

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk

Rozprawa doktorska

mgr Michał Zalas

**„Ocena fenotypowa myszy niosących mutację
punktową genu alfa-II spektryny jako modelu
zwierzęcego dla zespołu ataktycznych
spektrynopatii neuronalnych”**

Promotor:

prof. dr hab. Arkadiusz Miążek

Pracę zrealizowano w
Laboratorium Immunologii Nowotworów
Wrocław 2023

*Składam serdeczne podziękowania
promotorowi Panu **prof. dr hab. Arkadiuszowi Miążkowi**
za poświęcony mi czas, nieocenioną pomoc, okazaną życzliwość i cierpliwość
oraz za wspaniałą opiekę promotorską, przekazaną wiedzę,
wnikliwie uwagi i cenne wskazówki,
które przyczyniły się do podniesienia wartości niniejszej pracy.*

*Chciałbym również podziękować
dr inż. Marcie Lisowskiej i mgr inż. Joannie Skrzymowskiej
za wspaniałą atmosferę w laboratorium oraz wszelką pomoc.*

Dane uzyskane w toku realizacji projektu doktorskiego zostały opracowane w formie publikacji:

Miążek Arkadiusz, Zalas Michał, Skrzymowska Joanna, Bogin Bryan A., Grzymajło Krzysztof, Goszczyński Tomasz M., Levine Zachary A., Morrow Jon S., Stankewich Michael C. Age-dependent ataxia and neurodegeneration caused by an α II spectrin mutation with impaired regulation of its calpain sensitivity. „Scientific Reports” 2021, 11(1), 7312.

Zalas Michał, Skrzymowska Joanna, Miążek Apolonia, Miążek Arkadiusz. Progressive Ataxia, Memory Impairments, and Seizure Episodes in Spna2 R1098Q Mouse Variant Affecting Alpha II Spectrin's Scaffold Stability. Brain Sciences 2023, 13(2), 261.

SPIS TREŚCI

Streszczenie	8
Summary	10
Wykaz skrótów	12
1. Wprowadzenie	20
1.1. Spektryny	20
1.1.1. Budowa spektryn jako białek cytoszkieletu komórkowego	20
1.1.2. Występowanie	21
1.1.3. Ogólna rola spektryn	22
1.1.4. A-II spektryna	23
1.1.4.1. Funkcje α-II spektryny	24
1.1.4.2. Działanie kalpajny i kaspazy oraz wrażliwość na cięcie α-II spektryny	28
1.2. Wybrane funkcje spektryn:	29
1.2.1. Wewnątrzkomórkowy transport białek	29
1.2.2. Fagocytoza	30
1.2.3. Przekazywanie sygnałów przez zewnętrzną błonę komórkową	32
1.2.4. Kontrola cyklu komórkowego	36
1.2.5. Angiogeneza	38
1.2.6. Układ odporności	43
1.3. Przegląd ludzkich spektrynopatii	46
1.3.1. Wpływ mutacji na dimeryzację i powstawanie agregatów	54
1.3.2. Modelowanie strukturalne	55
1.4. Modele zwierzęce ludzkich spazmów niemowlęcych i α-II spektrynopatii	56
2. Materiały i metody	67
2.1. Materiały	67
2.1.1. Odczynniki	67
2.1.2. Bufory, roztwory i pożywki	68
2.1.3. Myszy Spna2R1098Q	70

2.1.4. Urządzenia wykorzystane w testach behawioralno-pamięciowych.....	71
2.1.4.1. Test obracającego się wałka.....	71
2.1.4.2. Test koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów....	72
2.1.4.3. Test siły mięśniowej „wire-hang”.....	72
2.2. Metody	72
2.2.1. Ocena morfometryczna myszy.....	72
2.2.1.1. Określenie długości całkowitej, tułowia i ogona.....	72
2.2.1.2. Określenie masy ciała.....	73
2.2.2. Zmodyfikowana skala Racine’a.....	73
2.2.3. Ocena częstotliwości występowania i czasu trwania napadów.....	73
2.2.4. Testy behawioralno-pamięciowe myszy.....	74
2.2.4.1. Test obracającego się wałka.....	74
2.2.4.2. Test koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów....	74
2.2.4.3. Test analizy chodu zwierząt.....	74
2.2.4.4. Test siły mięśniowej „wire-hang”.....	75
2.2.4.5. Test rozpoznawania nowych obiektów.....	75
2.2.4.6. Test lokalizacji obiektu.....	76
2.2.5. Oznaczenia morfologii krwi myszy.....	76
2.2.6. Immunizacja myszy.....	76
2.2.7. Hodowle komórkowe.....	77
2.2.8. Oznaczanie cyklu komórkowego.....	77
2.2.9. Test fagocytozy.....	77
2.2.10. Test migracji fibroblastów.....	78
2.2.11. Test ELISA.....	78
2.2.12. Test immunoenzymatyczny typu „sandwich ELISA” na macierzach przeciwciał (ang.membrane antibody arrays).....	79
2.2.13. Test ELISPOT.....	79
2.2.14. Homogenizacja tkanek.....	80
2.2.15. Oznaczanie białka całkowitego.....	80
2.2.16. Elektroforeza SDS-PAGE.....	80
2.2.17. Western blotting.....	80
2.2.18. Oznaczanie aktywności enzymatycznej kalpain.....	81

2.2.19. Procedury wykonywane na zwierzętach.....	81
2.2.20. Metody analizy statystycznej danych.....	81
3. Wyniki.....	82
3.1. Sposób dziedziczenia mutacji R1098Q.....	82
3.2. Opis fenotypowy myszy.....	82
3.3. Badania morfometryczne heterozygot myszy Spna2R1098Q.....	84
3.3.1. Masa ciała.....	84
3.3.2. Długość całkowita.....	86
3.3.3. Długość tułowia.....	87
3.3.4. Długość ogona.....	88
3.3.5. Stosunek wagi do długości tułowia.....	89
3.3.6. Indeks masy ciała myszy i indeks otyłości Lee.....	90
3.3.7. Masa śledziony i stosunek masy śledziony do wagi myszy.....	91
3.4. Oznaczenie poziomu α -II i β -III spektryny oraz białka GFAP w lizatach mózdkowych myszy R1098Q.....	92
3.4.1. A-II spektryna.....	92
3.4.2. B-III spektryna.....	93
3.4.3. GFAP.....	93
3.5. Oznaczenie aktywności kalpajny w mózdkach, fibroblastach oraz surowicy krwi myszy R1098Q.....	94
3.6. Testy sprawności motorycznej i siły mięśniowej myszy R1098Q:	95
3.6.1. Test obracającego się wałka.....	95
3.6.2. Test koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów.....	98
3.6.3. Test analizy chodu zwierząt.....	100
3.6.4. Test siły mięśniowej „wire-hang”.....	104
3.7. Testy pamięci (przestrzennej) myszy R1098Q:	105
3.7.1. Test rozpoznawania nowych obiektów.....	105
3.7.2. Test lokalizacji obiektu.....	110
3.8. Morfologia krwi myszy Spna2R1098Q.....	112
3.9. Oznaczenie poziomu białek biorących udział w tworzeniu naczyń krwionośnych u myszy R1098Q.....	114
3.10. Ocena zdolności leukocytów krwi i makrofagów otrzewnowych do fagocytozy.....	117

3.11. Ocena wpływu mutacji R1098Q na tempo migracji fibroblastów płodowych.....	118
3.12. Ocena wpływu mutacji R1098Q na cykl komórkowy.....	119
3.13. Ocena odpowiedzi immunologicznej myszy Spna2R1098Q na immunizację owoalbuminą (OVA).....	120
3.13.1. Oznaczenie komórkowości śledzion.....	120
3.13.2. Ocena odpowiedzi humoralnej myszy R1098Q po immunizacji białkiem OVA.....	121
3.13.3. Ocena odpowiedzi komórkowej Th1 myszy R1098Q po immunizacji białkiem OVA.....	123
3.14. Ocena częstotliwości występowania i czasu trwania napadów.....	124
4. Dyskusja	126
5. Wnioski	138
6. Spis rycin	139
7. Spis tabel	141
8. Literatura	142

Streszczenie

W ostatnim czasie identyfikuje się coraz więcej przypadków neuropatii α -II spektrynozależnych. Początkowo mutacje w genie *SPTANI* kodującym α -II spektrynę wiązano z występowaniem ciężkich zespołów spazmów niemowlęcych, wśród których można wymienić wczesne niemowlęce encefalopatie padaczkowe i zespół West'a. Obecnie, do zespołów tych dołączyły dziedziczne neuropatie ruchowe (paraplegie spastyczne lub ataksje). W ogromnej większości przypadków spektrynopathie pozostają odporne na zastosowane leczenie farmakologiczne. Patomechanizmy związane z mutacjami spektryn leżące u podstaw spazmów niemowlęcych są wciąż słabo poznane ze względu na brak zwierzęcych modeli badawczych.

Od chwili zidentyfikowania białek spektryn minęło ponad pół wieku i poza przypisaną im kanoniczną rolę budowy cytoszkieletu odkryto, iż spektryny biorą udział w takich procesach jak: rozwój układu nerwowego (mielinizacja, kształtowanie aksonów i dendrytów, synaptogeneza), przekazywanie sygnałów przez zewnętrzną błonę komórkową, wewnątrzkomórkowy transport białek i pęcherzyków, fagocytoza, kształtowanie odpowiedzi immunologicznej, regulacja cyklu komórkowego, angiogeneza.

Dotychczas uzyskano jedynie kilka modeli zwierzęcych użytecznych w badaniach funkcji α -II spektryny, jednak tylko u dwóch z tych modeli, posiadających nokaut genowy α -II spektryny w obwodowym lub centralnym układzie nerwowym, zaobserwowano występowanie uogólnionych drgawek i napadów spastycznych. Zwierzęta te ze względu na krótki czas życia, wynoszący poniżej jednego miesiąca, nie pozwalają na kompleksową ocenę roli α -II spektryny w patogenezie spektrynopathie w wieku dojrzałym.

Celem pracy doktorskiej był opis fenotypowy myszy *Spna2R1098Q*, posiadającej mutację punktową genu α -II spektryny, jako modelu dla wielu spektrynozależnych ataksji mózdkowych, który mógłby posłużyć do badań nad mechanizmami odpowiedzialnymi za spektrynozależne neuropatie przez cały okres życia osobniczego i dodatkowo pozwoliłby testować nowe terapie tych schorzeń. Co ciekawe, myszy *Spna2R1098Q* są jedynym modelem zwierzęcym, który przejawia fenotyp napadów spazmów oraz zaburzeń motorycznych i pamięciowych, należących do spektrum objawów klinicznych pacjentów cierpiących na neuropatie spektrynozależne. Badania przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego pozwoliły na scharakteryzowanie modelu myszy i wykazanie występowania deficytów motorycznych i pamięciowych. Potwierdzono, iż zaburzenia w α -II spektrynie prowadzą do wtórej utraty β -III spektryny. Stwierdzono także negatywny wpływ mutacji *Spna2R1098Q* α -II spektryny na cechy

morfometryczne, w tym na wielkość śledzion. Nie zaobserwowano różnic w funkcji układu odporności wrodzonej i nabytej myszy Spna2R1098Q pomimo odnotowanego spadku liczby leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej.

Summary

Recently, an increasing number of cases of α -II spectrin-dependent neuropathies have been identified. Initially, mutations in the *SPTAN1* gene encoding α -II spectrin were associated with severe infantile spasms disorders, including early infantile epileptic encephalopathies and West syndrome. Currently, hereditary motor neuropathies (spastic paraplegias or ataxias) have also been added to these disorders. In the vast majority of cases, spectrinopathies remain resistant to pharmacological treatment. The pathomechanisms associated with spectrin mutations underlying infantile spasms are still poorly understood due to the lack of animal research models.

Since the identification of spectrin proteins over half a century ago, it has been discovered that they play a role not only in the canonical function of cytoskeletal structure but also in processes such as the development of the nervous system (myelination, axon and dendrite shaping, synaptogenesis), signal transmission across the cell's external membrane, intracellular transport of proteins and vesicles, phagocytosis, shaping of the immune response, cell cycle regulation, and angiogenesis.

So far, only a few animal models useful for studying the function of α -II spectrin have been obtained, but only in two of these models, which have α -II spectrin gene knockout in the peripheral or central nervous system, have generalized seizures and spastic seizures been observed. These animals, due to their short lifespan of less than one month, do not allow for the assessment of the role of α -II spectrin in mature individuals.

The aim of the doctoral thesis was to provide a phenotypic description of Spna2R1098Q mice, which carry a point mutation in the α -II spectrin gene. These mice serve as a model for various spectrin-dependent cerebellar ataxias and could be used to study the mechanisms responsible for spectrin-dependent neuropathies throughout an individual's lifespan. Additionally, this model allows for testing new therapies for these disorders. Interestingly, Spna2R1098Q mice are the only animal model that exhibits a phenotype of spasms and motor and memory impairments, which are part of the clinical spectrum observed in patients suffering from spectrin-dependent neuropathies. Research conducted as part of the doctoral project allowed for the characterization of the mouse model and demonstrated the presence of motor and memory deficits. It was confirmed that disruptions in α -II spectrin lead to the secondary loss of β -III spectrin. Negative effects of the Spna2R1098Q α -II spectrin mutation on morphometric characteristics, including spleen size, were also observed. No differences were observed

in the function of the innate and acquired immune systems in Spna2R1098Q mice, despite a decrease in the number of leukocytes and lymphocytes in peripheral blood.

Wykaz skrótów

Abi1	ang. Abelson interactor 1 pl. interaktor Abelson'a 1
ACTN4	ang. actinin alpha 4 pl. aktylina alfa 4
AE1	ang. anion exchanger 1 pl. wymiennicz anionowy 1
AIS	ang. axon initial segment pl. początkowy segment aksonu
Akt	ang. protein kinase B pl. kinaza białkowa B
AMPARs	ang. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors pl. receptory kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego
ANOVA	ang. analysis of variance pl. analiza wariancji
APC	ang. antygen presenting cell pl. komórka prezentująca antygen
APS	ang. ammonium persulfate pl. nadsiarczan amonu
Arp1	ang. actin related protein 1) pl. białko spokrewnione z aktyna 1
Arp2/3	ang. actin-related protein 2/3 complex pl. kompleks białek związanych z aktyną 2/3
ARX	ang. Aristaless related homeobox pl. homeobox powiązany z Aristaless
ATF-4	ang. activating transcription factor 4 pl. czynnik aktywujący transkrypcję 4
Bax	ang. BCL2 associated X pl. białko X związane z BCL2
BOS	ang. base of support pl. rozstaw łap
Brk	ang. breast tumor kinase pl. kinaza nowotworu piersi
CaM	ang. calmodulin

	kalmodulina
CD2	ang. cluster of differentiation 2 pl. klaster różnicowania komórkowego 2
CD3	ang. cluster of differentiation 3 pl. klaster różnicowania komórkowego 3
CD8	ang. cluster of differentiation 8 pl. klaster różnicowania komórkowego 8
CD11a	ang. cluster of differentiation 11a pl. klaster różnicowania komórkowego 11a
CD44	ang. cluster of differentiation 44 pl. klaster różnicowania komórkowego 44
CD44	ang. cluster of differentiation 44 pl. klaster różnicowania komórkowego 44
CD45	ang. cluster of differentiation 45 pl. klaster różnicowania komórkowego 45
CD148	ang. cluster of differentiation 148 pl. klaster różnicowania komórkowego 148
Cdc42	ang. cell division control protein 42 pl. białko kontrolujące podziały komórkowe 42
CDK4	ang. cyclin-dependent kinase 4 pl. zależna od cykliny kinaza 4
CDK6	ang. cyclin-dependent kinase 6 pl. zależna od cykliny kinaza 6
CHL1	ang. close homolog of L1; neural cell adhesion molecule L1-like protein pl. białko bliskiego homologu L1; cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych podobna do białka L1
CRC	ang. colorectal cancer pl. rak jelita grubego
CSK2	ang. C-terminal Src kinase pl. C-końcowa kinaza Src
c-Src	ang. cellular Src pl. komórkowa Src
CTNNA1	ang. catenin alpha 1 pl. alfa-katenina
CX3CL1	ang. C-X3-C motif chemokine ligand 1 pl. ligand chemokinowy z motywem C-X3-C

CX3CR1	ang. C-X3-C motif chemokine receptor 1 pl. receptor chemokin z motywem C-X3-C
Cyr61	ang. cysteine-rich angiogenic inducer 61 pl. induktor angiogeny bogaty w cysteinę
DEE	ang. developmental epileptic encephalopathy pl. rozwojowa encefalopatia padaczkowa
DLX5/6	ang. distal-less homeobox genes 5/6 pl. geny homeoboxu mniej dystalnego 5/6
DMEM	ang. Dulbecco's modified Eagle medium pl. medium Eagle'a zmodyfikowane przez Dulbecco
EAAT4	ang. excitatory amino acid transporter 4 pl. transporter pobudzających aminokwasów typu 4
EDTA	ang. ethylenediaminetetraacetic acid pl. kwas etylenodiaminotetraoctowy
EEG	pl. elektroencefalografia
EIEE	ang. early infantile epileptic encephalopathy pl. wczesna niemowlęca encefalopatia padaczkowa
EIEE5	ang. early infantile epileptic encephalopathy type 5 pl. wczesna niemowlęca encefalopatia padaczkowa typu 5
ELF	ang. embryonic liver fodrin pl. embrionalna fodryna wątrobowa
EME	ang. early myoclonic encephalopathy pl. wczesna encefalopatia miokloniczna
Ena/VASP	ang. enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein pl. fosfoproteina aktywowana/stymulowana rozszerzeniem naczyń krwionośnych
eNOS	ang. endothelial nitric oxide synthase pl. śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
EOEE	ang. early onset epileptic encephalopathy pl. encefalopatia padaczkowa o wczesnym początku
ERK1/2	ang. extracellular signal-regulated kinases pl. kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
EVL	ang. enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein pl. białko podobne do fosfoproteiny aktywowanej/stymulowanej rozszerzeniem naczyń krwionośnych
FA	ang. Fanconi anemia proteins

FANCA	pl. białko związane z niedokrwistością Fanconi'ego ang. Fanconi anaemia complementation group A pl. białko związane z niedokrwistością Fanconi'ego należące do grupa komplementacji A
FANCG	ang. Fanconi anemia complementation group G pl. białko związane z niedokrwistością Fanconi'ego należące do grupa komplementacji G
FBS	ang. fetal bovine serum pl. płodowa surowica bydłęca
GJA1	ang. gap-junction protein alpha 1 pl. białko alfa połączeń szczelinowych 1
HA	ang. hereditary ataxia pl. dziedziczna ataksja
HC	ang. hair cells pl. komórki rzęsate
HCC	ang. hepatocellular carcinoma pl. rak wątrobowokomórkowy
HMEC-1	ang. human dermal microvascular endothelial cell pl. ludzkie komórki śródbłonna mikronaczyniowego skóry
HSP	ang. hereditary spastic paraplegia pl. dziedziczna paraplegia spastyczna
hTRPC4	ang. human transient receptor potential channel 4 pl. przejściowy potencjał receptora kanału ludzkiego 4
HUVEC	ang. human umbilical vein endothelial cell pl. ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej
ICAM-1/2	ang. intercellular adhesion molecules pl. cząsteczka adhezji międzykomórkowej
IS	ang. infantile spasm pl. spazmy niemowlęce
ITAMs	ang. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs pl. motywy aktywacyjne immunoreceptora oparte na tyrozynie
JNK	ang. c-Jun N-terminal kinase pl. N-końcowa kinaza c-Jun
LFA-1	ang. lymphocyte function-associated antigen 1 pl. antygen 1 związany z funkcją limfocytów
LMW	ang. low molecular weight

	pl. niska masa cząsteczkowa
LTP	ang. long-term potentiation pl. długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
Lu/BCAM	ang. Lutheran protein/basal cell adhesion molecule pl. białko Lutheran / cząsteczka adhezyjna komórek podstawnych
MAD1	ang. membrane association domain pl. domena wiążąca błonę
MCAM	ang. melanoma cell adhesion molecule pl. cząsteczka adhezyjna komórek czerniaka
MCH	ang. mean corpuscular hemoglobin, mean cell hemoglobin pl. średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej
MCHC	ang. mean corpuscular hemoglobin concentration pl. średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej
MCV	ang. mean corpuscular volume pl. wskaźnik średniej objętości krwinek
MEK	ang. mitogen activated protein kinase kinase pl. kinaza kinazy białkowej aktywowanej mitogenem
Mena/VASP	ang. mammalian enabled vasodilator-stimulated phosphoprotein pl. ssaczych fosfoprotein aktywowanych/stymulowanych rozszerzeniem naczyń krwionośnych
mIPSC	ang. miniature inhibitory postsynaptic currents pl. miniaturowe hamujące prądy postsynaptyczne
MLH1	ang. MutL homolog 1 pl. homolog MutL 1
MMP-1	ang. matrix metalloproteinase-1 pl. metaloproteinaza macierzy-1
MMP-3	ang. matrix metalloproteinase-3 pl. metaloproteinaza macierzy-3
MPP-1	ang. membrane palmitoylated protein 1 pl. białko palmitoilowane błony 1
MPS	ang. membrane-associated periodic skeleton pl. szkielet okresowo związany z błoną
MPV	ang. mean platelet volume pl. średnia objętość płytek krwi
NCAM	ang. neural cell adhesion molecule pl. cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych

NF-κB	ang. nuclear factor kappa B pl. czynnik jądrowy kappa B
NIK	ang. NF-κB-inducing kinase pl. kinaza indukująca NF-κB
OHC	ang. outer hair cells pl. komórki rzęsaty zewnętrzne
OPN	ang. osteopontin pl. osteopontyna
OS	ang. Ohtahara syndrome pl. zespół Ohtahara'y
PAI-1	ang. plasminogen activator inhibitor pl. inhibitor aktywatora plazminogenu
PCT	ang. platelet pl. hematokryt płytkowy
PDE4D4	ang. phosphodiesterase 4D pl. fosfodiesteraza D4
PDW	ang. platelet distribution width pl. zróżnicowanie objętości płytek krwi
PEHO	ang. progressive encephalopathy with edema, hypersarrhythmia, and optic atrophy pl. postępująca encefalopatia z obrzękiem, hipsarytmią i zanikiem nerwu wzrokowego
PGE2	ang. prostaglandin E2 pl. prostaglandyna E2
PI(4,5)P2	ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate pl. 4,5-bifosforanu fosfatydyloinozytolu
PI3K	ang. phosphoinositide 3-kinase pl. 3-kinaza fosfoinozytydu
PI4P	ang. phosphatidylinositol-4-phosphate pl. 4-fosforan fosfatydyloinozytolu
PKA	ang. protein kinase A pl. kinaza białkowa A
PMEC	ang. pulmonary microvascular endothelial cells pl. komórki śródbłonna mikronaczyniowego płuc
PMSF	ang. phenylmethylsulfonyl fluoride pl. fluorek fenylometylosulfonylu

