C., Hans, H. & Alwine, J. C. Utilization of splicing elements and polyadenylation signal elements in the coupling of polyadenylation and last-intron removal. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4971–4979 (1999).
54. Berke, S. J. S. & Paulson, H. L. Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPER hand on neurodegeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 253–261 (2003).
55. Burnett, B., Li, F. & Pittman, R. N. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 3195–3205 (2003).
56. Aziz, N. A., van Belzen, M. J., Coops, I. D., Belfroid, R. D. M. & Roos, R. A. C. Parent-of-origin differences of mutant HTT CAG repeat instability in Huntington's disease. *Eur. J. Med. Genet.* **54**, e413–418 (2011).
57. Chung, M. Y. *et al.* Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nat. Genet.* **5**, 254–258 (1993).
58. Gouw, L. G. *et al.* Analysis of the dynamic mutation in the SCA7 gene shows marked parental effects on CAG repeat transmission. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 525–532 (1998).
59. Koide, R. *et al.* Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA). *Nat. Genet.* **6**, 9–13 (1994).
60. Dürr, A. *et al.* Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann. Neurol.* **39**, 490–499 (1996).
61. Maciel, P. *et al.* Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 54–61 (1995).
62. Cancel, G. *et al.* Somatic mosaicism of the CAG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Hum. Mutat.* **11**, 23–27 (1998).
63. Tanaka, F. *et al.* Differential pattern in tissue-specific somatic mosaicism of expanded CAG trinucleotide repeats in dentatorubral-pallidolusian atrophy, Machado-Joseph disease, and X-linked recessive spinal and bulbar muscular atrophy. *J. Neurol. Sci.* **135**, 43–50 (1996).

64. Reina, C. P., Zhong, X. & Pittman, R. N. Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 235–249 (2010).
65. Pastori, V. *et al.* CK2 and GSK3 phosphorylation on S29 controls wild-type ATXN3 nuclear uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 583–592 (2010).
66. Mueller, T. *et al.* CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3334–3343 (2009).
67. Tao, R.-S., Fei, E.-K., Ying, Z., Wang, H.-F. & Wang, G.-H. Casein kinase 2 interacts with and phosphorylates ataxin-3. *Neurosci. Bull.* **24**, 271–277 (2008).
68. Takahashi, T., Katada, S. & Onodera, O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J. Mol. Cell Biol.* **2**, 180–191 (2010).
69. Nilsson, L. N. *et al.* Alpha-1-antichymotrypsin promotes beta-sheet amyloid plaque deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 1444–1451 (2001).
70. Padmanabhan, J., Levy, M., Dickson, D. W. & Potter, H. Alpha1-antichymotrypsin, an inflammatory protein overexpressed in Alzheimer's disease brain, induces tau phosphorylation in neurons. *Brain J. Neurol.* **129**, 3020–3034 (2006).
71. Zabel, C. *et al.* Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's disease. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **1**, 366–375 (2002).
72. Lin, X., Antalffy, B., Kang, D., Orr, H. T. & Zoghbi, H. Y. Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat. Neurosci.* **3**, 157–163 (2000).
73. La Spada, A. R. & Taylor, J. P. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 247–258 (2010).
74. Burchright, E. N. *et al.* SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell* **82**, 937–948 (1995).
75. Willner, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **10**, 677–690 (1986).
76. Chesselet, M.-F. & Richter, F. Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet Neurol.* **10**, 1108–1118 (2011).
77. Robinson, A. P., Harp, C. T., Noronha, A. & Miller, S. D. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb. Clin. Neurol.* **122**, 173–189 (2014).
78. Hodgson, J. G. *et al.* A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* **23**, 181–192 (1999).
79. Morton, A. J. *et al.* Paradoxical delay in the onset of disease caused by super-long CAG repeat expansions in R6/2 mice. *Neurobiol. Dis.* **33**, 331–341 (2009).
80. Mangiarini, L. *et al.* Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493–506 (1996).
81. Lin, C. H. *et al.* Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 137–144 (2001).
82. Fiszer, A., Mykowska, A. & Krzyzosiak, W. J. Inhibition of mutant huntingtin expression by RNA duplex targeting expanded CAG repeats. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5578–5585 (2011).
83. Fiszer, A., Olejniczak, M., Galka-Marciniak, P., Mykowska, A. & Krzyzosiak, W. J. Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression. *Nucleic Acids Res.* **41**, 10426–10437 (2013).
84. Fiszer, A. *et al.* An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases. *BMC Mol. Biol.* **13**, 6 (2012).

7. Oświadczenia współautorów o ich wkładzie w publikację

1. Oświadczenie prof. dr hab. Włodzimierza Krzyżosiaka (wszystkie prace)
2. Oświadczenie dr Macieja Figla (wszystkie prace)
3. Oświadczenie prof. dr hab. Macieja Kurpisa (Switonski et al. 2011)
4. Oświadczenie dr Agnieszki Fiszer (Switonski et al. 2011)
5. Oświadczenie mgr Katarzyny Jastrzębskiej (Switonski et al. 2011)
6. Oświadczenie mgr Wojciecha Szlachcica (Switonski et al. 2014)
7. Oświadczenie mgr Wojciecha Szlachcica (Figiel et al. 2012)
8. Oświadczenie mgr Agnieszki Gąbki (Figiel et al. 2012)
9. Oświadczenie mgr Wojciecha Szlachcica (Switonski et al. 2012)
10. Oświadczenie mgr Agnieszki Gąbki (Switonski et al. 2012)