PVDF	pl. poli(fluorek winylidenu)
Rb	ang. retinoblastoma protein pl. białko siatkówcza
RDW	ang. red blood cell distribution width pl. zróżnicowanie objętości krwinek czerwonych
receptor NMDA	ang. N-methyl-D-aspartate receptor pl. receptor N-metylo-D-asparaginowy
region CCC	ang. calpain, calmodulin, caspase pl. miejsce oddziaływania kalpajny, kalmoduliny i kaspazy
ROCK	ang. Rho-associated protein kinase pl. białkowa kinaza związana z Rho
SCA5	ang. spinocerebellar ataxia type 5 pl. ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 5
SDS	pl. siarczan dodecyłu sodu
SH3	ang. Src homology 3 pl. homologia Src 3
SMAD	ang. suppressor of mothers against decapentaplegic pl. supresor matek przeciwko dekapentaplegii
SPF	ang. specific patogen free pl. wolne od określonych patogenów
SPH2	ang. hereditary spherocytosis type 2 pl. dziedziczna sferocytoza typu 2
SPH3	ang. hereditary spherocytosis type 3 pl. dziedziczna sferocytoza typu 3
Src	ang. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src pl. protoonkogenna kinaza tyrozynowa Src
TCR	ang. T-cell receptor pl. receptor limfocytów T
TEMED	pl. N, N, N', N'-tetrametyloetylenodiamina
TGF- β	ang. transforming growth factor β pl. transformujący czynnik wzrostu β
TJP1	ang. tight junction protein 1 pl. białko ścisłych połączeń 1
TMB	pl. 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna
Tris	pl. tris(hydroksymetylo)aminometan
Tsc1	ang. tuberous sclerosis 1

	pl. stwardnienie guzowate 1
VASP	ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein pl. fosfoproteina stymulowana rozszerzeniem naczyń
VCL	ang. vinculin pl. winkulina
VEGF	ang. vascular endothelial growth factor pl. czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
VEGFR2	ang. vascular endothelial growth factor receptor 2 pl. receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego 2
VE-kadheryna	ang. vascular endothelial cadherin pl. kadheryna śródbłonna naczyniowego
VGSC	ang. voltage-gated sodium channels pl. kanały sodowe bramkowane napięciem
WASP	ang. Wiskott–Aldrich Syndrome protein pl. białka zespołu Wiskott’a–Aldrich’a
WAVE	ang. WASP-family verprolin-homologous protein pl. białko z rodziny WASP homologiczne do werproliny
WS	ang. West syndrome pl. zespół West’a
XPF	ang. Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein pl. białko związane z skórą pergaminowata i barwnikową należące do grupa komplementacji F
YAP/TAZ	ang. Yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif pl. białko związane z Yes/koaktywator transkrypcyjny z motywem wiążącym PDZ
ZO-1	łac. zonula occludens 1 pl. połączenie ściste 1

1. Wprowadzenie.

1.1. Spektryny.

Spektryna została po raz pierwszy opisana w roku 1968 przez Marchesi'ego i Steers'a (**Marchesi i Steers 1968**). Pierwotnie została zidentyfikowana jako podstawowy białkowy składnik cytoszkieletu i błony erytrocytów na podstawie jej roli w strukturze i elastyczności erytrocytów. Według obecnego stanu wiedzy zwierzęce spektryny są kodowane przez 7 genów i w komórkach jądrzastych mogą ulegać ekspresji w kilku izoformach. Dwa geny kodują α spektryny – α -I spektryna (SPTA1, 1q23.1, 1 izoforma) i α -II spektryna (*SPTANI*, 9q34.11, 5 izoform). Pozostałe 5 genów koduje β spektryny – β -I spektryna (SPTB, 14q23.3, 2 izoformy), β -II spektryna (SPTBN1, 2p16.2, 4 izoformy), β -III spektryna (SPTBN2, 11q13.2, 1 izoforma), β -IV spektryna (SPTBN4, 19q13.2, 6 izoform) i β -V spektryna (SPTBN5, 15q15.1, 1 izoforma) (**Morrow, Stankewich 2021; Wang i in. 2018; Saitsu i in. 2010; Tohyama i in. 2015; Huang i in. 2017**). Przyczyną występowania wielu rodzajów spektryn jest różna ekspresja oraz łączenie się α i β spektryn w różne kombinacje, specyficzne dla danego typu komórek lub kompartmentu komórkowego bądź etapu rozwojowego. Inaktywacja genów kodujących spektryny u *Drosophila melanogaster* lub u *Caenorhabditis elegans* wykazała, że białka te są niezbędne do przeżycia i prawidłowego rozwoju tych organizmów (**Machnicka i in. 2020; Machnicka i in. 2019; Machnicka i in. 2012**).

1.1.1. Budowa spektryn jako białek cytoszkieletu komórkowego.

Spektryny zbudowane są z ciągu charakterystycznych powtórzeń nazywanych powtórzeniami spektrynowymi (podstawowy element strukturalny), które są złożone z motywów potrójnej helisy. Kompleksy spektryny są długimi i elastycznymi białkami składającymi się z dwóch podjednostek α i β spektryny, które łączą się ze sobą antyrównolegle tworząc heterodimery, a te z kolei formują tetrametry typu koniec do końca (głowa do głowy), które gromadzą się na błonie plazmatycznej i integrują się z cytoszkieletem błony (**Syrbe i in. 2017; Saitsu i in. 2010; Huang i in. 2017; Tohyama i in. 2015; Rapaccini i in. 2018; Hamdan i in. 2012; Stankewich i in. 2011; Benz i in. 2008**). Liczba powtórzeń spektrynowych wynosi 20 w α spektrynach, 16-17 w β spektrynach i wyjątkowo 29-30 dla β -V spektryny. Zaś długość powtórzeń mieści się w zakresie od 99 do 114 reszt aminokwasowych. Cztery ostatnie powtórzenia spektrynowe α spektryny i cztery pierwsze powtórzenia spektrynowe β spektryny są zaangażowane w asocjację podjednostek α/β spektryny i tworzenie heterodimerów oraz tetramerów, a także w wiązanie szkieletu spektrynowego z dwuwarstwą lipidową błony.

Motywami opartymi na strukturze powtórzenia spektrynowego są domena wiążąca ankiryne (w obrębie 14 i 15 powtórzenia), domena wiążąca β -spektrynę oraz miejsce oligomeryzacji α/β spektryny. Dodatkowo w spektrynach występują domeny nieoparte na powtórzeniu spektrynowym jak domena wiążąca aktyne, dłoni EF (odpowiedzialna za wiązanie wapnia, co powoduje zmiany konformacyjne istotne dla integralności szkieletu), homologiczna do plekstryny, homologia Src 3 (SH3 – ang. Src homology 3; Src – ang. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; zaangażowana w sygnalizację komórkową poprzez interakcję z odcinkami bogatymi w prolinę) oraz region CCC (ang. calpain, calmodulin, caspase; będący miejscem wiązania kalmoduliny oraz cięcia przez kaspazy i kalpainy). W przypadku α -II spektryny domena SH3 jest umiejscowiona w 9 powtórzeniu, a region CCC w 10 powtórzeniu spektrynowym. Tetramery spektrynowe są sieciowane za pomocą krótkich poprzecznych włókien aktynowych poprzez domeny wiążące aktyne. Łańcuchy β spektryny mogą również występować jako kompleksy homopolimerowe w mięśniach szkieletowych i prawdopodobnie w aparacie Golgiego (Machnicka i in. 2019; Machnicka i in. 2012; Machnicka i in. 2014).

1.1.2. Występowanie.

Ze względu na pełnione funkcje i jako główny składnik cytoszkieletu spektryny występują powszechnie niemal we wszystkich komórkach zwierzęcych. Wykazano, że spektryny są zlokalizowane we wszystkich regionach i typach komórek mózgu oraz w komórkach neuronalnych i neurosensorycznych ekspresji ulega 6 z 7 rodzajów spektryn (Morrow, Stankewich 2021; Govindaraj, Rao 2016; Wang i in. 2018). Alfa spektryna jest niezbędna do wiązania beta spektryny oraz β spektryna ulega degradacji, jeśli nie jest złożona z α -spektryną (Morrow, Stankewich 2021; Wang i in. 2018). A-I spektryna razem z β -I spektryną występuje prawie wyłącznie w komórkach erytroidalnych, natomiast α -II spektryna jest zasadniczą spektryną ulegającą ekspresji w większości komórek eukariotycznych (nierytroidalnych) i tkanek (głównie w korze skroniowej i mózdzku). A-II spektryna jest wszechobecna w komórkach neuronalnych lub neurosensorycznych i nie jest ograniczona do konkretnego przedziału w tych komórkach (występuje zarówno w dendrycie, somie jak i aksonie) oraz jest jedynym partnerem dla β spektryn w układzie nerwowym. W przypadku zaburzeń α -II spektryna nie dochodzi do kompensacji ze strony α -I spektryny. B-I spektryna występuje w II i V warstwie korowej, zagęszczeniu postsynaptycznym komórek ziarnistych mózdzku, interneuronach oraz pęcherzykach transportujących. B-II spektryna jest głównie zlokalizowana w zakończeniach presynaptycznych, szkielecie neuronalnym, ulegających mielinizacji komórkach Schwanna, aksonach i dystalnych domenach aksonalnych. B-III spektryna jest obecna w I, III, IV i VI warstwie neuronów korowych, zagęszczeniu postsynaptycznym komórek Purkiniego, wierzchołkach i kolcach dendrytycznych oraz w regionie somatodendrytycznym, a także

w aparacie Golgiego, błonie plazmatycznej i pęcherzyków transportujących. Przedostatnia β -IV spektryna znajduje się w węzłach Ranviera, aksonie i początkowym segmencie aksonów (AIS – ang. axon initial segment). Ostatnia β -V spektryna jest obecna w fotoreceptorach, spiralnym zwoju nerwowym ucha wewnętrznego oraz komórkach rzęsatych zewnętrznych (OHC - ang. outer hair cells). W neuronach stwierdzono brak obecności α -I spektryny (**Morrow, Stankewich 2021; Wang i in. 2018; Saitsu i in. 2010; Tohyama i in. 2015; Van de Vondel i in. 2022; Huang i in. 2017; Machnicka i in. 2020; Machnicka i in. 2019; Machnicka i in. 2012**).

1.1.3. Ogólna rola spektryn.

Kanoniczna rola spektryny polega na sieciowaniu włókien i pierścieni aktynowych oraz wiązaniu się bezpośrednio lub przy pomocy białek adaptorowych (np. ankiryne) z błonami biologicznymi i lipidami błonowymi, będąc istotnym ogniwem pomiędzy cytoszkieletem aktynowym a błoną oraz dając początek szkieletowi okresowo związanemu z błoną (MPS – ang. membrane-associated periodic skeleton), który jest obecny w różnych tkankach m. in. w gleju i komórkach nerwowych. Okazało się, że poza odgrywaniem klasycznej roli głównego składnika szkieletu błony, pełnią też inne często zróżnicowane funkcje biologiczne. To jak odmienne role pełnią spektryny najlepiej widać na przykładzie układu nerwowego. Spektryny są zaangażowane w utrzymanie prawidłowej architektury, polaryzacji, kształtu i morfologii komórek oraz odpowiadają za integralność, właściwości mechaniczne (elastyczność i wytrzymałość) i stabilność błon komórkowych. Odpowiadają za prawidłowe rozmieszczenie (grupowanie) i regulację białek, receptorów, transporterów czy też kanałów w wyspecjalizowanych obszarach błony plazmatycznej, np. synapsach. Uczestniczą w procesie adhezji i migracji. Modyfikują cykl komórkowy. Łącząc się z kinezyną, dynaktyną i miozyną oraz stabilizując aparat Golgiego i siateczkę śródplazmatyczną biorą udział w transporcie wewnątrzkomórkowym w szlakach sekrecyjnych i endocytarnych, w tym w transporcie aksonalnym. Współuczestniczą w rozwoju, wzroście i przebudowie neuronów. Stanowią wielowartościowe rusztowanie dla interakcji białko-białko jak również w interakcjach komórka-komórka w celu uporządkowania powiązanych z błoną kompleksów sygnalizacyjnych i wchodzi w mnogą liczbę bezpośrednich lub pośrednich interakcji z wieloma szlakami biologicznymi. Spektryny odgrywają istotną rolę w sygnalizacji komórkowej. Są zaangażowane w procesy odpornościowe. Dodatkowo biorą udział w procesie apoptozy oraz naprawy DNA. Poza tym ich różnorodne funkcje są regulowane na skutek modyfikacji potranslacyjnych (**Morrow, Stankewich 2021; Saitsu i in. 2010; Lubbers i in. 2019; Wang i in. 2018; Van de Vondel i in. 2022; Hamdan i in. 2012; Machnicka i in. 2012**).

Nieprawidłowości rozumiane jako niedobory lub defekty spektryn prowadzą do szeregu neuropatii. Choroby wywołane zmianami w spektrynach nazywamy spektrynopatiami. Pierwsze trzy geny β -spektryny (SPTBN1, SPTBN2 i SPTBN4), a zwłaszcza β -III spektryna, są odpowiedzialne za wiele zaburzeń neurologicznych, w zależności od genu i wzorca dziedziczenia. Stwierdzono, że zmiany w β -I spektrynie prowadzą do autyzmu, problemów w uczeniu i zwyrodnienia rdzenia kręgowego. Na skutek delecji β -II spektryny dochodzi do letalnej dla embrionu utraty macierzystych komórek nerwowych w strefie podkomorowej, aczkolwiek heterozygoty pod względem neurologicznym wydają się normalne, chociaż mają zwiększoną szansę na rozwój raka przewodu pokarmowego i wątroby (**Morrow, Stankewich 2021**). Uszkodzenie α -I i β -I spektryny erytroidalnej jest podłożem dziedzicznej sferocytozy (SPH2 i SPH3 – ang. hereditary spherocytosis type 2 and 3) (**Saitsu i in. 2010; Tohyama i in. 2015; Stankewich i in. 2011**). Nieprawidłowości w neuronalnej β -III spektrynie skojarzono z występowaniem ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 5 (SCA5 – ang. spinocerebellar ataxia type 5) u ludzi oraz ataksji i drgawek u myszy (**Saitsu i in. 2010; Tohyama i in. 2015; Stankewich i in. 2011**). Efektem zmian w β -IV spektrynie mogą być wrodzone miopatie, ataksja, neuropatia lub głuchota (**Morrow, Stankewich 2021**). Mutacje w α -II spektrynie mogą prowadzić do występowania zespołu West'a (WS – ang. West syndrome), wczesnej niemowlęcej encefalopatii padaczkowej typu 5 (EIEE5 – ang. early infantile epileptic encephalopathy type 5), dziedzicznej paraplegii spastycznej (HSP – ang. hereditary spastic paraplegia) lub dziedzicznej ataksji (HA – ang. hereditary ataxia). Podczas wielu urazów i chorób układu nerwowego (w tym przy udarze) zaobserwowano podwyższoną degradację spektryny zależną od kalpajny, a rozpad spektryny może być patologicznym molekularnym wskaźnikiem urazów i chorób neurodegeneracyjnych (**Morrow, Stankewich 2021; Morsy i in. 2023; Saitsu i in. 2010; Tohyama i in. 2015; Stankewich i in. 2011; Huang i in. 2017; Benz i in. 2008**).

1.1.4. α -II spektryna.

Gen *SPTANI* zmapowany u ludzi w pozycji 9q33-q34 i złożony z 57 eksonów, koduje białko cytoszkieletu α -II spektrynę nieerytrocytarną o masie 285 kDa i długości 2472 aminokwasów, które uległa ekspresji przede wszystkim w komórkach nieerytroidalnych. Białko α -II spektryna składa się z 22 domen - 20 powtórzeń spektrynowych, domeny SH3 i domeny dłoni EF (**Syrbe i in. 2017; Morrison-Levy i in. 2020; Wang i in. 2018; Saitsu i in. 2010; Hamdan i in. 2012; Campbell i in. 2012; Mastrangelo i Leuzzi 2012; Stankewich i in. 2011; Van de Vondel i in. 2022; Benz i in. 2008**).

Warto zauważyć, że α -II spektryna tworzy funkcjonalny heterotetrameryczny kompleks z jedną z czterech nieerytrocytarnych β spektryn poprzez heterotetrameryzację dwóch podjednostek α

i dwóch podjednostek β (Morsy i in. 2023; Van de Vondel i in. 2022; Marco Hernández i in. 2022). Zasadniczą spektryną ulegającą ekspresji w komórkach nieerytroidalnych jest α -II spektryna, a najczęstszym heterodimerem tworzonym przez α -II spektrynę jest heterodimer α -II/ β -II spektryna (Saitsu i in. 2010; Tohyama i in. 2015). Podjednostką α spektryny w układzie nerwowym jest zawsze α -II spektryna, podczas gdy skład kompleksu spektrynowego pod względem β spektryny może się różnić w zależności od typu komórki, a nawet jej lokalizacji subkomórkowej (Wang i in. 2018; Van de Vondel i in. 2022). Rozmieszczenie α -II spektryny w neuronach korowych pokrywa się z rozmieszczeniem β -II i β -III spektryny oraz głównie lokuje się w rozszerzeniach i obrzeżach neuronów (Saitsu i in. 2010). α -II spektryna jest wszechobecna we wszystkich domenach neuronów (aksonie, AIS, dendrycie i somie), aczkolwiek jej ekspresja w dendrytach jest wyższa niż w aksonach. Szeroki rozkład α -II spektryny w neuronach jest zatem wiarygodnym wyjaśnieniem plejotropowych konsekwencji występowania mutacji genu *SPTANI*. Zaburzenia mogą być wypadkową wynikającą bezpośrednio ze zmian spowodowanych w α -II spektrynie i pośrednio przez wywołanie zaburzeń w β spektrynach oraz tworzeniu heterodimeru (Wang i in. 2018; Morsy i in. 2023). Utrata α -II spektryny prowadzi do jednoczesnej utraty lub niestabilności dwóch spektryn β i wybranych ankiryń, ale nie wpływa na kształt, stabilność lub morfologię komórek nabłonka, ani nie jest wymagana do przeżycia komórek (Hamdan i in. 2012; Stankewich i in. 2011). Fizjologiczne rozmieszczenie α i β spektryn w ludzkich fibroblastach jest mniej więcej równomierne (Syrbe i in. 2017). Ekspresję *SPTANI* wykazano również w siatkówce (Writzl i in. 2012). Sama haploinsuficjencja *SPTANI*, czyli sytuacja, gdy jeden zmutowany allel wystarcza by wywołać chorobę lub gdy prawidłowy allel nie jest w stanie zapobiec rozwojowi choroby spowodowanej mutacją i utratą funkcji przez drugi allel, nie prowadzi do rozwoju WS jak również EIEE5 z rozległą atrofią mózgu, zwłaszcza hipoplazją mostowo-mózdkową, hipomielinizacją oraz ogólną padaczką. Bardziej negatywny efekt i określone fenotypy zależą od rodzaju i miejsca mutacji oraz wynikającej z tego zaburzenia funkcji białka niż z samej haploinsuficjencji (Nicita i in. 2015; Tohyama i in. 2015). Brak α -II spektryny w czasie rozwoju zarodkowego okazał się śmiertelny dla myszy (Stankewich i in. 2011) i danio pręgowanego (Voas i in. 2007) już na etapie embionalnym lub larwalnym (Huang i in. 2017).

1.1.4.1. Funkcje α -II spektryny.

Heterodimer spektryny utworzony przez α -II spektrynę oraz dowolną β spektrynę jest zaangażowany w szereg procesów komórkowych. Białko α -II spektryny jest jednym z elastycznych i niezbędnych białek cytoszkieletu oraz szkieletu błon, gdzie pełni rolę rusztowania stabilizującego, organizującego i wspierającego m. in. błony komórkowe, białka błonowe, organella wewnątrzkomórkowe, aktywację receptorów, kanałów błonowych

i transporterów. Odpowiada za kształt i morfologię komórek (Syrbe i in. 2017; Writzl i in. 2012; Morsy i in. 2023; Tohyama i in. 2015; Stankewich i in. 2011; Marco Hernández i in. 2022; Ackermann i in. 2019; Govindaraj i Rao 2016). Udowodniono, iż pełni istotną rolę w prawidłowym rozwoju, utrzymaniu integralności oraz reguluje stabilność aksonów i dendrytów. Bierze udział w synaptogenezie i łączy ze sobą przewężenia Ranviera. W badaniach z użyciem danio przegowanego jako modelu wykazano, iż białko to pełni kluczową rolę w prawidłowym procesie mielinizacji, rozwoju przewężeń Ranviera, stabilizacji oraz grupowaniu kanałów jonowym, m.in. kanałów sodowych bramkowanych napięciem (VGSC – ang. voltage-gated sodium channels) w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym (Syrbe i in. 2017; Writzl i in. 2012; Morsy i in. 2023; Saitsu i in. 2010; Nicita i in. 2015; Tohyama i in. 2015; Aravindhhan i in. 2018; Stankewich i in. 2011; Marco Hernández i in. 2022; Govindaraj i Rao 2016). Jest wymagana do normalnej ekspresji, lokalizacji i funkcji kanałów sodowych i potasowych bramkowanych napięciem Nav1.5 i KV4.3 w kardiomiocytach serca myszy, tym samym jest wymagana do prawidłowej struktury i funkcji serca, ponieważ dorosłe myszy pozbawione α -II spektryny wykazują zmniejszoną kurczliwość (Lubbers i in. 2019). Razem z β -II spektryną i ankyryną B odgrywa bardzo ważną rolę w tworzeniu i nadzorowaniu pozycji AIS, jego długości oraz integralności (Syrbe i in. 2017; Govindaraj i Rao 2016; Lubbers i in. 2019; Huang i in. 2017). W neuronach kompleksy spektrynowe biorą udział w presynaptycznym uwalnianiu pęcherzyków poprzez interakcję z syntaksynami oraz rozmieszczeniu receptorów glutaminianu w zagęszczeniach postsynaptycznych (Marco Hernández i in. 2022). A-II spektryna jest również zaangażowana w takie procesy komórkowe jak regulacja cyklu komórkowego, naprawa DNA oraz transport wewnątrzkomórkowy (Stankewich i in. 2011; Govindaraj i Rao 2016). Do innych zadań α -II spektryny należy tworzenie i utrzymywanie wyspecjalizowanych domen błony plazmatycznej definiujących polaryzację komórek w nabłonku, mięśniach i neuronach. Reguluje szlaki endocytozy, mikropinocytozy i sekrecji oraz selekcja ładunku (Stankewich i in. 2011). Wpływa na żywotność, ruchliwość i adhezję komórek oraz komunikację międzykomórkowa (Ackermann i in. 2019). A-II spektryna jest miejscem w którym zbiegają się szlaki przekazywania sygnałów za pośrednictwem kinazy wapniowej lub kinazy i fosfatazy tyrozynowej, a więc ma udział w sygnalizacji komórkowej (Stankewich i in. 2011;). Te plejotropowe funkcje α -II spektryny prawdopodobnie odzwierciedlają jej różne role w zależności od typu komórki i tego, z którą neuronalną β spektryną jest ona powiązana (Huang i in. 2017).

A-II spektryna współpracuje z β -IV spektryną tworząc okresowy cytoszkielet w AIS i przewężeniach Ranviera, zaś w dystalnym aksonie oddziałuje z β -II spektryną. Dlatego utrata α -II spektryny ma szeroki wpływ na organizację cytoszkieletu aksonalnego. AIS pełnią dwie główne funkcje: inicjowanie potencjałów czynnościowych i regulowanie polaryzacji neuronów.

Neurony pozbawione lub ze zmutowaną α -II spektryną wykazują utratę lub zmianę długości AIS, odmienny rozwój dendrytów i aksonów, osłabienie unerwienia hamującego, obniżenie ekspresji wszystkich β spektryn oraz zaburzony rozkład β -II i β -III spektryny oraz ankiryne w komórce, ale bez wpływu na zdolność migracji. Delecja α -II spektryny sprawia, że neurony prezentują zaburzoną morfologię i brak właściwej organizacji (lokalizacji) w warstwach korowych. Są pozbawione dendrytu wierzchołkowego (drzewka apikalnego), z kolei ich drzewko bazalne przybiera postać pojedynczego, krótkiego i pogrubionego (przerośniętego) wyrostka z bujnymi małymi odgałęzieniami (Wang i in. 2018; Huang i in. 2017; Stankewich i in. 2011). Heterodimery zmutowanej α -II spektryny z β -II spektryną są termolabilne i mniej stabilne, przez co wpływają na stabilność białek błonowych w AIS, np. ankiryne G bądź VGSC oraz transport wewnątrzkomórkowy. Delecja lub agregacja heterodimerów zmutowanej α -II spektryny z β -II lub β -III spektryną zaburza dystrybucję i gęstość VGSC w AIS, co prowadzi do podwyższenia progu i upośledza utrzymanie potencjału czynnościowego. Delecja α -II spektryny prowadzi do utraty lub pokaźnej redukcji liczby oraz długości dendrytów, upośledza tworzenie AIS, zakłóca polaryzację i pobudliwość neuronów (Saitsu i in. 2010). Ważnym organizatorem AIS jest również ankiryne wiążąca się z 14 i 15 powtórzeniem spektrynowym β -IV spektryny, która rekrutuje białka specyficzne dla tego regionu. Mutacje lub utrata α -II spektryny bądź rozpad kompleksu α II/ β IV spektryny zakłóca wiązanie ankiryne. Utrata funkcji przez β -III spektrynę skutkuje zwężeniem dendrytów. Przypuszczalny mechanizm padaczki jest związany z zaburzeniem hamowania przewodnictwa korowych neuronów piramidalnych, czego efektem jest nadpobudliwość. Wyciszenie α -II spektryny w neuronach zmniejsza częstotliwość i zwiększa amplitudę miniatury hamujących prądów postsynaptycznych (mIPSC – ang. miniature inhibitory postsynaptic currents) oraz prowadzi do wadliwego unerwienia GABA-ergicznego (Wang i in. 2018; Stankewich i in. 2011). Nieprawidłowa integralność AIS spowodowana mutacją w α -II spektrynie dodatkowo podkreśla znaczenie rusztowań AIS w patogenezie padaczki i dostarcza nowych spostrzeżeń dla WS. Powyższe dane pokazują szerokie znaczenie α -II spektryny i cytoszkieletu spektrynowego dla funkcji i rozwoju układu nerwowego oraz mają ważne implikacje dla urazów i chorób układu nerwowego, ponieważ rozerwanie cytoszkieletu spektryny jest powszechną patologią molekularną, a utrata spektryny α -II powoduje rozległe nieprawidłowości OUN, które mogą wynikać z zakłóceń w budowie i potencjałach AIS, zaburzeń drzewka dendrytycznego i nieprawidłowego migracji neuronów do ich właściwych lokalizacji (Wang i in. 2018; Saitsu i in. 2010; Stankewich i in. 2011; Huang i in. 2017).

Wspomniane funkcje α -II spektryny wskazują, iż cytoszkielet spektrynowy odgrywa bardzo ważną rolę w różnych typach komórek układu nerwowego, stąd mutacje w genie *SPTAN1* mają dominujący negatywny wpływ na neurony i mogą skutkować szerokim spektrum neurologicznym

i rozwojem istotnych zaburzeń neurologicznych. Mutacje w *SPTANI* (zwłaszcza duplikacje i delecje) powiązane z wczesnoniemowlęcą encefalopatią padaczkową typu 5 (EIEE5), zespołem West'a (WS), niemowlęcymi spazmami (IS – ang. infantile spasm) i zespołem Ohtahara'y (OS – ang. Ohtahara syndrome), czyli lekkimi lub ciężkimi rozwojowymi encefalopatiami padaczkowymi o wczesnym początku, jak również dziedziczną neuropatią ruchową i autosomalnie recesywnie dziedziczną spastyczną paraplegią (HSP) (**Syrbe i in. 2017; Writzl i in. 2012; Rapaccini i in. 2018; Morsy i in. 2023; Morrison-Levy i in. 2020; Wang i in. 2018**). Komórki nowotworowe CRC (ang. colorectal cancer) o zmniejszonej ekspresji *SPTANI* łatwiej przerzutują i przyczyniają się do progresji nowotworów na skutek osłabienia oddziaływań i połączeń międzykomórkowych. Oznaczenie poziomu *SPTANI* może posłużyć jako potencjalny biomarker agresywności nowotworu (**Ackermann i in. 2019**).

Zmiany w synapsynie-I mogą być odpowiedzialne za zaburzenie zachowań seksualnych u samic szczurów. Synapsyna-I jest białkiem wiążącym spektrynę, które łączy spektrynę z cytoplazmatyczną powierzchnią pęcherzyków synaptycznych. Ponadto α -II spektryna wchodzi w interakcje z takimi białkami jak kirrel, aktynina alfa 4 (ACTN4 – ang. actinin alpha 4) i winkulina (VCL – ang. vinculin), które są zaangażowane w zachowania seksualne, maskulinizację i defeminizację. Białko kirrel3 bierze udział w organizacji połączeń komórkowych i wykazano, że myszy pozbawione białka kirrel3 mają trudności w odróżnianiu samców od samic, a samce utraciły agresywność seksualną (**Govindaraj i Rao 2016**).

Dowody eksperymentalne pokazują, że napływ wapnia za pośrednictwem receptora NMDA (ang. N-methyl-D-aspartate receptor) zwiększa rozszczepianie spektryny przez kalpainę i promuje długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP – ang. long-term potentiation), co jest ważne dla plastyczności synaptycznej, pamięci i uczenia się (**Govindaraj i Rao 2016**).

Kiedy sercowa β -II spektryna zostaje wyeliminowana, następuje podwyższenie ekspresji innych β spektryn, podczas gdy ekspresja α spektryny jest obniżona. Zaś z utratą α -II spektryny wiąże się wzrost ekspresji α -I spektryny i spadek ekspresji β spektryn (**Lubbers i in. 2019**).

SPTANI jest obecny w OHC. Jest krytycznym białkiem dla morfologii stereocilii komórek rzęsatych (HC - ang. hair cells) i pełnionej przez nie funkcji słuchowych, poprzez regulację sygnalizacji (**Govindaraj i Rao 2016**).

1.1.4.2. Działanie kalpajny i kaspazy oraz wrażliwość na cięcie α -II spektryny.

We wczesnej patologii komórek nerwowych w chorobach neurodegeneracyjnych obserwuje się występowanie produktów rozpadu α -II spektryny pod wpływem działania kalpajny i kaspazy 3. Dokładne poznanie tych mechanizmów i szlaków może pozwolić lepiej zrozumieć i dostarczyć wiedzy na temat zaburzeń neurodegeneracyjnych. Oprócz spektrynopatii zaburzenie sygnalizacji wapniowej i aktywacji proteaz aktywowanych wapniem pojawia się w takich zaburzeniach neurologicznych jak choroba Parkinson'a i Alzheimer'a oraz przy urazach z uszkodzeniem mózgu, a także następuje w procesie starzenia się. Wyniki otrzymane z molekularnego modelowania mutacji zmiany sensu sugerują, iż mogą one prowadzić do zmian strukturalnych A, B i C helisy w zmutowanych powtórzeniach i tym samym zmian sterycznych ułatwiających lub utrudniających rozpad za pośrednictwem kalpajny lub kaspazy (**Syrbe i in. 2017; Morrow, Stankewich 2021; Schoch i in. 2012**). Pomimo, iż kalpajna może mieć wiele substratów, to we wspomnianych powyżej sytuacjach α -II spektryna jest głównym celem ataku kalpajny, która rozszczepia pojedyncze wiązanie peptydowe w α -II spektrynie między Tyr1176 i Gly1177 w obrębie 11. powtórzenia spektrynowego. Powstające produkty rozpadu są czułym wskaźnikiem procesów neurodegeneracji, przebudowy neuronów lub neurotoksyczności. Wrażliwość spektryny na kalpajnę zależy od dwóch czynników. Pierwszym jest fosforylacja lub defosforylacja tyrozyny w pozycji 1176 (Y1176) przeprowadzana odpowiednio przez c-Src (ang. cellular Src) lub wiążącą się z domeną SH3 fosfatazę fosfotyrozynową o niskiej masie cząsteczkowej LMW (ang. low molecular weight), co prowadzi odpowiednio do zmniejszenia bądź zwiększenia podatności. Drugim czynnikiem jest zależne od jonów wapnia (Ca^{2+}) wiązanie kalmoduliny (CaM – ang. calmodulin) i ekspozycja reszt tyrozyny i glicyny odpowiednio w pozycji 1176 i 1177 dla proteazy zależnej od wapnia. Poza sekwencją liniową, duże znaczenie ma drugorzędowa i trzeciorzędowa struktura α -II spektryny w rejonie cięcia, określające podatność na działanie mu-kalpajny (**Morrow, Stankewich 2021; Stabach i in. 1997; Nedrełow, Ciani, Morrow 2003; Benz i in. 2008; Machnicka i in. 2014**). Wiązanie VASP (ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein) chroni α -II spektrynę przed rozszczepieniem proteolitycznym w apoptotycznych komórkach śródbłonna, zaś PGE2 (ang. prostaglandin E2) indukuje fosforylację VASP i znosi interakcję α -II spektryny/VASP. Ponadto PGE2 indukuje apoptozę i aktywuje kaspazę 3. Brak VASP prowadzi do defosforylacji α -II spektryny Y1176 i zwiększa jej wrażliwość na działanie kaspazy 3 (**Benz i in. 2008**). Mutacja Spna2R1098Q występuje w kluczowym miejscu regulatorowym, gdzie spotykają się szlaki sygnałowe kinazy tyrozynowej i wapniowej, zmieniając funkcje białka. Wariant p.Arg1098Gln słabiej wiąże kalmodulinę i zwiększa wrażliwość α -II spektryny na proteolizę ze strony kalpajny (**Miazek i in. 2021**). Powstające w wyniku cięcia spektryny przez kalpajnę produkty rozpadu łączą się

amyloidem beta, prowadząc do powstawania ciemnych komórek Purkinje'go u osób z Alzheimerem lub gromadzą w ciałach Lewy'ego u osób z chorobą Parkinson'a (**Morrow, Stankewich 2021**). Nie zaobserwowano by duplikacje p.(Asp2303_Leu2305dup) lub p.(Arg2308_Met2309dup) zmieniały podatność α -II spektryny na cięcie czy też komórek na apoptozę lub autofagię (**Syrbe i in. 2017**).

1.2. Wybrane funkcje spektryn:

1.2.1. Wewnątrzkomórkowy transport białek.

Cytoskielet spektrynowy jest powiązany z błonami wewnętrznymi takimi jak aparat Golgiego i pęcherzyki cytoplazmatyczne, a β -III spektryna jest głównym składnikiem rusztowania dla dystalnych przedziałów aparatu Golgiego oraz będąc swego rodzaju interaktywną platformą powiązaną z cysternami od strony cytoplazmy, gdzie pełni kluczową rolę w utrzymaniu spójności struktury, regulacji kształtu i aktywności wydzielniczej oraz transporcie, a także selekcji ładunku. Miejsce wiążące aparat Golgiego posiada również β -I spektryna na N-końcu, w skład którego wchodzi MAD1 (ang. membrane association domain) i domena wiążąca aktynę. Dla grupowania się β -III spektryny z kompleksem Golgiego bardzo ważny jest 4-fosforan fosfatydyloinozytolu (PI4P – ang. phosphatidylinositol-4-phosphate). Brak 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PI(4,5)P2 – ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) prowadzi do odmiennej fosforylacji β -III spektryny w efekcie czego dochodzi do częściowego rozpadu aparatu Golgiego i uwolnienia spektryny. PI(4,5)P2 również uczestniczy asocjacji β -III spektryny z liposomami. Wyciszenie β -III spektryny lub wprowadzenie do cytoplazmy przeciwciał ukierunkowanych na β -III spektrynę spowodowało rozpad aparatu Golgiego, podczas gdy nie spowodowało zmian w budowie siateczki śródplazmatycznej (**Salcedo-Sicilia i in. 2013**). Ponadto zmniejszenie ekspresji β -III spektryny upośledza transport białek z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego oraz z aparatu Golgiego, czyli sekrecję ale nie transport wsteczny, czego przykładem jest zakłócenie transportu transportera glutaminianu EAAT4 (ang. excitatory amino acid transporter 4) (**Salcedo-Sicilia i in. 2013; Stankewich i in. 2011**). β spektryna oddziałuje z podjednostką dynaktyny Arp1 (ang. actin related protein 1) i jest zaangażowana w transport organelli wzdłuż mikrotubul oraz transport ładunków za pośrednictwem dyneiny, co wymaga oprócz tego udziału domeny MAD1 (**Salcedo-Sicilia i in. 2013; Li 2022; Stankewich i in. 2011; Zhang i in. 2013; Dubreuil 2006**).

1.2.2. Fagocytoza.

Rola spektryny w endocytozie wciąż pozostaje słabo poznana. Endocytoza, na którą składa się fagocytoza i pinocytoza, ma na celu wchłonięcie cząsteczek ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Endocytoza eukariotyczna dotyczy pobierania składników odżywczych, internalizacji receptora, prezentacji antygeny i transmisji synaptycznej. Cytoszkielek aktywny stanowi nieodzowny element zewnętrznych błon komórki, którego filamety aktynowe są bezpośrednio zaangażowane w proces endocytozy. Ponieważ spektryna jest białkiem sieciującym aktyne jej również przypisuje się wpływ na lub udział w endocytozie.

W erytrocytach tetramery spektryny mogą stanowić barierę dla dyfuzji białek w odróżnieniu od pojedynczych cząsteczek lub dimerów spektryny. Zaobserwowano, iż endocytoza występuje w domenach wolnych od spektryny, gdyż stopniowe usuwanie spektryny umożliwia tworzenie się postępującego wgłębienia i następnie fuzję błon oraz w rejonach tych następuje grupowanie receptorów (**Li 2022**). Dyfuzja białka pasma 3 (ang. band 3 protein), transbłonowego transportera anionów, wzrasta w erytrocytach pozbawionych spektryny i maleje w przypadku wzbogacenia sieci. Cytoszkielek erytrocytów reguluje stopień dyfuzji (**Mylvaganam, Grinstein, Freeman 2018**).

W komórkach nieerytroidalnych endocytoza może zachodzić za pośrednictwem kompleksu spektryna/koneksyna-43/ZO-1/aktyna, a usuwanie spektryny nie jest konieczne. W fibroblastach w przebudowę cytoszkieletu spektrynowego podczas pączkowania endocytarnego zaangażowana jest proteaza o aktywności podobnej do kalpajny I, która jest hamowana przez inhibitor proteazy cysteinowej oraz podobny efekt hamujący zaobserwowano z użyciem kalpastatyny. Aktywacja proteazy cysteinowej prowadzi do odłączenia sieci klatryny od cytoszkieletu spektrynowego błony plazmatycznej, co skutkuje utratą około 50% spektryny (**Li 2022**). Endocytoza z udziałem domeny SH3 spektryny nie wykorzystuje mechanizmu wychwyty transferyny. Miejsca wiążące spektrynę z błoną przeważają w regulacji endocytozy, podczas gdy wiązanie aktyny ze spektryną jest kluczowe dla mobilności. W komórkach nerwowych endocytozę można podzielić na mechanizm zależny od klatryny i mechanizm niezależny od klatryny (makropinocytoza). W mechanizmie zależnym od klatryny i spektryny opisano w literaturze również udział białka bliskiego homologu L1 (CHL1 – ang. close homolog of L1; neural cell adhesion molecule L1-like protein) i receptorów kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPARs – ang. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors). Endocytoza CHL1 zależy od integralności tratw lipidowych i lokalnej reorganizacji cytoszkieletu, która zostaje wzmożona poprzez wyciszenie ekspresji β -II spektryny, dlatego też sieć spektrynowa uczestniczy w usuwaniu CHL1 z powierzchni neuronów w wyniku endocytozy

(Li 2022). Z kolei obniżenie ekspresji β -I spektryny i zaburzenie sieci spektrynowej prowadzi do zwiększonej internalizacji AMPARs (Li 2022). Kiedy dojrzewają pęcherzyki pokryte klatryną, białko spokrewnione z dynaminą jest rekrutowane w szyjce pęcherzyków, aby uwolnić pęcherzyk z błony plazmatycznej. W komórkach nerwowych dyfuzję ograniczają zakotwiczone w błonie plazmatycznej białka transbłonowe razem z siecią spektrynową i ankyryną, by utrzymać prawidłową polaryzację domen związanych z ich funkcją (Li 2022).

Domeny spektryny/ankiryry-G ograniczają dostęp klatrynie i transportowi, w którym pośredniczy klatryna oraz hamują endocytozę. Boczne błony plazmatyczne są wzbogacone w β -II spektrynę i ankyrynę-G. Zaburzenie oddziaływania między ankyryną-G i β -II spektryną sprzyja endocytozie transferyny z błony bocznej. Olbrzymia ankyryna-G jest skonfigurowana razem z β II-spektryną w mikrodomenach w somatodendrytycznych błonach plazmatycznych neuronów hipokampa i stabilizuje synapsy GABAergiczne poprzez przeciwstawną endocytozę (Jenkins, He, Bennett 2015; Ghisleni 2020).

Przeprowadzana przez komórki wrodzonej odpowiedzi immunologicznej fagocytoza oprócz swojej krytycznej roli we wrodzonej odporności i obronie gospodarza ma fundamentalne znaczenie dla utrzymania homeostazy w organizmie i tkankach, dzięki której możliwe jest szybkie usuwanie elementów powstałych na skutek apoptozy lub nekrozy, przebudowa tkanek, szybka reakcja na urazy i infekcje. W procesie tym powstaje pęcherzyk endocytny zwany wakuolą, który jest transportowany do wnętrza komórki. W czasie tego transportu ulega on fuzji z endosomami lub lizosomami, których zawartość umożliwia przetworzenie lub degradację pochłoniętego materiału. Materiał ten może wywołać stan zapalny, a gdy zawiera antygeny mogą one zostać zaprezentowane limfocytom wzbudzając swoistą odpowiedź immunologiczną. Fagocytoza może zatem pośredniczyć w nadzorze i odpowiedzi immunologicznej, w trakcie której dochodzi do przebudowy zaangażowanego w te procesy cytoszkieletu i grupowania receptorów w miejscach kontaktu z celem. Zdolności fagocytarne fagocytów są ściśle związane z rozmieszczeniem i rozbudową cytoszkieletu oraz filamentów aktynowych w warstwie korowej błony plazmatycznej, rzutujące na ich morfologię, napięcie powierzchniowe, dyfuzję, rozmieszczenie receptorów. Domena cytozolowa wielu aktywujących fagocytozę receptorów zawiera regiony zwane motywami aktywacyjnymi immunoreceptora opartymi na tyrozynie (ITAMs – ang. immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Wiązanie jednowartościowych ligandów przez receptory nie wystarcza do wywołania odpowiedzi, stąd wymagane jest grupowanie receptorów, lecz skoncentrowanie receptorów fagocytarnych również nie wystarcza do zapoczątkowania fagocytozy, ze względu na blokowanie reakcji fosforylacji przez dominujące transbłonowe fosfatazy (CD45 i CD148).

Cięcie spektryny przez kalpainę w obecności kalmoduliny i jonów wapnia wpływa na przebudowę synaps i endocytozę za pośrednictwem receptora **(Nedrełow, Cianci, Morrow 2003)**.

Ankiryna-G łączy białka błonowe z cytoszkieletem spektrynowo-aktynowym. Jedym z takich białek jest VE-kadheryna (ang. vascular endothelial cadherin), w efekcie czego ankiryna-G specyficznie hamuje endocytozę VE-kadheryny. Kadheryna śródbłonna naczyniowego (VE-kadheryna) jest głównym białkiem adhezyjnym występującym w połączeniach przylegających komórek śródbłonna **(Cadwell i in. 2016)**.

1.2.3. Przekazywaniu sygnałów przez zewnętrzną błonę komórkową.

W komórkach jądrazstych jak również erytrocytach szkielet spektrynowy nadaje lub odpowiada za kształt, architekturę i morfologię komórki, stabilność, integralność, właściwą organizację oraz właściwości mechaniczne błony komórkowej. Cechy, które w istotny sposób wpływają na przekazywanie sygnałów. Spektryny są zaangażowane w prawidłowe rozmieszczenie, segregację, organizację i funkcję integralnych białek błonowych, takich jak kanały jonowe, transportery, receptory i cząsteczki adhezyjne w wyspecjalizowanych domenach błonowych, stanowiąc dla nich swego rodzaju platformę, której domeny są interfejsem do odbierania sygnałów. Jeśli ekspresja bądź struktura białkowa spektryn lub wiążącej ją ankiryny zostanie zaburzona, oddziałujący partnerzy błonowi nie gromadzą się w odpowiednim miejscu w błonie i dochodzi do zakłócenia procesów. Rusztowanie sieci spektrynowej jest punktem, w którym schodzą się szlaki przekazywania sygnałów za pośrednictwem kinazy wapniowej oraz kinazy i fosfatazy tyrozynowej. Należy pamiętać, że do tego wszystkiego na samą spektrynę wpływają różne szlaki regulacyjne, w które są zaangażowane proteazy, kalmodulina i jony wapnia. W przebudowie rusztowania spektrynowego bierze udział m- i μ -kalpainy oraz kaspazy 2, 3 i 7, a proces ten jest regulowany fosforylacją tyrozyny i oddziaływanie z Ca^{2+} oraz kalmoduliną **(Machnicka i in. 2012; Machnicka i in. 2019; Stankewich i in. 2011; Machnicka i in. 2014)**.

Jak wspomniano wcześniej, spektryny oddziałują bezpośrednio lub pośrednio z wieloma białkami błonowymi wpływając na ich organizację i funkcję. Przykładem takiego białka może być kompleks białka 4.1, który składa się z aktyny, demantyny, adducyny, tropomiozyny oraz tropomoduliny i poza stabilizacją interakcji aktyny ze spektryną jego głównym miejscem wiązania jest dwuwarstwowa błona, przez co wiąże sieć spektrynową cytoszkieletu z białkami transmembranowymi takimi jak glikoforyna C (poprzez motyw dłoni EF), MPP-1 (ang. membrane palmitoylated protein 1) lub wymiennicz anionowy AE1 (ang. anion exchanger 1), dzięki czemu może brać udział w przekazywaniu sygnałów przez błonę zewnętrzną. Drugim

istotnym łącznikiem spektryny z białkami transmembranowymi jest ankiryna. Fosfatydyloseryna oraz fosfatydyloetanolamina są również składnikami dwuwarstwy lipidowej błony, z którymi bezpośrednio łączy się spektryna za pomocą domeny homologicznej do plekstryny lub wiążącej ankiryne, zatem spektryny oddziałują również z fosfolipidami. Innym rodzajem białek błonowych z jakimi oddziałuje spektryna są cząsteczki adhezyjne jak np. Lu/BCAM (ang. Lutheran protein/basal cell adhesion molecule) czy też NCAM (ang. neural cell adhesion molecule). α -I i α -II spektryna reguluje aktywność adhezyjną Lu/BCAM (unikalny receptor laminy) do laminy pośrednicząc w sygnalizacji pomiędzy laminą a aktyną w erytrocytach, komórkach nabłonka i śródbłonka. Cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych (NCAM) promuje wzrost neurytów, tworzenie synaps, reguluje ich wydajność oraz gromadzi się w zagęszczeniach postsynaptycznych. Mutacje oraz zaburzoną ekspresję NCAM powiązano z schizofrenią i zaburzeniami dwubiegunowymi. NCAM oddziałuje za pomocą tratw lipidowych bezpośrednio z β -I spektryną organizując składanie sieci cytoszkieletu i rekrutując spektrynę do błony plazmatycznej oraz zagęszczenia postsynaptycznego, co mechanicznie stabilizuje synapsy. Neurony w hipokampie z niedoborem cząsteczki adhezyjnej komórek nerwowych (NCAM -/-) mają nienormalnie zwiększony odsetek synaps z perforowanym zagęszczeniem postsynaptycznym i obniżony poziom β -I spektryny, zaś nadekspresja NCAM prowadzi do ogólnego wzrostu poziomu β -I spektryny (**Puchkov i in. 2011; Machnicka i in. 2019**). Odsetek synaps z perforowanym zagęszczeniem postsynaptycznym jest również zwiększony w neuronach typu dzikiego (NCAM +/+) z zaburzonym kompleksem NCAM/spektryna lub obniżoną ekspresją β -I spektryny, co wskazuje, że cytoszkielet spektrynowy razem z NCAM utrzymuje integralność strukturalną zagęszczenia postsynaptycznego i zakłócenie tego kompleksu wystarcza do podniesienia perforacji, a w efekcie zwiększenia aktywności synaptycznej i wpływając na kontakt komórka-komórka. W perforowanych zagęszczeniach postsynaptycznych występują strefy endocytarne biorące udział w internalizacji AMPARs (receptory pośredniczące w szybkim przekazywaniu sygnałów pobudzających). Poziom AMPARs można szybko obniżyć na skutek endocytozy za pośrednictwem klatryny i osłabienia sieci spektrynowej (**Puchkov i in. 2011**). Wzrost odsetka perforacji w zagęszczeniu postsynaptycznym silnie koreluje ze wzrostem liczby pęcherzyków pokrytych klatryną. Długotrwała stymulacja NCAM prowadzi do wstawiania AMPAR do powierzchni komórki nerwowej, tworzenia perforowanych synaps i endocytozy AMPAR. Świadczy to o znaczeniu perforowanych zagęszczeń postsynaptycznych dla utrzymania homeostazy w pobudzonych synapsach. W neuronach zarówno NCAM +/+ jak i NCAM -/- z zaburzoną siecią spektrynową występuje nasilona endocytoza AMPAR. Taki wysoki wskaźnik endocytozy w błonie postsynaptycznej może prowadzić do stanów patologicznych mózgu. Zatem spektryna jest niezbędna w procesie tworzenia synaps immunologicznych. Białko bliskiego homologu L1 (CHL1) asocjuje z β -II spektryną w celu jego endocytozy wymaganej do wzrostu neurytów

zależnej od CHL1. Poza β spektrynami w rozwój układu nerwowego są zaangażowane również α spektryny, np. przez oddziaływanie z białkiem 14-3-3, które pełni rolę przełącznika regulującego wzrost neurytów w odpowiedzi na stymulację NCAM oraz jest zaangażowane w plastyczność synaptyczną i migrację neuronów. Kolejnym typem białek błonowych z którymi oddziałują spektryny są kanały jonowe. Przykładem jest częściowa regulacja powierzchniowej ekspresji i aktywności kanału hTRPC4 (ang. human transient receptor potential channel 4), a wyciszenie ekspresji α -II spektryny skutkuje nie włączaniem kanału do błony komórkowej (**Machnicka i in. 2012**). Za prawidłowe umiejscowienie transportera glutaminianu EAAT4 na powierzchni błony plazmatycznej w komórkach Purkiniego odpowiada β -III spektryna poprzez interakcję z ARP1 i dyneiną, a mutacje w β -III spektrynie zatrzymujące ją w aparacie Golgiego oraz blokujące oddziaływanie z ARP1 zaburzają transport do i lokalizację EAAT4 w błonie plazmatycznej, co może prowadzić do rozwoju ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 5 (SCA5). Receptory NMDA należą do kanałów kationowych bramkowanych glutaminianem o wysokim przewodnictwie Ca^{2+} , które są pośrednio zaangażowane w szybkie przekazywanie sygnału i plastyczność synaps. Spektryna wiąże się z cytozolową podjednostką NR2 receptora NMDA oraz fosforylacja spektryny zmieniająca jej podatność na cięcie przez kalpainę chroni kompleks receptora NMDA. Fosforylacja również reguluje aktywność NR2 oraz chroni przed cięciem ze strony kapainy, które zaburza jej wiązanie ze spektryną. Z kolei β -IV spektryna i jej fosforylacja wpływa na propagację, synchronizację i regulację potencjałów czynnościowych poprzez lokowanie kanałów sodowych i potasowych bramkowanych napięciem w AIS, przewężeniach Ranviera i nerwach z osłoną mielinową, a także stabilność pobudliwych błon w sercu i mózgu. Błędną lokalizacja kanałów bramkowanych napięciem w AIS i węzła Ranviera pod wpływem utraty β -IV spektryna była związana z wadą słuchu. Również mutacje w ankirynie B prowadzą do złego sortowania VGSC w mięśniu sercowym, co objawia się zespołem długiego odstępu QT typu 4 (**Machnicka i in. 2012; Machnicka i in. 2019; Puchkov i in. 2011; Stankewich i in. 2011; Metral i in. 2009; Machnicka i in. 2014; Zhang i in. 2013**).

W limfocytach spektryna pełni także istotną rolę w regulacji różnych szlaków procesów komórkowych i sygnalizacji m. in. aktywacji, prowadzących do wytworzenia TCR (ang. T-cell receptor) oraz apoptozie. Spektryna i ankyryna bezpośrednio wiążą się w limfocytach z CD45, który odgrywa kluczową rolę w proliferacji limfocytów T w odpowiedzi na stymulację z antygenem oraz sygnalizacji i regulacji TCR. Dodatkowo transport receptorów CD3 i CD45 na powierzchnię limfocyty wymaga wiązania się CD45 ze spektryną, co pobudza aktywność PTPazy CD45 jak i jest zależny od ankiryny. Zmiany w genie kodującym CD45 lub niedobór receptora CD45 prowadzą do ciężkich złożonych niedoborów odporności, zaburzonego rozwoju tymocytów, obniżenia ilości obwodowych limfocytów T i upośledzonej aktywacji (**Machnicka i in. 2012; Machnicka i in. 2019; Stankewich i in. 2011; Machnicka i in. 2014**).

Za pomocą domeny SH3 (częsty motyw białek biorących udział w transdukcji sygnałów), zlokalizowanej w obrębie 9 powtórzeń, α -II spektryna przekazuje sygnały prowadzące do aktywacji Rac i Ras (adhezja, wydłużanie lamellipodiów, rozprzestrzenianie się komórek), bezpośrednio oddziałuje z białkiem VASP (nieufosforylowanym) i EVL (ang. enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein) należącymi do rodziny białek Ena/VASP (interakcje komórka-komórka, przepuszczalność śródbłonna, adhezja, tworzenie i wydłużanie lamellipodiów, przebudowa aktyny w aktywowanych limfocytach T, polimeryzacja i dynamiczność aktyny) oraz posiada zdolność wiązania z dynaminą. α -II spektryna jest obecna w wyspecjalizowanym typie kompleksów sygnalizacyjnych integryny β 3 indukowanych przez kalpainę i współuczestniczących w aktywacji Rac. α -II spektryna poprzez oddziaływanie domeny SH3 z białkami naprawczymi FA (ang. Fanconi anemia proteins), XPF (ang. Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein), FANCA (ang. Fanconi anaemia, complementation group A) i FANCG (ang. Fanconi anemia complementation group G) może być zaangażowana w naprawę nici DNA (szczególnie w niektórych początkowych etapach), działając w miejscach uszkodzenia jak rusztowanie i mobilizując białka naprawcze. Ponadto α -II spektryna bierze udział w utrzymaniu stabilności chromosomów. Dodatkowo zidentyfikowano oddziaływanie domeny SH3 z c-Src, wymiennicami Na^+/H^+ oraz niskocząsteczkową fosfatazą fosfotyrozynową (Machnicka i in. 2012; Machnicka i in. 2019; Stankewich i in. 2011; McPherson 1999; Qualmann, Kessels 2002; Machnicka i in. 2014).

Spektryna bierze udział w cyklu komórkowym poprzez regulację ekspresji receptorów błonowych, np. w sygnalizacji TGF- β (ang. transforming growth factor β) poprzez odpowiednią lokalizację białek smad3 i 4 (ang. suppressor of mothers against decapentaplegic), regulujących aktywność TGF- β . Myszy elf +/- (ang. embryonic liver fodrin) mają wyższe ryzyko rozwoju nowotworu z powodu deregulacją kontroli cyklu komórkowego w przejściu G_1/S i wadliwej sygnalizacji TGF- β (Machnicka i in. 2012; Zhang i in. 2013). Obniżenie ekspresji α -II spektryny prowadzi do podwyższenia poziomu p21 i zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G_1 (Machnicka i in. 2012).

W erytrocytach wymiennicz anionowy (AE1) wiąże się z ankiryną a ta łączy go z β spektryną. Zwiększoną obfitość spektryn odnotowano w rejonach kontaktu komórek, takich jak połączenia przylegające, ścisłe i szczelinowe. W połączeniach przylegających spektryna oddziałuje bezpośrednio z kompleksem E-kadheryny i β -kateniny lub α -kateniny. W połączeniach ścisłych spektryna współlokalizuje się z zonula occludens 1 (ZO-1) i oddziałuje z ZO-2 poprzez białko 4.1. Podczas gdy w połączeniach szczelinowych szczególna izoforma α -II spektryny oddziałuje z koneksyną-43. W komórkach nabłonka β -II spektryna oraz ankiryna G pełnią również istotną

rolę w prawidłowej lokalizacji, koncentracji i akumulacji E-kadheryny podczas kontaktu komórek oraz transporcie białek i fosfolipidów do błony bocznej. Zaburzenie ich ekspresji prowadzi do destabilizacji i zmiany proporcji pomiędzy błoną boczną, podstawną i wierzchołkową a w efekcie morfologii komórki. W zewnętrznych komórkach rzęsatych (OHC) α -II, β -II i β -V spektryny wraz z filamentami aktynowymi tworzą sieć zaangażowaną w elektromotorykę indukowaną dźwiękiem, z których β -V spektryna jest bezpośrednio zaangażowana w elektromobilność OHC. Stereocilia HC u podstawy otoczone pierścieniem α -II spektryny pełnią kluczową rolę w odbieraniu i przekazywaniu dźwięku. Niedobór α -II spektryny (Yao i in. 2022) prowadzi do szybkiej głuchoty na skutek nieprawidłowego formowania się stereocili oraz zmniejszenia obfitości HC w wyniku apoptozy spowodowanej zaburzonym oddziaływaniem z integryną β 1, FAK, paksyliną i winkuliną, a w przypadku β -II spektryny w efekcie zaburzonej polaryzacji HC. Spektryny są również elementem kompleksu receptorów związanych z białkiem G (GPCR) oraz synaptycznego kompleksu wielobiałkowego. W śródbłonku naczyń krwionośnych spektryny są zaangażowane w przenoszenie sygnału do mechanoreceptorów w odpowiedzi na zmianę naprężeń i sił rozciągająco-ściskających, w których uczestniczą m. in. kanały Piezo1, hialuronian czy też CD44 (Machnicka i in. 2012; Machnicka i in. 2019; Machnicka i in. 2014; Mylvaganam i in. 2022; Yao i in. 2022).

1.2.4. Kontrola cyklu komórkowego.

Niedobór α -II spektryny zakłóca podział i proliferację komórek prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₁, co świadczy iż α II spektryna może być zaangażowana w regulację cyklu komórkowego (Metral i in. 2009). Obniżenie ekspresji α -II spektryny w ludzkiej linii komórkowej czerniaka (WM-266-4) przy użyciu siRNA znacznie spowolniło przyrost komórek w hodowli, w skutek zmniejszenia odsetku komórek obecnych w fazie S i G₂/M i zwiększenia udziału (zatrzymanie) komórek obecnych w fazie G₁ cyklu komórkowego, podczas gdy nie wpłynęło na apoptozę i śmierć komórek (Metral i in. 2009). Odsetek komórek z obniżoną ekspresją α -II spektryny w fazie G₂/M wyniósł około 8%, z kolei w komórkach kontrolnych wyniósł około 14%. Dodatkowo w komórkach z wyciszoną ekspresją α -II spektryny stwierdzono znaczny spadek stosunku hiperfosforylowanego białka Rb (ang. retinoblastoma protein) do jego formy niefosforylowanej, będącego regulatorem progresji cyklu komórkowego (Metral i in. 2009). Ponadto zauważono podwyższoną ekspresję p21 (inhibitora cyklinozależnej kinazy) jednego z inhibitorów cyklu komórkowego, którego wyciszenie spowodowało wzrost proliferacji, a jednocześnie pełni funkcje w kontroli cyklu komórkowego (Metral i in. 2009). Może zatem działać hamująco na progresję cyklu komórkowego prowadząc do jego zatrzymania, a poprzez stabilizację oddziaływać CDK4/CDK6 (ang. cyclin-dependent kinase 4 and 6) z cyklinami promować. W komórkach tych stwierdzono obniżenie zdolności do adhezji. Równolegle adhezja

poprzez integryny może modulować zdarzenia molekularne wymagane do postępu cyklu komórkowego, np. przez obniżenie białka p21 i p27. Same integryny prowadzą do stymulacji wielu wczesnych zdarzeń mitogennych związanych z przejściem z fazy G₀ do fazy G₁ cyklu komórkowego. Obserwowane w komórkach zatrzymanie cyklu komórkowego może być wtórnie związane z zaburzeniem adhezji komórek. Przerwanie cytoszkieletu aktyny za pomocą cytochalazyny hamuje wejście w fazę S, obniża poziom cykliny D1, podwyższa p27 i hamuje fosforylację Rb (**Metral i in. 2009; Machnicka i in. 2012**).

Również obniżenie ekspresji β-II spektryny (ELF) prowadzi do zaburzenia punktu kontrolnego przejścia cyklu komórkowego w fazie G₁/S oraz błędnej sygnalizacji transformującego czynnika wzrostu β (TGF-β), co prowadzi do zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworów u myszy elf +/-, zaś u myszy elf -/- brak białka adaptorowego ELF (β-II spektryny) dla SMAD3/4 hamuje sygnalizację TGF-β/SMAD i mutacja ta jest śmiertelna dla embrionów, które łatwo można było odróżnić na podstawie mniejszych rozmiarów ciała i głowy, a także upośledzonej (nierozgałęzionej) sieci naczyń w woreczku żółtkowym. Podobieństwo fenotypowe myszy elf -/- do myszy Smad2 +/- Smad3 +/-, które obejmuje m. in. nieprawidłową anatomię twarzoczaszki, pierwotnych pęcherzyków mózgowych, budowę jelit i wątroby sugeruje, że ELF i SMAD oddziałują ze sobą, co potwierdzono w autoimmunologicznym zapaleniu wątroby typu C, pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych oraz przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby, gdzie zaobserwowano utratę oddziaływań pomiędzy ELF i SMAD. Ponadto mutacja elf -/- wywołała proliferację limfocytów T. Istnieje także przypuszczenie o interakcji SMAD4 z β-II spektryną na podstawie obserwacji zaburzeń mitozy, apoptozy i gruczolów wśród hamartomów lub polipów (**Metral i in. 2009; Zhang i in. 2013; Machnicka i in. 2012**).

Oba badania wnoszą, iż spektryna może być nowym graczem biorącym udział w transdukcji sygnałów pozakomórkowych kontrolujących cykl komórkowy (**Metral i in. 2009; Zhang i in. 2013; Machnicka i in. 2012**).

W komórkach raka wątrobowokomórkowego HCC (ang. hepatocellular carcinoma) potwierdzono podwyższony poziom ekspresji β-II spektryny (**Yang i in. 2021**), a z kolei zmniejszoną ekspresję stwierdzono dla białek związanych z punktem kontrolnym cyklu komórkowego G₁/S m. in. cykliny D1, zależnej od cykliny kinazy 4 (CDK4) oraz Rb, co wskazuje, iż β-II spektryna może regulować przejście cyklu komórkowego G₁/S przez szlak sygnałowy TGF-β (TGF-β/SMAD). Ponieważ β-II spektryna pełni ważną rolę adaptoru w translokacji Smads (SMAD3/4), w pozbawionych jej komórkach HCC zaobserwowano przejście fazowe G₁/S na skutek aktywacji cykliny D1/CDK4. W kardiomiocytach wyciszenie β-II spektryny doprowadziło do osłabienia aktywności mitotycznej, rozregulowania i zatrzymania

cyklu komórkowego oraz zwiększonej apoptozy, gdyż stwierdzono podwyższenie aktywności kaspazy-7 i podwyższony poziom ekspresji proapoptotycznego białka Bax (ang. BCL2 associated X) (Yang i in. 2021). Szlak sygnałowy TGF- β razem z β -II spektryną odgrywa ważną rolę również w hamowaniu innych nowotworów, np. żołądka i regulacji adhezji, na co dowodów dostarczyły myszy β -II spektryna +/- smad4 +/- . Utrata β -II spektryny pośredniczy w zaburzeniu sygnalizacji TGF- β , czego efektem jest niewłaściwa regulacja cyklu komórkowego i szybsze wejście w fazę S (Yang i in. 2021; Zhang i in. 2013).

1.2.5. Angiogeneza.

Przebudowa aktyny leży u podstaw przełączania między stanem spoczynkowym a stanem angiogennym śródbłonka. Regulatory aktyny na połączeniach komórka-komórka śródbłonka utrzymują integralność bariery krew-tkanka, jednocześnie umożliwiając przezśródbłonkową migrację leukocytów. Komórki śródbłonka regulują dyfuzję tlenu, metabolitów, składników odżywczych i przechodzenie komórek przez barierę krew-tkanka. Tworzenie nowych naczyń krwionośnych (waskulogeneza) i dalsza ekspansja sieci naczyniowej przez angiogenezę są złożonymi procesami wymagającym skoordynowania procesów proliferacji, różnicowania i migracji komórek, adhezji do i przebudowy macierzy oraz stabilizacji połączeń komórkowych krytycznie zależnych od cytoszkieletu aktynowego. Czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF – ang. vascular endothelial growth factor) jest jednym z czynników wzrostu stymulujących te procesy (degradację macierzy pozakomórkowej, proliferację, migrację, tworzenie rurek przez komórki śródbłonka oraz przepuszczalność naczyń), a przebudowa cytoszkieletu aranżowana przez VEGF pełni istotną rolę w procesach angiogennych, w których dodatkowo w kluczowy sposób pośredniczy kalpaina (Yadunandanan i in. 2022; Su i in. 2006). Wyciszenie (knockdown) lub obniżenie ekspresji α -II spektryny przy pomocy siRNA i shRNA w pierwotnych ludzkich komórkach śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC - ang. human umbilical vein endothelial cell) i ludzkich komórkach śródbłonka mikronaczyniowego skóry (HMEC-1 – ang. human dermal microvascular endothelial cell) prowadzi do obniżenia ekspresji VE-kadheryny, MCAM (ang. melanoma cell adhesion molecule) i β 3-integryny, ważnych białek zaangażowanych w tworzenie i składanie naczyń kapilarnych, co skutkowało znaczną destabilizacją i skróceniem wypustek (filopodiów) komórkowych, zaburzając proces angiogenezy i formowania się rurek kapilarnych in vitro. Natomiast nie spowodowało zmian poziomu ekspresji białka VASP, które tworzy kompleksy z α -II spektryną i regulują tworzenie cytoszkieletu podczas interakcji komórek śródbłonka. α -II spektryna pełni rolę kontrolną nad integrzynami i innymi cząsteczkami adhezyjnymi w procesie składania rurek kapilarnych oraz modyfikacji migracji śródbłonka. W dodatku zmniejszenie poziomu α -II spektryny w komórkach śródbłonka prowadzi do zmian organizacji cytoszkieletu (sieci aktynowej)

i ograniczenia rozmiaru komórek, zmiany w rozmieszczeniu integryny $\alpha V\beta 3$ i $\alpha 5$ (tworzą agregaty lub nie ulegają akumulacji), redukcji włókien stresowych (ang. stress fibers), a także odkładania się pozostałej spektryny w formie agregatów w cytoplazmie. Komórki śródbłonna z obniżoną α -II spektryną wykazują mniejszą i spowolnioną zdolność do rozprzestrzeniania się oraz formowania lamellipodiów. Zmniejszenie ekspresji α -II spektryny w komórkach śródbłonna wpływa na organizację inwadosomów bogatych w aktynę i zmniejsza ich zdolność do inwazji. Tym samym efektem niedoboru α -II spektryny jest zakłócenie procesu migracji, adhezji, rozprzestrzeniania się oraz zmiana morfologii komórek (**Machnicka i in. 2020; Machnicka i in. 2019**).

Domena SH3 jest unikalna dla α spektryn. Domena SH3 α -II spektryny wiąże białka Abi1 (ang. Abelson interactor 1), EVL, VASP, WASP, WAVE i Tes wpływające na dynamikę i polimeryzację aktyny, z których białka EVL i VASP należą do rodziny ssaczych fosfoprotein aktywowanych/stymulowanych rozszerzeniem naczyń krwionośnych Mena/VASP (ang. mammalian enabled vasodilator-stimulated phosphoprotein) występujących w filopodiach i ogniskach adhezji. Kompleksy α -II spektryny z VASP inicjują i regulują składanie cytoszkieletu w trakcie kontaktów komórek śródbłonna, zmniejszają przepuszczalność śródbłonna i stabilizują kontakt komórka-komórka. W niedoborach VASP obserwuje się zwiększenie przepuszczalności komórek śródbłonna i mikronaczyń (**Benz i in. 2008a**). Sugeruje to wpływ α -II spektryny na przepuszczalność naczyń. Oba białka kolokalizują się z markerem ścisłych połączeń ZO-1 (łac. zonula occludens 1). Domena SH3 α -II spektryny wiąże się z potrójnym motywem GP₅ VASP (powtórzenie poliprolinowe). Fosforylacja VASP przeprowadzana przez zależną od cAMP kinazę białkową A (PKA – ang. protein kinase A) hamuje oddziaływanie ze spektryną (**Benz i in. 2008a**). Jednocześnie zakotwiczona poprzez domenę SH3 spektryny fosfodiesteraza D4 (PDE4D4 – ang. phosphodiesterase 4D) w regionach kontaktu komórka-komórka kształtuje odpowiedź fizjologiczną na cAMP, kierując ją do efektorów domen błonowych wzmacniających barierę i ograniczając tworzenie się przerw w komórkach śródbłonna oraz zapobiegając reorganizacji mikrotubul za pośrednictwem PKA. Hamowanie aktywności błonowej PDE4D4 zwiększa zakres sygnalizacji cAMP i skutkuje reorganizacją mikrotubul oraz przerwaniem bariery komórek śródbłonna (**Creighton i in. 2008**). Wiązanie α -II spektryny z VASP hamuje rozpad α -II spektryny zależny od kaspazy-3 w komórkach apoptotycznych, równocześnie PGE₂ promuje w sposób zależny od dawki i czasu fosforylację VASP regulując ten proces (**Benz i in. 2008b**). Wydaje się, że α -katenina jest kolejnym składnikiem kompleksów α -II spektryny–VASP (**Machnicka i in. 2020; Machnicka i in. 2019; Benz i in. 2008a; Yadunandanan i in. 2022; Creighton i in. 2008; Benz i in. 2008b; Sreeja i in. 2020**).

Rodzina białek RhoGTPazy w szczególności RhoA, Rac1 i Cdc42, odgrywają kluczową rolę w koordynowaniu przebudowy aktyny podczas angiogenezy. Spektryna uczestniczy w aktywacji RhoGTPazy Rac, a nadekspresja domeny SH3 α -II spektryny hamuje aktywację Rac1, tworzenie filamentu aktynowego i rozprzestrzenianie się komórek w hodowanych komórkach (**Stankewich i in. 2011**). Aktyna i Rac1 są również zaangażowane w regulację polaryzacji neuronów i tworzenie aksonów. Utrata Rac1 prowadzi do poważnych wad twarzoczaszki i układu sercowo-naczyniowego (**Stankewich i in. 2011**). RhoGTPazy aktywują formy biorące udział w tworzeniu filopodiów, składaniu włókien stresowych i sieci aktynowych do transportu pęcherzykowego, adhezji komórek i stabilizacji połączeń śródbłonka (**Stankewich i in. 2011; Yadunandanan i in. 2022**).

VEGF zwiększa aktywność kalpajny w komórkach śródbłonka mikronaczyniowego, gdyż w komórkach PMEC (ang. pulmonary microvascular endothelial cells) inkubowanych z dodatkiem VEGF zaobserwowano wzrost specyficznych dla kalpajny produktów rozpadu spektryny. Nadekspresja kalpastatyny w PMEC nie zmienia udziału kalpajny-1 i kalpajny-2, ale prowadzi do spadku aktywności kalpajny obserwowanej jako obniżenie zawartości produktów degradacji spektryny, ponadto zmniejsza zdolności naprawy ran i formowania naczyń śródbłonka, także w PMEC wystawionych na działanie VEGF (**Su i in. 2006**).

Przystosowanie do niskiego poziomu tlenu na skutek zmiany ekspresji genów jest niezwykle ważne dla rozwoju tkanek i przeżycia komórek. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych z komórek śródbłonka, przywraca dopływ tlenu do niedokrwionych tkanek. Alternatywny splicing w komórkach śródbłonka dla tego wydarzenia zaobserwowano dla dziewięciu genów uprzednio niezwiązanych z niedotlenieniem (**Weigand i in. 2012**), z których aż sześć było zaangażowanych w przebudowę cytoszkieletu za pośrednictwem angiogenezy m. in. *SPTAN1*. W warunkach niedotleniania kasety eksonowe (pominięcie eksonów) występowały z mniejszą częstotliwością (**Weigand i in. 2012**). Spektryny łączą się z białkiem ścisłych połączeń 1 - TJP1 (ang. tight junction protein 1; ZO-1), CTNNA1 (ang. catenin alpha 1; alfa-kenatena) i białkiem alfa połączeń szczelinowych 1 zwanym również koneksyną-43 - GJA1 (ang. gap-junction protein alpha 1). W warunkach hipoksji zostaje obniżona zawartość dłuższej izoformy spektryny (20 dodatkowych aminokwasów na C-końcu domeny SH3) oddziałującej z koneksyną-43 wymaganej przy tworzeniu połączeń szczelinowych i specyficznie zlokalizowanej w ich obrębie (**Weigand i in. 2012**). Ta 20 aminokwasowa wstawka może być podatna na fosforylację przez N-końcową kinazę c-Jun (JNK – ang. c-Jun N-terminal kinase). Zatem alternatywny splicing *SPTAN1* promujący w warunkach hipoksji krótszą izoformę białka powinien korzystnie wpłynąć na przeżycia komórek lub angiogenezę na skutek redukcji połączeń szczelinowych. Przeżycie

w warunkach niskiego stężenia tlenu i angiogeneza stają się również ważne w trakcie wzrostu i rozwoju nowotworów (**Weigand i in. 2012; Ackermann, Brieger 2019**).

β -Fodryna działa jako łącznik dla Smad3 i Smad4 w szlaku sygnałowym transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β), przez co pełni rolę regulatora angiogenezy. Jednocześnie hamowanie TGF- β /Smad prowadzi do osłabienia angiogenezy (**Sreeja i in. 2020**). Heterozygotyczne myszy β -fodrin (+/-) prezentowały nieprawidłowości wewnątrznaczyniowe w wątrobie prowadzące do podwyższonego ryzyka raka, a także zaburzone różnicowanie komórek śródbłonka. Również w angiogenezie bierze udział β -II spektryna. Utrata β -II spektryny stymuluje proces angiogenezy i zaburzoną, niekontrolowaną proliferację komórek śródbłonka naczyń woreczka żółtkowego (**Sreeja i in. 2020**). Poprzez regulację angiogenezy zapobiega rozwojowi raka wątrobowokomórkowego, który występuje w przypadku myszy pozbawionych β -II spektryny. Brak α -fodryny lub β -fodryny jest śmiertelny dla embrionów z powodu wad w układzie krwionośnym (zmniejszony rozmiar serca i unaczynienie, nieprawidłowe rozmieszczenie tropomiozyny oraz dystrofiny) i nerwowym (**Sreeja i in. 2020; Yang i in. 2021**).

Wczesna utrata specyficznej dla śródbłonka β -IV spektryny zwiększa śmiertelności embrionów myszy z powodu hiperwaskularyzacji i defektów krwotocznych, a u noworodków intensyfikuje gęstość naczyń w siatkówce. β -IV spektryna jest wymagana w komórkach śródbłonka do prawidłowego kiełkowania naczyń w procesie angiogenezy, gdyż pełni istotną rolę w sygnalizacji VEGF, ekspresji oraz aktywności VEGFR2, a także działa jako negatywny regulator angiogenezy (**Kwak i in. 2022**).

Sieć spektrynowa jest niezbędna do przenoszenia naprężeń i sił powstających podczas przepływu krwi przez naczynia na mechanosensory śródbłonka. W sieci tej zakotwiczona jest cząsteczka CD44 zmieniająca zagęszczenie hialuronianu na powierzchni komórki, który zamienia naprężenie styczne na zmiany napięcia błony komórkowej. Ponadto sieć spektrynowa kontroluje aktywność, stabilność i rozmieszczenie mechanowrażliwych kanałów Piezo1, które pod wpływem naprężeń stycznych zostają aktywowane i biorą udział w wymianie wapnia. Sieć spektrynowa oprócz wykrywania natężeń stycznych, odpowiada również za przekazywanie i rozprowadzanie sił rozciągająco-ściskających do mechanosensorów, których zadaniem jest zapoczątkowanie reakcji ochronnych i wazoaktywnych (**Mylvaganam i in. 2022**).

W mysich komórkach śródbłonka z niedoborem EVL +/- stwierdzono między innymi obniżenie ekspresji genu serpiny 1 (**Zink i in. 2021**). Traktowanie TGF- β 1 zwiększyło aktywność wiązania β -II spektryny i SMAD3 z ludzkimi i mysimi promotorami inhibitora aktywatora plazminogenu PAI-1 (ang. plasminogen activator inhibitor) (**Chen i in. 2016**). Zwierzęta leczone

farmakologicznym inhibitorem PAI-039 przejawiały obniżony poziom specyficznych produktów degradacji spektryny o masie 150 kDa (**Griemert i in. 2019**).

W fibroblastach pochodzących z serca z niedoborem β -IV spektryny obserwowano zwiększoną sekrecję do medium hodowlanego i ekspresję fraktalkiny (CX3CL1 – ang. C-X3-C motif chemokine ligand 1) (**Nassal i in. 2023**). Fraktalkina może bezpośrednio pośredniczyć w adhezji monocytów, aktywacji VEGF-A i angiogenezie poprzez swój receptor CX3CR1 (ang. C-X3-C motif chemokine receptor 1) na monocytach i śródbłonku podczas angiogenezy w stanach zapalnych (**Zhang i in. 2012**). Stymulacja fraktalkiną HUVEC i HMVEC prowadzi do fosforylacji ERK1/2 (ang. extracellular signal-regulated kinases). Aktywacja szlaku m. in. Rho jest wymagana do aktywacji stymulacji angiogenezy przez fraktalkinę i w jej następstwie zwiększenie ekspresji VEGF-A oraz uruchomienia szlaku PI3K/AKT (ang. protein kinase B)/eNOS (ang. endothelial nitric oxide synthase) lub Raf-1/MEK (ang. mitogen activated protein kinase kinase)/ERK (**Ryu i in. 2008; Lee i in. 2006**).

Aktywność YAP/TAZ (ang. Yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) w odpowiedzi na siły mechaniczne zależy od reorganizacji cytoszkieletu aktynowego oraz aktywności GTPaz Rho. Spektryna poprzez asocjację z włóknami aktynowymi odgrywa ważną rolę w aktywności YAP i została uznana za kluczowe białko cytoszkieletu, które ogranicza aktywność YAP/TAZ w odpowiedzi na bodźce mechaniczne. Zaburzenie sieci cytoszkieletu spektrynowego lub utrata spektryny prowadzi do nadmiernej aktywacji YAP/TAZ. Amfiregulina (AR) jest czynnikiem wzrostu aktywującym receptor naskórkowego czynnika wzrostu, który to z kolei uruchamia szlak YAP/TAZ, zaś celem transkrypcyjnym YAP/TAZ jest amfiregulina (**Boopathy, Hong 2019; Cai, Wang, Meng 2021**). AR promuje produkcję VEGF-A i indukuje angiogenezę ludzkich komórek progenitorowych śródbłonka (**Wang i in. 2017**).

Udział Cyr61 (ang. cysteine-rich angiogenic inducer 61) w angiogenezie wynika z jego interakcji z różnymi integrynami, np. α V β 3, α IIb β 3, α v β 5 (głównie szlaku α V β 3) (**Fataccioli i in. 2002; Boopathy, Hong 2019**). Wiążąc się z receptorami integryn wywierają wpływ na komórki śródbłonka i angiogenezę (**Boopathy, Hong 2019**). Cyr61 zwiększa ekspresję genów VEGF-A, MMP-1 (ang. matrix metalloproteinase-1), MMP-3 (ang. matrix metalloproteinase-3) lub PAI-1 (ang. plasminogen activator inhibitor-1) oraz interakcje z integrynami α 3 i α 5 (**Chen, Mo, Lau 2001; Chen, Du 2007**). Nieufosforylowane kinazy YAP/TAZ uczestniczą w ekspresji docelowego dla nich białka Cyr61, zwłaszcza w komórkach śródbłonka w miejscu powstawania nowych odgałęzień naczyń krwionośnych (**Lee i in. 2019**). Aktywacja YAP/TAZ jest kluczowa dla funkcjonalnych następstw wielu szlaków sygnałowych m. in. VEGF, angiopoetyny lub CYR61 (**Boopathy, Hong 2019**). Ekspresja Cyr61 może być również zapoczątkowana przez

szlak RhoA GTPazy (**Chen, Du 2007**). Niedobór YAZ obniża ekspresję Cyr61, a z kolei nadekspresja Cyr61 na skutek negatywnego sprzężenia zwrotnego inaktywuje YAP, co prowadzi u myszy z delecją genu Cyr61 w komórkach śródbłonna do ich hiperprolifracji i powiększenia naczyń krwionośnych (**Lee i in. 2019**).

OPN (ang. osteopontin) bezpośrednio stymuluje angiogenezę w komórkach progenitorowych śródbłonna glejaka poprzez szlak sygnałowy α V β 3/PI3-K/AKT/eNOS/NO, ale nie spowodował zmiany poziomu VEGF, VEGFR-1 lub VEGFR-2 (**Wang i in. 2011**). W nowotworze piersi OPN zwiększa ekspresję VEGF w wyniku zależnej od integryn α V β 3 aktywacji szlaku Brk (ang. breast tumor kinase)/NIK (ang. NF- κ B-inducing kinase)/NF- κ B (ang. nuclear factor kappa B)/ATF-4 (ang. activating transcription factor 4) (**Chakrabort, Jain, Kundu 2008**). OPN wiąże się z podzbiorem receptorów integryny i jest przede wszystkim dobrze scharakteryzowanym ligandem dla integryny α V β 3, która ulega ekspresji na wysokim poziomie w osteoklastach i komórkach śródbłonna, aktywując kinazę c-Src i PI3-K, tym samym jest ważnym regulatorem angiogenezy poprzez szlak sygnałowy integryny (**Asou i in. 2001; Gupta, Zhou, Chellaiah 2013**). Fosforylacja AKT lub ERK przez OPN zwiększa ekspresję VEGF i jednocześnie na zasadzie sprzężenia zwrotnego VEGF aktywuje szlak PI3K/AKT i ERK1/2. Zastosowanie przeciwciała przeciwko OPN lub α V β 3 blokuje wpływ OPN na HUVEC, a efekt przeciwciała anti-OPN jest silniejszy niż anti-VEGF (**Dai i in. 2009**). Niedobór osteopontyny in vitro hamuje angiogenezę indukowaną przez VEGF (**Gupta, Zhou, Chellaiah 2013**).

Jedną ze strategii blokowania procesu angiogenezy przez czynnik płytkowy 4 polega na hamowaniu oddziaływania VEGF z jego receptorem. Posiada zdolność wiązania się z α V β 3 i do pewnego stopnia z integrynami α V β 5 i α 5 β 1 (**Bikfalvi 2004; Vandercappellen, Van Damme, Struyf 2011; Aidoudi i in. 2008**).

1.2.6. Układ odporności.

Prawidłowy rozwój reakcji odpornościowej w odpowiedzi na infekcję wymaga aktywacji limfocytów T, podczas której kluczowe jest właściwe zaprezentowanie antygeny receptorowi limfocytów T (TCR), utworzenia synapsy immunologicznej i transdukcji sygnałów, co związane jest m. in. z przebudową cytoszkieletu. Spektryny są zaangażowane w początkową fazę kontaktu między limfocytym T i komórką prezentującą antygen oraz tworzenie TCR. Nieerytroidalne spektryny α -II i β -II są obecne w limfocytach (**Wolgast i in. 2011**). Do tworzących się po aktywacji TCR synaps immunologicznych zostaje skierowana α -II spektryna razem z błonową fosfatazą tyrozynową (CD45) i antygenem 1 związanym z funkcją limfocytów (LFA-1 – ang. lymphocyte function-associated antigen 1), które są istotne nie tylko w procesie powstawania

synapsy immunologicznej, ale także dla utrzymania jej stabilności (**Meissner i in. 2017; Pradhan, Morrow 2002**). Wspólny antygen leukocytów CD45 jest krytycznym regulatorem odporności i proliferacji limfocytów T, którego aktywność jest modulowana przez interakcje z cytoszkieletem (**Cairo i in. 2010**). Delecje lub defekty CD45 prowadzą do zaburzenia rozwoju tymocytów, aktywacji za pośrednictwem TCR czy też ciężkich złożonych niedoborów odporności (**Pradhan, Morrow 2002; Machnicka i in. 2012**). Spektryna kontroluje aktywność oraz powierzchniową ekspresję CD45 i LFA-1, odpowiada za przestrzenne dopasowanie podczas kontaktu i adhezję w trakcie interakcji komórka-komórka po utworzeniu synapsy immunologicznej (**Meissner i in. 2017**). Aktywacja limfocytów T zależy od aktywacji fosfatazy CD45 i jej akumulacji w obszarze kontaktu komórka-komórka wymaganej do sygnalizacji i regulacji TCR. Zwiększona liczba kontaktów z cytoszkieletem w aktywowanych komórkach prowadzi do zmniejszenia szybkości dysocjacji CD45-spektryna i immobilizacji CD45, tym samym sieć spektryna-ankiryna-aktyna określa ruchliwość immunoreceptorów (**Cairo i in. 2010**). Związanie ze spektryną zwiększa aktywność katalityczną CD45, zaś oddziaływanie ze spektryną i ankiryną jest kluczowe dla transportu nowo zsyntetyzowanego CD45 do błony komórkowej i przekazywania sygnałów przez CD45 (**Cairo i in. 2010**). Zaburzenie interakcji pomiędzy spektryną i ankiryną skutkuje zmianą stopnia dyfuzji i unieruchomienia CD45 (**Cairo i in. 2010**). CD45 ma również zdolność wiązania się z ważnymi regulatorami funkcji odpornościowych jak CD2, CD11a, CD45AP, CSK2 (ang. C-terminal Src kinase) (**Cairo i in. 2010**). β -I spektryna razem z ankiryną jest wymagana do skutecznego dostarczenia i ekspresji receptorów CD45 oraz CD3 na powierzchni limfocytów, a także pomaga w utrzymaniu domen bogatych w receptory na powierzchni limfocytów T (**Cairo i in. 2010; Pradhan, Morrow 2002; Wolgast i in. 2011**). Jednocześnie spektryna może wpływać na aktywację komórek T i formowanie się synaps immunologicznych poprzez bezpośrednie lub pośrednie oddziaływanie na szkielet aktynowy. W miejscu interakcji komórek dochodzi do polaryzacji aktyny oraz mobilizacji taliny będącej aktywatorem LFA-1. Spektryna poprzez bezpośrednią interakcję z VASP, pośrednio kontroluje aktywację taliny, uczestnicząc w ten sposób w regulacji grupowania integryny LFA-1 w regionie synapsy immunologicznej. LFA-1 z kolei wiąże się z cząsteczką adhezji międzykomórkowej (ICAM-1/2, ang. intercellular adhesion molecules) (**Meissner i in. 2017**) w trakcie interakcji komórki prezentującej antygen (APC – ang. antygen presenting cell) z limfocytom T, zapewniając drugi sygnał aktywacji. Białka VASP i białka podobne do Ena/VASP (EVL), należące do rodziny Ena/VASP, odgrywają również kluczową rolę w przebudowie aktyny podczas aktywacji limfocytów T, tworzeniu i rozszerzaniu lamellipodiów, gdyż przyłączają się do białkowego przełącznika ADAP, który uczestniczy w grupowaniu integryny LFA-1 (**Machnicka i in. 2019; Machnicka i in. 2012**). Oddziaływanie TCR z CD8 na APC prowadzi do podwyższenia poziomu CD45 i obniżenia poziomu Lck, czego efektem jest przebudowa szkieletu aktynowego (**Meissner i in. 2017**). Obniżenie ekspresji spektryny zakłóca

i hamuje proces formowania synapsy immunologicznej, adhezji i tworzenia bogatych w aktywne lamellipodiów oraz filopodiów (Meissner i in. 2017) przez aktywowane limfocyty T, częstotliwość kontaktów międzykomórkowych poprzez zaburzenie rozmieszczenia i rekrutacji aktywny, LFA-1 i CD45 w miejscach kontaktu. U mysich mutantów *elf*^{-/-} utrata funkcji ELF powoduje proliferację limfocytów T (Wolgast i in. 2011; Machnicka i in. 2020; Machnicka i in. 2019; Machnicka i in. 2012; Stankewich i in. 2011; Zhang i in. 2013).

Transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β) pełni kluczową rolę w regulacji procesów immunologicznych i utrzymaniu tolerancji immunologicznej, działając jako inhibitor wzrostu i zapoczątkowując śmierć komórkową limfocytów B, np. podczas eliminacji niedojrzałych limfocytów B za pośrednictwem apoptozy. Jednocześnie w trakcie apoptozy TGF- β indukuje ważny dla tego procesu niezależny od kaspazy 3 rozpad α -II spektryny. Pierwotne miejsce cięcia kaspazy 3 w α -II spektrynie jest zachowane w niedojrzałych i dojrzałych komórkach B. Limfocyty B, niezależnie od etapu dojrzewania, są podatne na apoptozę przez aktywację kaspazy 3, co prowadzi do naruszenia struktury białka α -II spektryny i integralności strukturalnej limfocytów B. Przeciwno odciętemu fragmentowi spektryny mogą powstać autoprzeciwciała, co objawia się chorobą autoimmunologiczną zespołem Sjögrena (Brown i in. 1999; Williams i in. 2003).

Właściwe zakotwiczenie i dostateczna gęstość (skupienie) receptorów śródbłonka są wymagane do skutecznego wychwytywania i toczenia leukocytów. CD44 jest pojedynczą transbłonową glikoproteiną, która ulega ekspresji zarówno na leukocytach oraz komórkach śródbłonka i jest głównym receptorem kwasu hialuronowego. Sieć spektrynowa razem z transbłonowym białkiem CD44 jest zaangażowana w rekrutację i migrację leukocytów do tkanek objętych stanem zapalnym oraz gromadzenie selektyn. Spektryny ograniczają dyfuzję i unieruchamiają CD44, a także stabilizują glikokaliks. Obniżenie ekspresji spektryny skraca czas immobilizacji, zwiększa dyfuzję oraz zmienia rozkład CD44. Wyciszenie spektryny lub CD44 ogranicza toczenie się i adhezję leukocytów do śródbłonka, czyli diapedezę (Mylvaganam i in. 2020).

W monocytach zakażonych *Mycobacterium tuberculosis* zaobserwowano obniżenie ekspresji α -II spektryny i brak produktów degradacji, co upośledzało funkcjonalność monocytów i ich zdolność różnicowania się do makrofagów (Shrivastava, Bagchi 2013). U pacjentów z białaczką odnotowano akumulację lub podwyższoną ekspresję α -II spektryny i obniżony poziom kalpajny-2, co prowadziło do zaburzenia szlaku apoptozy (Ishihara i in. 2013). Wśród 40% przypadków raka jelita grubego z niedoborem MLH1 (ang. MutL homolog 1) występuje obniżona ekspresja α -II spektryny. Wyciszenie ekspresji α -II spektryny w liniach komórkowych raka jelita grubego prowadzi do podwyższenia poziomów białka i mRNA oraz sekrecji IL-8. Zauważono również

wzmoczoną aktywność neutrofilii i podwyższoną infiltrację przez cytotoksyczne limfocyty T (**Ackermann i in. 2020**). W złośliwych chłoniakach B-komórkowych dostrzeżono zmiany w ekspresji spektryn, z których 50% utraciło co najmniej jedną izoformę. W chłoniaku guzkowym stopnia drugiego i trzeciego, chłoniaku Hodgkin'a guzkowym z przewagą limfocytów i stwardnieniu guzkowym stwierdzono zanik α -II i β -II spektryny. Utratę β -I spektryny spostrzeżono w przypadku chłoniaka Burkitta, zaś w chłoniaku Hodgkina o mieszanej komórkowości zaobserwowano utratę α -II i β -I spektryny (**Gorman i in. 2007**). W normalnym reaktywnym szpiku obserwuje się ekspresję α -I i β -I spektryny w komórkach prekursorowych linii erytroidalnej, α -II i β -II spektryny w granulocytach oraz β -I i β -II spektryny w megakariocytach. U niemal połowy osób z ostrą białaczką szpikową zanotowano brak α -II spektryny lub nieprawidłową ekspresję β -I spektryny (**Wolgast i in. 2011**).

1.3. Przegląd ludzkich spektrynopatii.

O pierwszych przypadkach współwystępowania zespołu West'a z mutacjami w genie *SPTANI* wspomina w 2008 roku Tohyama i in., którzy dokonali jednocześnie w tym samym roku pierwszego opisu WS spowodowanego mutacją w genie *SPTANI* u 3 pacjentów. W 2010 roku zespół Saitsu i in. dołożył kolejną bardzo ważną cegiełkę na drodze do lepszego poznania mutacji w genie α -II spektryny i WS. Pierwszy pacjent posiadał delecję (p.Glu2207del), drugi pacjent duplikację (Arg2308_Met2309dup), a trzeci mikrodelecję w regionie 9q33.3–q34.11, która obejmowała oprócz genu *SPTANI* również gen *STXBP1*, którego mutacje także prowadzą do encefalopatii padaczkowych o wczesnym początku jak w przypadku WS lub OS (**Syrbe i in. 2017; Writzl i in. 2012; Morrison-Levy i in. 2020; Tohyama i in. 2015; Saitsu i in. 2010**). Badania przesiewowe i przeszukiwanie baz danych pacjentów z upośledzeniem umysłowym lub zaburzeniami neurorozwojowymi o nieznanym etiologii, dzięki rozwojowi szybkich i łatwo dostępnych metod diagnostycznych, dostarczyły wielu nowych przypadków i przyspieszyły identyfikację pacjentów z brakiem diagnozy i o nietypowych objawach dla mutacji *SPTANI* (**Hamdan i in. 2012; Morsy i in. 2023**). Do roku 2017 opisano 14 przypadków ze zmianami w genie *SPTANI* - 2 przypadki (1 wariant) mutacji nonsensownej, 4 przypadki (4 warianty) zmiany sensu, 3 przypadki (2 warianty) delecji oraz 5 przypadków (3 warianty) duplikacji. W tym samym roku liczba znanych przypadków wzrosła do 34 osób, które reprezentowały 22 różne warianty - 2 przypadki (1 wariant) mutacji nonsensownej, 11 przypadków zmiany sensu w 10 wariantach, 10 delecji w 7 wariantach oraz 11 duplikacji w 4 wariantach (**Syrbe i in. 2017**). Od tego czasu opublikowano łącznie przypadki opisane u około 47 pacjentów (pomijając przypadki mikrodelecji w regionie 9q33.3–q34.11 lub wyłącznym zaangażowaniem obwodowego układu nerwowego) z prawdopodobnymi patogennymi i patogennymi wariantami

w *SPTANI*. Mutacje występowały częściej u osobników płci męskiej (**Marco Hernández i in. 2022**).

Zdecydowana większość zidentyfikowanych mutacji *SPTANI* jest mutacjami typu de novo oraz są to mutacje typu zmiany sensu, delecji, duplikacji, nonsensowne lub mikrodelecje. Zidentyfikowano 8 wariantów delecji (9q34.11 p.(Ala927_Lys1002del), c.6605_6607del p.(Gln2202del), c.6619_6621del p.(Glu2207del), c.6622_6624del p.(Asn2208del), c.6247_6249del p.(Lys2083del), c.6850_6852del p.(Asp2284del), c.6908_6916del p.(Asp2303_Leu2305del), c.6910_6918del p.(Gln2304_Gly2306del)). Rozpoznano 5 wariantów duplikacji (c.6546_6556dup p.(Thr2186Argfs*82), c.6907_6915dup p.(Asp2303_2305dup), c.6908_6916dup p.(Asp2303_Leu2305dup), c.6910_6918dup p.(Gln2304_Gly2306dup), c.6923_6928dup p.(Arg2308_Met2309dup)). Zdiagnozowano 23 warianty zmiany sensu (c.55C>T p.(Arg19Trp), c.271G>A p.(Glu91Lys), c.362G>T p.(Arg121Lys), c.533G>A p.(Gly178Asp), c.917C>T p.(Ala306Val), c.1679A>G p.(Glu560Gly), c.1697G>C p.(Arg566Pro), c.2572G>T p.(Ala858Ser), c.2950C>T p.(Arg984Ter), c.3292C>T p.(Arg1098Cys), c.3292C>A p.(Arg1098Ser), c.3716A>G p.(His1239Arg), c.4283C>G p.(Ala1428Gly), c.4828C>T p.(Arg1610Trp), c.4846G>A p.(Asp1616Asn), c.4870C>T p.(Arg1624Cys), c.5326C>T p.(Arg1776Trp), c.6184C>T p.(Arg2062Trp), c.6614A>C p.(Gln2205Pro), c.6811G>A p.(Glu2271Lys), c.6947A>C p.(Gln2316Pro), c.6990G>C p.(Met2330Ile), p.(Ser2448Phe)). Scharakteryzowano jeden wariant mutacji nonsensownej (c.6103C>T p.(Gln2035*)). Mutacje odpowiedzialne za cięższy stan były związane z 16-20 powtórzeniem spektrynowym, w tym większość przypadków na 19 i 20 powtórzenie odpowiedzialne za heterodimeryzację α/β spektryn. Warianty p.(Ala1428Gly) i p.(Met2330Ile) wystąpiły razem z c.2572G>T p.(Ala858Ser) jako przypadki bialleliczne (**Syrbe i in. 2017; Morrison-Levy i in. 2020; Tohyama i in. 2015; Saitu i in. 2010; Writzl i in. 2012; Nonoda i in. 2012; Hamdan i in. 2012; Rapaccini i in. 2018; Morsy i in. 2023; Leveille i in. 2019; Van de Vondel i in. 2022; Marco Hernández i in. 2022**).

Mikrodelecje de novo obejmują region 9q33.3-q34.11 i mają różną wielkość 0,713 – 4 Mb (0,713; 1,619; 1,765; 1,961; 2,1; 2,25; 2,4; 2,649; 2,878; 3,5; 4). Obraz kliniczny zależy od rozmiarów usuniętego regionu, czyli ilości, różnorodności i funkcji genów jakie wycięty fragment zawierał. Delecji może ulegać cała α -II spektryna, tylko część genu lub w niektórych przypadkach tylko α -II spektryna. Wśród genów ulegających mikrodelecji razem z *SPTANI* najczęściej wymienia się gen STXBP1, gdyż we wcześniejszych doniesieniach również potwierdzono korelację mutacji w obrębie genu STXBP1 z wystąpieniem EIEE. W regionie tym wytypowano cztery kluczowe geny chorobotwórcze spośród 95-101 genów zlokalizowanych w tej sekwencji i zidentyfikowanych u pacjentów - *SPTANI* (α -II spektryna; EIEE5), STXBP1 (białko wiążące

syntaksynę 1; EIEE4), ENG (endoglina; dziedziczna teleangiektazja krwotoczna typu 1) i TOR1A (torsyna A; dystonię torsyjną typu 1), co prowadzi do złożonych fenotypów (Syrbe i in. 2017; Morrison-Levy i in. 2020; Tohyama i in. 2015; Saitsu i in. 2010; Campbell i in. 2012; Matsumoto i in. 2014; Nicita i in. 2015; Aravindhana i in. 2018).

Pacjentów z mutacjami w genie *SPTANI* w zależności od wariantu mutacji zostali sklasyfikowani lub rozpoznawano u nich występowanie najczęściej wczesnej niemowlęcej encefalopatii padaczkowej (EIEE), wczesnej niemowlęcej encefalopatii padaczkowej typu 5 (EIEE5) definiowanej jako zespół West'a (czyli EIEE5 z utrzymującą się przez dłuższy czas hipsarytmią, a później związany z obniżoną aktywnością tła i wieloogniskowymi skokami potencjałów), WS o wczesnym początku, ciężkiej rozwojowej encefalopatii padaczkowej (DEE – z ang. developmental epileptic encephalopathy) lub zespołu niemowlęcych encefalopatii padaczkowych ze spazmami dziecięcymi lub tonicznymi, padaczką ogniskową, czołową bądź miokloniczną, ogniskowymi napadami dyskognitywnymi, napadami mioklonicznymi i atonicznymi (Syrbe i in. 2017; Wang i in. 2018; Saitsu i in. 2010; Tohyama i in. 2015; Writzl i in. 2012; Morsy i in. 2023). Wszystkie rozpoczynających się we wczesnym okresie niemowlęcym, nawet już w pierwszych dniach po urodzeniu. W pojedynczych przypadkach zdiagnozowano zespół PEHO (z ang. progressive encephalopathy with edema, hypsarrhythmia, and optic atrophy), czyli postępującą encefalopatię z obrzękiem, hipsarytmią i zanikiem nerwu wzrokowego (Syrbe i in. 2017). Ostatnimi czasy mutacje w obrębie *SPTANI* powiązano z dziedziczną neuropatią ruchową i dziedziczną autosomalną recesywną paraplegię spastyczną. Badania przesiewowe i przeszukiwanie baz danych pacjentów z zaburzeniami neurorozwojowymi o nieznannej etiologii dostarczyły dowodów, iż w dziedzicznej paraplegii spastycznej (HSP) i dziedzicznej ataksji (HA) dochodzi do statystycznie istotnego wzbogacenia rzadkich i przypuszczalnie uszkodzających wariantów *SPTANI*. Czystą postacią HSP/HA w kontekście mutacji *SPTANI* opisano u 8 osób, zaś złożoną postacią HSP u 2 pacjentów. Zaburzenia neurorozwojowe spowodowane przez *SPTANI* można podzielić na 3 podgrupy: 1 – rozwojowe encefalopatie padaczkowe o ciężkim fenotypie (DEE), 2 – łagodny fenotyp opóźnienia rozwojowego z lub bez napadów (DD - z ang. developmental delay), 3 – czysta lub złożona HA lub HSP (Morsy i in. 2023).

U pacjentów z mikrodelecjami obejmującymi również gen *SPTANI* rozpoznawano występowanie wczesnej encefalopatii mioklonicznej – EME (z ang. early myoclonic encephalopathy), EIEE, EIEE przekształcającej się w WS, encefalopatia padaczkowa o wczesnym początku – EOEE (z ang. early onset epileptic encephalopathy), zespołu OS (czyli EIEE typu 4 z charakterystycznym wzorem cisza-wyładowanie, związany z genem *STXBP1*), WS, padaczki o wczesnym początku innej niż zespół EIEE. Zwykle rozpoczynającą się w pierwszych dniach lub miesiącach życia (Syrbe i in. 2017, Morrison-Levy i in. 2020, Tohyama i in. 2015, Saitsu

i in. 2010; Campbell i in. 2012; Mastrangelo i Leuzzi 2012; Matsumoto i in. 2014; Nicita i in. 2015; Aravindhan i in. 2018).

Wśród pacjentów ze zdiagnozowaną mutacją w genie *SPTANI* spektrum fenotypowe jest różne od łagodnych po ciężkie fenotypy neurorozwojowe w zależności od rodzaju mutacji i miejsca jej występowania. Ogólny obraz kliniczny i spektrum fenotypowe można scharakteryzować następująco (Syrbe i in. 2017; Tohyama i in. 2015; Saitu i in. 2010; Writzl i in. 2012; Nonoda i in. 2012; Hamdan i in. 2012; Gartner i in. 2018; Rapaccini i in. 2018; Morsy i in. 2023; Leveille i in. 2019; Van de Vondel i in. 2022; Marco Hernández i in. 2022):

1. W większości przypadków obserwuje się ciężkie, głębokie lub poważne zaburzenia neurorozwojowe, poważne opóźnienie rozwoju, głębokie upośledzenie umysłowe, głębokie zaburzenia intelektualne lub ciężki niedorozwój umysłowy oraz brak postępów w rozwoju, a wręcz stagnację rozwoju psychoruchowego. Opóźnienie rozwoju i niepełnosprawność intelektualna mogą również przybrać stopień łagodny lub umiarkowany z lub bez zaburzeń behawioralnych oraz napadów padaczkowych, a w dodatku mogą mieć charakter niesyndromiczny. Normalny rozwój psychomotoryczny i intelektualny obserwuje się bardzo rzadko. Pacjenci mogą w pierwszych latach przejawiać głównie opóźnienie motoryczne. U chorych obserwuje się upośledzenie rozwoju psychicznego, neuromotorycznego oraz funkcji poznawczych. Nawet u osób z HSP i HA obserwuje się w blisko 3/4 przypadków opóźnienie w rozwoju, upośledzenie intelektualne i trudności w uczeniu się.
2. W obrazie EEG znacznej części przypadków obecny jest charakterystyczny dla WS wzorzec hipsarytmii lub zmodyfikowana hipsarytmia, głównie u osób z napadami i mutacjami w obrębie 19-20 powtórzenia spektrynowego. Obraz EEG może ulegać zmianie wraz z ewolucją skurczów i napadów od początkowo obserwowanego zmniejszenia i spowolnienia aktywności tła i jego monomorficzność, następnie wieloogniskowe wyładowania padaczkowe, a na końcu przybiera postać hipsarytmii. Hipsarytmie ujawnia się już w wieku 3-4 miesięcy i utrzymuje się do wieku 1-3 lat, po czym następuje zmniejszenie aktywności tła. Hipsarytmia może mieć krótkie okresy wygaszenia lub bardzo rzadko wzór cisza-wyładowanie. Inną cechą obserwowaną w zapisie EEG są wieloogniskowe potencjały padaczkowe. Zdarzali się również pacjenci z normalnym obrazem EEG.
3. Napady padaczkowe mogą przybrać formę uogólnionej padaczki, spazmów niemowlęcych (IS), napadów tonicznych, mioklonicznych lub klonicznych, spazmów padaczkowych, asymetrycznych napadów tonicznych, drgawek mioklonicznych, drgawek noworodkowych, mioklonii, opistotonus o różnym stopniu nasilenia. Napady

padaczkowe pojawiają się w większości w okresie od urodzenia do 9 miesiąca życia (najczęściej około 3-4 miesiąca), mają charakter nawracający i mogą się utrzymywać się przez dłuższy czas. Są w przeważającej części odporne na leczenie lekami przeciwpadaczkowymi i hormonami. IS mogą z upływem czasu przekształcić się w inny typ napadów (miokloniczne, toniczne, ogniskowe, odruchowe, polimorficzne, dyskognitywne). U blisko 25% osób nie zaobserwowano występowania żadnego typu napadów lub padaczki, zaś łagodne fenotyp napadów przejawiało 30% pacjentów. Napady padaczkowe mogą ustąpić samoistnie bez leczenia lub pozostawiając krótkie odruchy epizodyczne bądź po podaniu leku. Po wystąpieniu napadów obserwuje się zatrzymanie rozwoju i zaburzenie zdolności motorycznych i komunikacyjnych oraz kontaktu wzrokowego. U pacjentów z HSP i HA napady padaczkowe i drgawki występowały w co najmniej 1/3 przypadków.

4. Rezonans magnetyczny ujawnił charakterystyczny obraz, w którym widoczna jest przeważnie ciężka i dalece posunięta hipomielinizacja mózgu, znaczne zredukowanie objętości głębokiej i podkorowej istoty białej mózgu, rozległa i często postępująca atrofia i/lub hipoplazja mózgu, kory mózgowej, pnia mózgu, części mostowo-mózdkowej, móżdżku bądź robaka, obecność cienkiego ciała modzelowatego na skutek agenezji lub hipoplazji, poszerzenie komór i bruzd mózgu wraz z przestrzeniami podpajęczynówkowymi w obszarach czołowo-skroniowych. Mielinizacja jest zatrzymana nawet w późniejszym okresie. Tempo progresji atrofii bywa różne, jak również atrofia i/lub hipoplazja mogą mieć łagodną formę. Zdarzają się przypadki, u których nie zaobserwowano zmian w strukturach mózgu (hipomielinizacji, atrofii lub hipoplazji). Zauważono, iż pacjenci w dużej części przypadków przejawiają mikrocefalię poporodową, a nawet w późniejszych okresach. Osoby o normalnych zdolnościach poznawczych i z łagodną lub umiarkowaną niepełnosprawnością umysłową posiadały mutację o charakterze zmiany sensu umiejscowioną głównie poza 16 – 20 powtórzeniem spektrynowym. Do rzadkich objawów należała jamistość rdzenia szyjnego lub polimikrogyria.
5. Kolejnym objawem jest zaburzenie zdolności komunikacyjnych i kontaktu społecznego, czyli przejawianie braku lub słabej uwagi i kontaktu wzrokowego (zdolności śledzenia i patrzenia), nie rozwinięcie lub znaczne upośledzenie mowy (dyszartria) i utrata słuchu. Brak kontaktu wzrokowego był wywołany w niektórych przypadkach przez przypominającą colobomę obustronną dysplazję tarczy nerwu wzrokowego, a w pewnych przypadkach atrofią nerwu wzrokowego. Jednak część pacjentów normalnie reaguje na bodźce wzrokowe i słuchowe oraz rozwija umiejętność mowy, czyli nabywa umiejętności komunikacyjne. Zmiany w tarczy nerwu wzorkowego podobne do colobomy mogą być dodatkową cechą WS obserwowaną u osób z mutacjami w genie

a-II spektryny. Coloboma występuje z częstością 0,5-7,5 na 10 000 urodzeń i tylko dla czterech przypadków mutacji *SPTANI* zgłoszonych na całym świecie. Dlatego możliwość dziedziczenia digenicznego tych dwóch stanów wydaje się mało prawdopodobna. U niektórych osób rozpoznano krótkowzroczność. U 70% pacjentów z HSP i HA zauważono nieprawidłowe ruchy gałek ocznych.

6. Do powtarzających się symptomów należą również zaburzenia motoryczne od drobnych przejawów niezborności po duże niedobory. Wśród najczęściej występujących można wymienić ciężką spastyczną kwadriplegię tudzież tetraplegię (paraliż/porażenie czterokończynowe), w wyniku której pacjenci są przykuci do łóżka i pozbawieni samodzielności oraz może prowadzić do postawy opistotonicznej. Do zdiagnozowanych zaburzeń ruchowych należą również ataksja (np. mózdkową), dyskineza, paraplegia, spastyczność (spastyczne porażenie kończyn dolnych), dystonia (np. kończyn górnych, stóp lub szyjna), drżenie czynnościowe i spoczynkowe, hiperrefleksja kończyn górnych, drobne niezborności ruchowe, niestabilność lub umiarkowana zdolność chodu. Zaburzenia motoryczne mogą reagować na rehabilitację. Hipotonia, czyli brak odpowiedniego napięcia mięśniowego i związane z tym szybkie lub głębokie odruchy ścięgniste, słaby wzorzec odruchów spontanicznych i proprioceptywnych oraz skurcze i spazmy. Ciężka hipotonia często prowadzi do tetraparezy i tetraplegii. Innym często wspomnianym objawem jest brak kontroli pozycji i ruchów głowy, jak również brak umiejętności utrzymania postawy siedzącej. Ze wspomnianych względów pacjenci mają problemy z połykaniem i wymagają karmienia nosowo-żołądkowego przez sondę.
7. Indywidualnymi objawami było wystąpienie u jednego z pacjentów zapalenia mięśnia sercowego, które doprowadziło do śmierci. U innego rozpoznano uszkodzenie przegrody międzyprzedsionkowej i laryngomalazję (wrodzona wada krtani). Do indywidualnych objawów należy również zaliczyć wysokie wysklepienie stóp, nawracające ataki bólu głowy (migrena), zaburzenia ze spektrum autyzmu, dysregulację termiczną, nieprawidłowości ze strony pęcherza moczowego i tarczycy, wgłobienia jelita oraz zgrubiała wierzchnia strona dłoni i stóp. Pacjenci mogą prezentować cechy dysmorfii twarzy (wydłużona lub trójkątna, uwydatnione lub wysokie czoło, obniżony grzbiet nosa, małe przednie ciemiączko, wysoko wysklepione podniebienie, nisko osadzone uszy) lub lejkowatą klatkę piersiową.

W schematach terapii dla zespołu West'a wywołanego mutacją w genie *SPTANI* stosowano leki przeciwpadaczkowe takie jak: wiga batryna, hormon adrenokortykotropowy, kwas walproinowy, pirydoksyna, prednizon, klonazepam, lewetyracetam, topiramata, sultiam, fenobarbital, 5'-fosforan pirydoksalu, klobazam, karbamazepina, lamotrygina, nitrazepam, kwas folinowy, zonisamid, etosuksymid oraz dietę ketogenną, czyli popularne leki przeciwpadaczkowe i metody

wykorzystywane w leczeniu WS i innych chorób padaczkowych. Środki te stosuje się pojedynczo lub w zdecydowanej większości sytuacji w przeróżnych kombinacjach z użyciem nawet 4 preparatów. Poza tym dokonuje się co jakiś czas zmiany używanych kombinacji leków (**Syrbe i in. 2017; Tohyama i in. 2015; Writzl i in. 2012; Nonoda i in. 2012**). W obszarze leczenia także można zauważyć, iż napady padaczkowe osób z mutacjami w obrębie 19 i 20 powtórzenia spektrynowego, które wystąpiły w okresie niemowlęcym, wykazują zdecydowanie większą oporność na leczenie. Podczas, gdy osoby u których napady padaczkowe pojawiły się dopiero około 2 roku życia i z mutacjami zlokalizowanymi w 2, 3, 9, 11 i 14 powtórzeniu spektrynowym reagują znacznie lepiej na leczenie, ponieważ podanie leku prowadzi do ustąpienia napadów. Zdarzają się przypadki, w których leczenie prowadzi do ustąpienia skurczów i zatrzymania progresji zaburzeń rozwojowych na lekkim poziomie. Jednak w ogromnej większości sytuacji skurcze pozostają trudne do leczenia i odporne na zastosowane pojedyncze leki lub ich kombinacje, tylko niekiedy wykazują częściową lub tymczasową skuteczność w pewnych incydentach. Podobnie jak przy mutacjach punktowych napady padaczkowe towarzyszące mikrodelecjom również charakteryzują się opornością na leczenie (**Syrbe i in. 2017**).

Podsumowując stopień zaburzeń neurologicznych i napadów padaczkowych koreluje z rodzajem oraz lokalizacją mutacji, a także nieprawidłowościami strukturalnymi. Mutacje w obszarze genu *SPTANI* obejmują szerokie spektrum zaburzeń neurorozwojowych od łagodnych po ciężkie lub postępujące. Delecje mają łagodniejszy fenotyp niż duplikacje występujące w tym samym miejscu. Stosunkowo łagodne spektrum fenotypowe powiązane jest z wystąpieniem mutacji w 1-18 powtórzeniu spektrynowym u niemal połowy pacjentów. Mutacje zlokalizowane w obszarze kontaktu heterodimeru α i β spektryny prowadzą do poważnej i postępującej atrofii mózdzku, pnia mózgu i mózgu razem z hipomielinizacją oraz stanowią nieco ponad połowę wszystkich zdiagnozowanych przypadków. Identyfikacja heterozygotycznych wariantów *SPTANI* u pacjentów z HA i HSP potwierdza udział *SPTANI* w szerokim spektrum fenotypowym. Sama mutacja *SPTANI* segregująca się w obrębie tego samego pokrewieństwa, może skutkować znaczną zmiennością obrazu klinicznego. Asymetryczny rozkład pod względem liczby zgłoszonych wariantów może być spowodowany gorącym punktem mutacji w domenach 19 i 20, ale prawdopodobnie wynika również z faktu, że pacjenci z łagodniejszymi fenotypami są rzadziej diagnozowani lub ich przypadki publikowane. Znajomość profili klinicznych i obrazów rezonansu magnetycznego w encefalopatii *SPTANI* pomoże klinicystom przeprowadzać skuteczne testy genetyczne i identyfikować mutacje *SPTANI* (**Pavone i in. 2020; Syrbe i in. 2017; Tohyama i in. 2015; Morsy i in. 2023; Van de Vondel i in. 2022; Marco Hernández i in. 2022**).

Pacjenci z delecją w obszarze 9q33-q34 cechują się szerokim spektrum fenotypowym. Z powodu usunięcia wielu i w każdym przypadku różnych genów, ciężko określić wspólne charakterystyczne cechy dla osób z mikrodelecją w miejscu 9q33.3-9q34.11, przez co końcowy fenotyp wynika z ich kombinacji. Spektrum fenotypowe mikrodelecji można scharakteryzować następująco (Syrbe i in. 2017; Morrison-Levy i in. 2020; Saitsu i in. 2010; Campbell i in. 2012; Mastrangelo i Leuzzi 2012; Matsumoto i in. 2014; Nicita i in. 2015; Aravindhhan i in. 2018):

1. Głęboki niedorozwój psychoruchowy, upośledzenie umysłowe i intelektualne oraz opóźnienie w rozwoju.
2. Napady padaczkowe przybierają postać napadów tonicznych (np. toniczne skurcze zginaczy kończyn), spazmów niemowlęcych lub dziecięcych, padaczki lub skurczów mioklonicznych (zwłaszcza kończyn górnych). Napady padaczkowe mogą występować pojedynczo, wielokrotnie, obustronnie lub seryjnie. Obserwowana jest hipotonia ogólna, osiowa lub kończyn dolnych. Skurcze toniczne mogą się przekształcić w ogniskowe napady motoryczne. Mogą występować odruchy kostno-ścięgnowe. Zdarzają się też przypadki, w których nie zaobserwowano występowania napadów lub skurczów tonicznych lub innych cech padaczki. W niektórych przypadkach terapia może doprowadzić do ustąpienia napadów nawet po odstawieniu leków.
3. Zapis EEG w stanie spoczynku, czuwania i snu prezentował nieprawidłową organizację, był uproszczony, posiadał wielogniskowe skoki i fale oraz widoczne było spowolnienie aktywności tła. U dużej części pacjentów obecny jest wzór cisza-wyładowanie (ang. suppression-burst) odmiennym dla fazy snu i czuwania, ponadto w zapisie może pojawić się hipsarytmia. Również z wiekiem wyładowania mogą przekształcić się w hipsarytmię.
4. W rezonansie magnetycznym mózgu stwierdzono znaczny ubytek istoty białej, ciężką hipomielinizację i atrofię kory mózgowej oraz cienkie ciało modzelowate. Jednak w niektórych przypadkach dochodzi do nadrobienia mielinizacji lub nie obserwuje się zmian w strukturze mózgu lub odchyień w mielinizacji. Dodatkowo posiadały małowłowie.
5. Możliwość wystąpienia zaburzenia lub brak rozwoju/utrata mowy, wzorku (m. in. zez, astygmatyzm, zaćma, nadwzroczność) oraz słuchu - zdolności komunikacyjnych.
6. Niedorozwój motoryczny obejmujący kwadriplegię, osłabienie odruchów spontanicznych, hipotonię (kończyn górnych, osiową, tułowia), dystonia, problemy z utrzymaniem pozycji stojącej lub przeciąganiem oraz oczopląs rotacyjny. Progresa zaburzeń psychoruchowych. Brak kontroli pozycji i ruchów głowy, jak również brak umiejętności utrzymania postawy siedzącej. Niepoprawny odruch połykania, ślinotok

i potrzeba karmienia nosowo-żołądkowego przez sondę. Możliwość odzyskania kontroli nad głową, nabrania umiejętności do utrzymania pozycji siedzącej i zdolności połykania.

7. Cechy dysmorfii twarzy obejmują zwężenie i skośność szpar powiek, hipoplazję mięśnia trójkątnego, obniżenie kącików ust oraz szerokie usta, rozszczepem podniebienia i wargi, płaski grzbiet nosa, hiperteloryzm lub telekantus. Dysmorfia może ponadto dotyczyć powiększenia przepukliny pępkowej, malformacji nerkowo-moczowodowych (ureterocele), powiększenia miedniczki nerkowej lub podkowiastej nerki.

1.3.1. Wpływ mutacji na dimeryzację i powstawanie agregatów.

W chorobach neurodegeneracyjnych zaobserwowano występowanie zarówno agregatów jak i produktów rozpadu (proteolizy) spektryny, stąd obie formy mogą odgrywać rolę w encefalopatiach *SPTANI*. Zespół West'a cechujący się lekoopornymi napadami, czterokończynowym spastycznym porażeniem, małogłowiem, hipsarytmią, niepełnosprawnością umysłową, opóźnieniem rozwoju, hipomielinizacją oraz rozległą atrofią mózgu spowodowany jest mutacjami w genie α -II spektryny, które zaburzają formowanie się heterodimerów. W neuronach pacjentów zaobserwowano występowanie agregatów kompleksów spektrynowych (Syrbe i in. 2017; Mastrangelo i Leuzzi 2012; Wang i in. 2018). Cztery ostatnie powtórzenia spektrynowe są wymagane do prawidłowego składania heterodimerów. Większość zidentyfikowanych patogennych mutacji *SPTANI* u pacjentów z encefalopatią, np. EIEE5 lub o cięższym fenotypie, występuje w C-końcowym regionie w obrębie dwóch ostatnich (19 i 20) powtórzeń spektrynowych krytycznych dla heterodimeryzacji, czyli w obszarze istotnym dla asocjacji heterodimerów α/β spektryny i wskazuje, iż mutacje te zaburzają tworzenie się heterodimerów. Na skutek zaburzenia formowania heterodimerów dochodzi do agregacji białek z dominującym efektem negatywnym. Delecje lub duplikacje zaburzając tworzenie się kompleksów spektrynowych oraz funkcję dimeru spektryny, prowadzą do poważnej i postępującej atrofii mózdzku, pnia mózgu i mózgu razem z hipomielinizacją. Rezultatem tych dominujących negatywnych mutacji prowadzących do agregacji heterodimerów złożonych ze zmutowanych α -II spektryn oraz podjednostki β -II lub β -III spektryny jest niestabilność białek błonowych zlokalizowanych w AIS, zmiany w wewnątrzkomórkowym transporcie oraz zaburzenie cytoszkieletu. Zmutowana α -II spektryna może łączyć się z β spektryną na porównywalnym poziomie jak dzika α -II spektryna (Hamdan i in. 2012; Syrbe i in. 2017; Wang i in. 2018; Tohyama i in. 2015; Morsy i in. 2023; Rapaccini i in. 2018; Marco Hernández i in. 2022; Saitsu i in. 2010; Campbell i in. 2012). W przypadku wariantów p.Q2202del, p.E2207del, (Asp2303_Leu2305dup), p.(Gln2304_Gly2306dup) i p.(Arg2308_Met2309dup) zlokalizowanych w C-końcowej domenie genu *SPTANI* zmiany spowodowane mutacjami w *SPTANI* prowadzą do agregacji heterodimerów w pobliżu lub na błonie plazmatycznej

w aksonach i ciałkach komórek nerwowych oraz kolokalizacji z β -II i β -III spektryną, a także były powodem uszkodzenia rusztowania cytoszkieletu w AIS oraz skutkowały podwyższonym progiem potencjału czynnościowego (Saito i in. 2010; Syrbe i in. 2017; Hamdan i in. 2012; Tohyama i in. 2015). Częstotliwość agregatów w pierwotnych hodowlach neuronów obserwowano w 15-20% komórek dla mutacji p.Q2202del i około 95% dla p.E2207del zarówno z podjednostką β -II i β -III spektryny, podczas gdy dla wariantu p.R566P agregaty występowały w mniej niż 5% komórek i tylko z podjednostką β -II spektryny (Hamdan i in. 2012). Tworzenie się agregatów spektrynowych obserwowano również w fibroblastach z mutacjami pomiędzy Asp2303 i Met2309 w 20 powtórzeniu spektrynowym objawiającymi się ciężkim fenotypem klinicznym z neurodegeneracją (Marco Hernández i in. 2022). Powstawanie agregatów zauważono także w przypadku mutacji zmiany sensu p.(Arg19Trp) i (Arg566Pro). Nie wykryto agregacji spektryny w przypadku wariantów p.(Ala306Val) i p.(Asp2303_Leu2305del) jak również w sytuacji mikrodelecji (Syrbe i in. 2017; Morsy i in. 2023; Saito i in. 2010; Hamdan i in. 2012; Tohyama i in. 2015). Heterodimery zmutowanej α -II spektryny z β -II spektryną były termolabilne, a co za tym idzie mniej stabilne. Nie zauważono formowania się agregatów α -II/ β -IV spektryny (Saito i in. 2010). Duplikacje mają poważniejsze następstwa dla formowania się agregatów niż delecje. Nie wszystkie przypadki przejawiają takie same objawy i stopień ciężkości. Fenotypową heterogeniczność można wytłumaczyć zaangażowaniem patogennych wariantów *SPTANI* w różne mechanizmy. Warianty mutacji *SPTANI* występujące poza domenami wiążącymi spektryny są uważane za mniej dotkliwe klinicznie. Istnieją nawet przypadki zlokalizowane w obszarach krytycznych, które nie wykazują najpoważniejszego fenotypu. Podsumowując, stopień agregacji heterodimerów α -II/ β -II i α -II/ β -III spektryn koreluje z dotkliwością i nasileniem objawów klinicznych. Innym czynnikiem wpływającym na ciężkość objawów może być zdolność do tworzenia agregatów z β -III spektryną, która występuje obficie w mózgu lub od stosunku heterodimerów α -II/ β -II do α -II/ β -III. Duplikacje w ostatnim powtórzeniu spektrynowym zdają się być bardziej poważniejsze i mają gorszą prognozę niż delecje, gdyż prowadzą do wcześniejszego zgonu pacjentów. Mutacje zlokalizowane na C-końcu powodują cięższe fenotypy, w tym zespół West'a i są związane z charakterystycznymi wynikami MRI (Syrbe i in. 2017; Tohyama i in. 2015; Morsy i in. 2023; Marco Hernández i in. 2022; Hamdan i in. 2012).

1.3.2. Modelowanie strukturalne.

Przewiduje się, że mutacje zmiany sensu typu p.Gly178Asp, p.His1239Arg, p.Arg1610Trp, p.Arg2062Trp prowadzą do zaburzeń sterycznych na skutek, np. przerwania mostków solnych (Syrbe i in. 2017), z kolei warianty p.(Arg1464Trp) i p.(Arg2204Gln) wykazały mniej szkodliwy efekt strukturalny (Morsy i in. 2023). Podczas gdy dla wariantów p.Ala306Val

oraz p.Arg1776Trp nie przewiduje się występowania zawaad sterycznych (Syrbe i in. 2017), natomiast mutacje p.(Glu2271Lys), p.(Arg2124Cys) i p.(Ser2448Phe) nie wpływają na strukturę białka, ale prawdopodobnie zaburzają proces heterodymeryzacji α -II spektryny z β spektryną (Morsy i in. 2023). Mutacja zmiany sensu p.Arg19Trp powoduje utratę ładunku dodatniego i miała szkodliwy wpływ na strukturę białka, prawdopodobnie ze względu na umiejscowienie w N-końcowej części białka i domenie kluczowej dla tetrameryzacji, zapobiegając tworzeniu się heterotetramerów α/β spektryny w wyniku destabilizacji oddziaływań elektrostatycznych w miejscu heterotetrameryzacji, utraty mostka solnego tworzonego przez dodatnio naładowaną resztę Arg19 z resztą kwasu asparaginowego helisy β spektryny oraz konfliktu sterycznego z dwoma resztami leucyny w łańcuchu beta (Van de Vondel i in. 2022; Morsy i in. 2023). Utrata ładunku dodatniego spowodowana mutacją p.Arg1098Cys skutkuje zanikiem stabilizujących międzyhelikalnych oddziaływań elektrostatycznych w 10 powtórzeniu spektryny. Mutacja p.Arg1624Cys zlokalizowana w 14 powtórzeniu spektryny również zakłóca oddziaływanie elektrostatyczne z resztą Glu1549 na skutek utraty dodatniego ładunku. Z kolei mutacja p.Gln2205Pro prowadzi do utraty wiązania wodorowego z Cys2120 na początku 20 powtórzenia spektryny (Van de Vondel i in. 2022). Podsumowując, obserwacje te tworzą wspólny wzór mechanistyczny, sugerujący destabilizację powtórzeń spektryn poprzez zakłócenie oddziaływań elektrostatycznych lub wiązań wodorowych. Wykazano, że interakcje międzyhelikalne mają znaczenie w stabilizacji powtórzeń spektryny (Syrbe i in. 2017; Morsy i in. 2023; Van de Vondel i in. 2022).

1.4. Modele zwierzęce ludzkich spazmów niemowlęcych i α -II spektrynopatii.

Liczba genów zaangażowanych w patogenezę spazmów niemowlęcych m. in. zespół West'a, dziedzicznych neuropatii ruchowych lub dziedzicznej paraplegii spastycznej stale wzrasta, dzięki sekwencjonowaniu całego egzomu i genomu. Odkrycie tych genów (ARX, CADM3, CDKL5, DCX, FOXP1, GRIN1, GRIN2A, LIS1, MAGI2, MEF2C, NR2F1, SCO2, SLC25A22, SORD, STXBP1, TDRKH, TSC1/2) znacząco zmieniło wiedzę na temat patofizjologii wspomnianych zespołów chorobowych, rozszerzając spektrum procesów komórkowych w nich uczestniczących. Wśród tych genów znajduje się również gen *SPTAN1* kodujący α -II spektrynę i wyróżniający się na tle pozostałych genów, ponieważ został powiązany ze wszystkimi trzema jednostkami chorobowymi. Osiągnięcia prowadzące do lepszego zrozumienia przyczyny wspomnianych chorób były możliwe i głównie napędzane rozwojem modeli funkcjonalnych – komórkowych (również wykorzystujące komórki pacjentów) i zwierzęcych, które stanowią platformę i swoisty punkt wyjścia do dalszych badań (Lux 2013; Dohrn, Saporta 2020; Dulla 2018).

Ze względu na brak dostępnych modeli zwierzęcych, które dostarczałyby również tkanek do badań, często wykorzystuje się zmodyfikowane metodami inżynierii genetycznej popularne linie komórkowe lub bezpośrednio linie komórkowe wyprowadzone z tkanek pacjentów jako platformy do poznania patomechanizmu i rozwoju terapii. Jednakże uzyskane linie komórkowe mają pewne ograniczenia. Hodowle komórkowe tworzą dwuwymiarową sieć, która nie odzwierciedla złożonej sieci neuronów w nienaruszonym mózgu. W dodatku hodowle neuronów mogą nie wykazywać ekspresji wszystkich białek lub na takim poziomie jak neurony w mózgu. Stąd zwierzęce modele napadów niemowlęcych są kluczowym elementem opracowywania nowych terapii i zrozumienia mechanizmu patologii (**Lux 2013; Dohrn, Saporta 2020; Coppola, Moshé 2012; Dulla 2018**).

Prawidłowe modelowanie choroby u gryzoni wymaga zrozumienia jej etiologii, co w przypadku wymienionych zespołów ze względu na ilość genów, które z nimi powiązано nie jest łatwe. Dodatkowo poza czynnikiem genetycznym przyczyną spazmów niemowlęcych mogą być stany niedotlenieniowo-niedokrwienne, zaburzenia metaboliczne lub naczyniowe, infekcje, urazy oraz wady rozwojowe mózgu (**Dulla 2018; Stafstrom, Holmes 2002**).

Spazmy niemowlęce należące do encefalopatii padaczkowych, spośród których jako pierwszy rozpoznano zespół West'a, definiuje szereg unikalnych cech klinicznych określanych jako tzw. triada - skurcze niemowlęce, zatrzymanie rozwoju psychomotorycznego i hipsarytmia w zapisie EEG. Choroba rozpoczyna się od wystąpienia skurczów w pierwszym roku życia, najczęściej około 3-4 miesiąca o różnej etiologii, które następnie przekształcają się w napady padaczkowe w formie nagłych skurczów lub ciężkich mioklonii zginaczy i prostowników mięśni osiowych i kończyn. Napady te są często lekooporne i większość leków przeciwpadaczkowych jest nieskuteczna, co w połączeniu z ograniczonymi możliwościami terapeutycznymi oraz znacznym działaniem ubocznym, przekłada się na złe rokowania dla niemowląt. Jako leki pierwszego wyboru najczęściej stosuje się hormon adrenokortykotropowy razem z wigabatryną (strukturalnym analogiem kwasu γ -aminomasłowego). Stąd wynika potrzeba opracowania nowych strategii leczenia napadów niemowlęcych, dla których kluczowe są modele zwierzęce. Kolejną cechą zespołu West'a i IS jest obecność hipsarytmii w obrazie EEG, czyli chaotycznego sygnału o dużej amplitudzie. Całość cech/objawów prowadzi do zaburzeń neurorozwojowych lub deficytów poznawczych. Brak ważnego, wystandaryzowanego modelu zwierzęcego, który spełniałby wszystkie kryteria określone dla modelu napadów niemowlęcych utrudnia poznanie patogenezы napadów padaczkowych (**Dulla 2018; Coppola, Moshé 2012; Galanopoulou, Moshé 2015; Cortez i in. 2009; Stafstrom, Holmes 2002**).

Głównym zadaniem modelu jest wyjaśnienie procesu patofizjologicznego i zbadanie, w jaki sposób różne etiologie prowadzą do ustalonego zestawu objawów klinicznych. Kryteria wymagane w prawidłowym modelu można podzielić na: minimalne (zależność od wieku, problemy poznawcze, odpowiedź na leczenie hormonem adrenokortykotropowym), optymalne (spontaniczne spazmy rozpoczynające się w okresie poporodowym, hipsarytmia, zaburzenie zdolności poznawczych) i idealne. Wykorzystując ludzkie ramy kliniczne idealny zwierzęcy model powinien naśladować cechy, które można znaleźć u niemowląt, ale które są trudne do uwzględnienia w badaniach na ludziach, tym samym prezentować napady behawioralne na etapie niemowlęcym, które przekształcają się w późniejszym etapie w napady padaczkowe. Kolejną cechą jaką powinien odznaczać się taki model jest występowanie napadowych i międzynapadowych zaburzeń w obrazie EEG w postaci hipsarytmii ze specyficznym początkiem podczas czuwania lub pobudzenia, ale jednocześnie które nie zawsze występują w każdym przypadku. Napady padaczkowe powinny wykazywać lekooporność taką samą lub podobną do tej występującej u pacjentów, co umożliwi testowanie nowych podejść terapeutycznych i ich zestawienie ze standardowymi sposobami leczenia. U zwierząt powinno być obserwowane zaburzenie rozwoju i funkcji poznawczych, które można w łatwy sposób ocenić oraz porównać podczas stosowania różnych nowych terapii. Stworzenie jednego uniwersalnego modelu dla napadów niemowlęcych jest niemożliwe ze względu na liczbę genów, które zostały powiązane z jednostką chorobową oraz różnice gatunkowe, które nie pozwalają na skopiowanie wszystkich cech. Obecnie żaden model IS nie naśladuje wszystkich pożądanych cech, ale każdy z nich posiada intrygujące podobieństwa, które dostarczają hipotez dla przyszłych badań i umożliwiają uzyskanie przydatnych informacji o patofizjologii. W oparciu o opisane powyżej założenia teoretyczne zaproponowano kilka modeli (**Dulla 2018; Marsh, Golden 2009; Stafstrom, Holmes 2002**).

Przed opracowaniem lub uznaniem zwierzęcego modelu napadów niemowlęcych należy rozważyć szereg następujących kryteriów (**Stafstrom, Holmes 2002; Marsh, Golden 2009; Cortez i in. 2009**):

1. Wiek – napady padaczkowe powinny być zależne od wieku i muszą wystąpić w określonym oknie czasowym. Skurcze z reguły nie występują bezpośrednio u noworodków, co wskazywałoby, że mózg wymaga jeszcze ukształtowania na tym etapie, ale pojawiają w pierwszym roku życia, przy czym najczęściej pomiędzy drugim a czwartym miesiącem. Istnieje zatem dolna i górna granica wiekowa podatności na spazmy i napady padaczkowe (miokloniczne), które powinny wystąpić w wieku odpowiadającym okresowi noworodkowemu, a następnie trwały przez całe życie zwierzęcia.

2. Charakter spazmów i napadów – zarówno skurcze jak i napady padaczkowe mają u niemowląt charakter spontaniczny i przewlekły, a zatem najlepiej jeśli w modelu zwierzęcym również mają charakter spontaniczny i przewlekły, chociaż istnieje możliwość wywołania napadów czynnikami chemicznymi, farmakologicznymi, stymulacją elektryczną lub przez inne czynniki zewnętrzne. Powinny być zgrupowane w fazach przejściowych snu – zasypianie i zaraz po przebudzeniu. Ważna jest również częstotliwość i czas trwania napadów.
3. Cechy EEG – w zapisie powinna być obserwowana hipsarytmia w fazie międzynapadowej, odzwierciedlająca asynchroniczne uaktywnienie dużych obszarów kory mózgowej.
4. Zaburzenie rozwoju – w wielu przypadkach następuje zahamowanie lub regresja rozwoju, a dodatkowo jeszcze zanim wystąpią napady padaczkowe. Upośledzenie może mieć postać behawioralną, neurorozwojową, poznawczą lub psychomotoryczną.
5. Odpowiedź na leczenie – większość napadów padaczkowych reaguje na terapię z udziałem hormonu adrenokortykotropowego i/lub wigabatryny. Wiarygodność zwierzęcego modelu byłaby większa, gdyby napady padaczkowe odpowiadały na ACTH, ale nie jest to bezwzględny kryterium.
6. Etiologia – przyczyny spazmów niemowlęcych mogą być genetyczne, prenatalne, okołoporodowe lub poporodowe. Szeroka etiologia sugeruje, iż może istnieć wspólna ścieżka.

Istnieje wiele różnic między gatunkami, które utrudniają przeniesienie wyników badań uzyskanych dla gryzoni na ludzi. Mózg dorosłych gryzoni i ludzi znacznie się różni fałdowaniem i wielkością struktur, co sprawia, że mózg dorosłego gryzonia będzie bardziej odpowiadał niedojrzałemu ludzkiemu, a także myszy rodzą się na przedwczesnym etapie rozwoju mózgu, stąd odwzorowanie wiekowe mózgu jest trudne do przeniesienia w modelach (**Marsh, Golden 2009; Galanopoulou, Moshé 2015**). Poza tym długość życia myszy wynosi około 2 lat. W przypadku porównywania skurczów i napadów modeli należy ponadto zwrócić uwagę na minimalną intensywność bodźca wymaganą do wywołania wyładowania, minimalny bodziec wymagany do wywołania napadu behawioralnego, okres pomiędzy wystąpieniem pierwszego i kolejnych napadów oraz ich czas, dokładny opis zachowania charakteryzującego napad padaczkowy w funkcji wieku (**Coppola, Moshé 2012**). Oprócz tego ekstrapolację metod leczenia lub hipotez utrudniają czynniki środowiskowe lub epigenetyczne.

Istnieją dwie ogólne klasy modeli zwierzęcych: genetyczne i nabyte (indukowane), które dotyczą padaczek i encefalopatii padaczkowych charakterystycznych dla noworodków i niemowląt. Modele nabyte powstają na skutek wystawienia zwierząt na działanie różnych czynników

chemicznych lub farmakologicznych, które najczęściej przenikają do rozwijającego się mózgu, wywołując fenotypy podobne do spazmów niemowlęcych. Uzyskane w ten sposób ogólne modele stosunkowo dobrze naśladują objawy towarzyszące ludziom, ale nie pozwalają dokładniej poznać mechanizmów. Zadaniem modeli genetycznych jest przeniesienie ludzkich mutacji genetycznych do zwierząt i uzyskanie fenotypu zbliżonego dla ludzkiej choroby. Wśród nich największy problem stanowią modele genetyczne, które pomimo powielenia ludzkiej mutacji, nie wykazują skurczów ani napadów padaczkowych. Model zwierzęcy powinien naśladować zarówno etiologię oraz wrażliwość na środki farmakologiczne, co daje możliwość testowania nowych potencjalnych terapii w środowisku przedklinicznym (Dulla 2018; Galanopoulou, Moshé 2015).

Dostępne genetyczne modele przewlekłych napadów/spazmów niemowlęcych to (Dulla 2018; Galanopoulou, Moshé 2015; Coppola, Moshé 2012; Lux 2013; Marsh, Golden 2009):

1. Mysi model ze wstawką w genie $Arx^{(GCG)10+7}$ – wygenerowany poprzez dodanie 7 kodonów alaniny. Myszy $Arx^{(GCG)10+7}$ wykazują skurcze behawioralne zaraz po urodzeniu i napady padaczkowe w późniejszym wieku, zaburzony i ulegający zmianie z wiekiem obraz EEG, zaburzenia funkcji poznawczych i równowagi oraz upośledzenie umysłowe. Około drugiego miesiąca pojawia się spazmy niemowlęce, odruchy kloniczne i kołysanie głową oraz mogą wystąpić napady toniczno-kloniczne. Nie udokumentowano u nich hipsarytmii oraz nie jest znana odpowiedź na hormon adrenokortykotropowy lub wigabatrynę.
2. Mysi model warunkowego nokautu Arx – powstały na skutek usunięcia genu z komórek wykazujących ekspresję $DLX5/6$. W drugim tygodniu życia myszy prezentują napady behawioralne i zatrzymanie zachowania oraz nieprawidłowości w korowym zapisie EEG. W przypadku szczurów najpierw występują skurcze kończyn, które u dorosłych przybierają postać epizodów przypominających spazmy.
3. Mysi model warunkowego nokautu APC . Fenotyp odznacza się silnymi skurczami behawioralnymi i nieczęstymi zgrupowanymi napadami, zaburzonym zapisem EEG, klonusem kończyn przednich, zatrzymaniem zachowania (zastygnięciem w bezruchu), kołysaniem głową i sztywnieniem ogona.
4. Model myszy ($Tsc1+/-$) – napady mają charakter toniczno-kloniczny oraz występuje nieprawidłowy obraz EEG.

Wśród nabytych modeli przewlekłych lub ostrych napadów/spazmów niemowlęcych wymieniane są (Dulla 2018; Cortez i in. 2009; Galanopoulou, Moshé 2015; Lux 2013; Coppola, Moshé 2012; Marsh, Golden 2009; Scantlebury i in. 2010; Stafstrom, Holmes 2002):

1. Szczurzy model podania tetrodotoksyny – polegający na jednostronnym wlewie blokera kanału sodowego tetrodotoksyny do hipokampa szczurów w wieku od 10 do 40 dni. Napady padaczkowe rozpoczynają się mniej więcej po tygodniu od infuzji i występują u około 1/3 zwierząt. Ponadto jest to jedyny model prezentujący hipsarytmię w zapisie EEG. Model reaguje na leczenie wigabatryną, ale brak danych na temat hormonu adrenokortykotropowego.
2. Szczurzy model wielokrotnej interakcji czynników – trzydniowe młode szczury Sprague-Dawley otrzymują jednostronnie do komory bocznej mózgu doksorubicynę i lipopolisachard, a następnie w piątym dniu dootrzewnowo chlorofenyalaninę, co powoduje zmiany strukturalne w mózgu i prowadzi do skurczów w 4-7 dniu oraz ich zaniku w 13 dniu u około 2/3 przypadków. Skurcze nie zawsze korelują z wystąpieniem zmian w EEG. Napady padaczkowe mają charakter kloniczny lub toniczno-kloniczny. W dodatku występuje upośledzenie neurorozwojowe (pamięci i uczenia się), funkcji poznawczych i towarzyskich, co przypomina zaburzenia ze spektrum autyzmu, które towarzysza IS. Reagują na leczenie wigabatryną, ale nie hormonem adrenokortykotropowym. Zastosowanie w badaniach przesiewowych leków.
3. Myszy z trizomią traktowane γ -butyrolaktonem (baklofenem) – wykorzystujący myszy Ts65Dn, które nie przejawiają napadów behawioralnych, ale wykazują znaczny wzrost ekspresji białka receptora kwasu gamma-aminomasłowego B we wzgórzu i rdzeniu przedłużonym. Traktowanie myszy Ts65Dn agonistą receptora skutkuje fenotypem przypominającym skurcze niemowlęce oraz wystąpieniem zmian w EEG, jednak napady padaczkowe nie występują samoistnie ani przewlekłe.
4. Szczurzy model podania hormonu uwalniającego kortykotropinę – model uzyskuje się poprzez dootrzewnowe lub wewnątrzkomorowe wstrzyknięcie hormonu dwutygodniowym osobnikom. Wywołuje to ciężkie napady padaczkowe typu limbicznego odporne na działanie hormonu adrenokortykotropowego. Hipsarytmię obserwują się w okresie międzynapadowym, a w trakcie napadu tłumienie lub wzrost aktywności. Zwierzęta wykazują również deficyty poznawcze, uczenia się i pamięci.
5. Szczurzy model chronicznego wczesnego stresu – powstaje poprzez mieszanie noworodków różnych miotów w klatkach z ograniczoną ilością materiału do gniazdowania i ściółki. Skurcze pojawiają się u około 50% i towarzyszą im zmiany w zapisie EEG, ale napady padaczkowe w późniejszym etapie życia występują już tylko u 10%.
6. Szczurzy model podania kwasu N-metylo-D-asparaginowego – w wyniku dootrzewnego podania substancji pomiędzy 12 a 18 dniem życia. Objawia się skurczami tonicznymi całego ciała.
7. Szczurzy model wykorzystujący prenatalne podanie betametazonu oraz postnatalne kwasu N-metylo-D-asparaginowego – podanie betametazonu w 15 dniu ciąży oddziałuje

na oś podwzgórze-przysadka-nadnercza i ma na celu uwrażliwienie mózgu na poporodową ekspozycję na kwas.

Przedkliniczne modele napadów niemowlęcych są szczególnie ważne dla rozumienia wciąż niepoznanych patofizjologicznych podstaw napadów, postępów terapeutycznych (badania przesiewowe, nowe metody leczenia), a także bardzo pomocne w wypracowaniu strategii zapobiegania następstwom neurologicznym (deficyty poznawcze i intelektualne). Niemowlęce spazmy są w dużej części osobliwym schorzeniem i mogą wymagać podejścia medycyny precyzyjnej oraz celowanej terapii zamiast leczenia ogólną ścieżką, a brak modelu zwierzęcego do badania unikalnych zespołów jest czynnikiem ograniczającym, który częściowo wynika z unikalnych cech ludzkiego mózgu na etapie rozwoju, na którym występuje ten zespół. Już można zaobserwować nowe leki ukierunkowane na mechanizmy zidentyfikowane we wspomnianych modelach, co daje nadzieję na przyszłość **(Dulla 2018; Coppola, Moshé 2012; Stafstrom, Holmes 2002; Galanopoulou, Moshé 2015)**.

Obecnie wiele grup badawczych stara się uzyskać modele myszy z mutacjami w genach ryzyka IS, ale wygenerowane modele nie zostały zweryfikowane jako modele dla IS lub EIEE. Dotyczy to również genu *SPTAN1*. W trakcie badań nad α -II spektryną w kontekście wpływu na układ nerwowy i badań nad przyczynami spazmów niemowlęcych m. in. zespół West'a lub dziedzicznych neuropatii ruchowych wykorzystano modele komórkowe, zwierzęce oraz rekombinowane białka. W badaniach z użyciem modelu danio pręgowanego z mutacją w α -II spektrynie wykazano, iż białko α -II spektryny odgrywa kluczową rolę w prawidłowym procesie mielinizacji nerwów, którego mutacje upośledzają mielinizację zwłaszcza aksonów nerwów grzbietowych rdzenia kręgowego (centralny układ nerwowy) i ruchowych (obwodowy układ nerwowy) **(Saito i in. 2010; Writzl i in. 2012; Campbell i in. 2012; Tohyama i in. 2015; Aravindhan i in. 2018)**, zaburzają rozwój przewężeń Ranviera, odpowiadają za destabilizację kanałów sodowych bramkowanych napięciem szczególnie w rejonie przewężeń Ranviera **(Tohyama i in. 2015; Leveille i in. 2019)** wynikiem, czego jest zaburzenie integralności aksonów z osłonką mielinową. Funkcje pourodzeniowe α -II spektryny pozostają słabo poznane, gdyż jej niedobory są śmiertelne dla larw **(Huang i in. 2017a)**.

Do badań nad α -II spektryną, wykorzystano również model *Drosophila melanogaster*, którego delecja również jest letalna dla późnego stadium embrionu i wczesnego stadium larwalnego. Utrata α -II spektryny skutkuje błędnym rozmieszczeniem β spektryny i prowadzi do zaburzenia rozwoju neurytów i aksonów, a dokładniej zmiany długości AIS, lecz nie wpływa na jego tworzenie **(Stankewich i in. 2011; Wang i in. 2018)**.

Kolejnym modelem użytym do badań był *Caenorhabditis elegans*, dla którego delecja α -II spektryny także okazała się śmiertelna dla późnego stadium embrionu i wczesnego stadium larwalnego. U *C. elegans* z niedoborem α -II spektryny zaobserwowano częste pęknięcia aksonów z chaotyczną naprawą, co było spowodowane przez siły mechaniczne powstające podczas ruchu (Stankewich i in. 2011; Huang i in. 2017b).

Badania funkcji α -II spektryny in vivo z udziałem gryzoni stanowią wyzwanie z powodu braku właściwych modeli lub niewielkiej ich liczby, a co ważniejsze śmiertelności genotypu *Sptan1*^{-/-} już na etapie embrionalnym, co wyklucza badania fizjologii i zachowania oraz określenie wpływu na integralność i funkcje neuronów. Do tej pory nie ma modeli ssaków opisujących nokaut α -II spektryny (Wang i in. 2018; Metral i in. 2009). Jeden z pierwszych mysich modeli do badań wpływu mutacji na α -II spektrynę zaprezentował w 2011 roku zespół Stankewich'a i in., których fenotyp był bardzo zbliżony do fenotypu myszy z niedoborem β -II spektryny. Uzyskany w wyniku wstawienia obcego eskonu kodującego β -galaktozydazę do mysiego genu *Spna2*, na skutek czego powstaje skrócona od 1153 kodonu (10 powtórzenie spektrynowe) α -II spektryna (Stankewich i in. 2011). W modelu tym embriony o genotypie *Sptan1*^{-/-} umierały pomiędzy 12. a 16. dniem w macicy w efekcie wad rozwojowych układu sercowego i cewy nerwowej. Oprócz tego u embrionów *Sptan1*^{-/-} widoczne były anomalie twarzoczaszki i opóźniony rozwój (mniejsze rozmiary). Do obserwowanych wad serca należało poszerzenie serca, nieprawidłowy kształt serca i jego komory, zmniejszenie zagęszczenia mięśni sercowych oraz 30% spadek grubości serca. Zaś zmiany w obrębie głowy obejmowały zaburzenie krzywizny głowy, nieprawidłowe wykształcenie trzewioczaszki, powiększenie pierwotnych pęcherzyków mózgowych i zmniejszenie pęcherzyka śródmózgowia, zwyrodnienie przodomózgowia i komory bocznej. Poza tym odnotowano skrócenie AIS i aksonów. Jednak nie każdy homozygotyczny embrion prezentował wszystkie zaburzenia. Poziomy białek α -II, β -II i β -III spektryny u myszy *Sptan1*^{-/-} obniżyły się o 80% w stosunku do poziomów obserwowanych u myszy dzikich bez zmiany poziomu ich ekspresji, obniżeniu uległ także poziom ankiryln. Nie zmienił się natomiast poziom białek α -I oraz β -I spektryny jak również takich białek jak VASP, Abi i 14-3-3. Tymczasem myszy heterozygotyczne (*Sptan1*^{+/-}) nie przejawiały żadnego fenotypu nawet w wieku 2 lat i były nie do odróżnienia od zwierząt typu dzikiego (Stankewich i in. 2011; Wang i in. 2018). Fibroblasty embrionów *Spna2*^{-/-} miały nieprawidłową kolczastą morfologię, zaburzoną proliferację, migrację i adhezję oraz nieliczne lamellipodia, ale nie przejawiały zwiększonej apoptozy.

Inny model myszy *Spna2tm1.1Gnic* został pozbawiony trzech eksonów kodujących miejsce cięcia dla kaspazy i kalpajny oraz domeny wiążącej kalmodulinę (Kassa i in. 2012). Myszy te nie posiadały produktów rozpadu α -II spektryny. Zarówno myszy *Spna2tm1.1Gnic* jak i dzikie

prezentowały normalny fenotyp. Nie odnotowano zmian w morfologii rdzenia kręgowego, strukturach układu nerwowego czy też nerwów obwodowych oraz kulszowych. Mutacja nie wpłynęła także na integralność cytoszkieletu. Nie zaobserwowano również deficytów motorycznych.

Następnym wygenerowanym modelem był mysi model posiadający delecję α -II spektryny w centralnym układzie nerwowym (**Huang i in. 2017a**). Fenotyp odznaczał się śmiertelnością w ciągu pierwszego miesiąca życia, wykazywał uogólnione ciągłe drgawki i napady padaczkowe, prawidłowy obraz EEG, zaburzenia neurologiczne, ogólną neurodegenerację (powszechna obecność białka prekursorowego β -amyloidu w korze, mózdzku i wzgórzu), zaburzonym AIS, dystalną część aksonu, węzłami Ranviera i laminacją korową, a także wyraźnym ubytkiem komórek Purkinje'go oraz upośledzoną migrację neuronów. Ponadto myszy te były mniejsze i posiadały mniejsze mózgi z powiększonymi komorami. Nie wykryto kompensacji ze strony α -I spektryny. Poziom wszystkich β spektryn został znacząco zmniejszony. Na podstawie tego modelu stwierdzono, iż α -II spektryna jest wymagana do prawidłowego składania AIS, laminowania kory, pobudliwości neuronów i do ochrony przed neurodegeneracją. Drugi model myszy posiadał niedobór α -II spektryny w obwodowych neuronach czuciowych, komórkach Schwanna oraz korzeniach grzbietowych (**Huang i in. 2017b**). Nocycepcja i aksony o małej średnicy nie były zaburzone, ale aksony o dużej średnicy miały niepoprawną mielinizację, co spowodowało ciężką ataksję. Poziom β spektryn był znacznie zredukowany. Homozygoty umierały w przeciągu trzech tygodni od urodzenia i wykazywały drgawki, zaburzony AIS oraz rozległą degenerację aksonów, dodatkowo wykazywały odruch zaciskania kończyn tylnych (**Leveille i in. 2019**), niemniej ich zdolność do wizenia na drucie była znacznie obniżona.

Wang i in. przeprowadzili *in vivo* delecję *SPTANI* w neuronach korowych embrionów szczura oraz w neuronach hipokampa embrionów myszy. Chociaż transfekcja spowodowała w embrionalnych neuronach utratę wszystkich β spektryn, ankiryny-G oraz zatracenie lub wyraźne zmniejszenie długości i liczby dendrytów, zmniejszenie częstotliwości miniaturowych hamujących prądów postsynaptycznych (osłabienie unerwienia hamującego) oraz powstawanie kompleksów agregatów spektrynowych, to komórki migrowały prawidłowo (**Wang i in. 2018**).

Do zbadania pozostaje wciąż rola α -II spektryny w sercu, toteż następny model został stworzony w tym celu przy wykorzystaniu systemu Cre-flox i posiada nokaut α -II spektryny specyficzny dla kardiomiocytów (**Lubbers i in. 2019**). Fenotyp myszy wykazywał arytmie, zwłóknienie serca i śmiertelność w odpowiedzi na stres spowodowane zmianami strukturalnymi, komórkowymi i elektrofizjologicznymi serca, które były wzmacniane przez stres fizjologiczny i patologiczny. W kardiomiocytach doszło do rearanzacji, podwyższenia poziomu i ekspresji α -I spektryny oraz

zmiany rozmieszczenia i obniżenia poziomów β -spektryn (β -I o 78% a β -II o 93%). A-I spektryna przejęła rolę kompensacyjną. Obniżeniu ekspresji ulega również kanał bramkowany napięciem Nav1.5 i K⁺. Zaobserwowano przerost kardiomiocytów bez wpływu na masę serca. Objętość wyrzutowa była zasadniczo obniżona. Zwłóknienie serca i spadek frakcji wyrzutowej serca były zależne od wieku, natomiast nie zaburzenia elektrofizjologiczne. Zakłócenia aktywności elektrycznej poprzedzały fenotypy strukturalne i funkcjonalne serca. Stwierdzono zmianę czasu trwania, zwiększenie amplitudy i problemy w inicjacji potencjału czynnościowego miocytów. A-II spektryna pełni krytyczną rolę w stabilizacji sieci spektrynowej kardiomiocytów, elektrofizjologii serca, regulacji kanałów jonowych i odpowiedzi na stres (**Lubbers i in. 2019**).

Ostatnio uzyskano myszy model z nokautem α -II spektryny swoistym dla komórek rzęsatych narządu Cortiego (**Yao i in. 2022**). U myszy tych zdiagnozowano wczesną głuchotę (zwłaszcza ubytek słuchu w zakresie niskich częstotliwości), szybko postępujący zanik zewnętrznych komórek rzęsatych szczególnie w środkowych i wierzchołkowych zwojach ślimaka w wyniku apoptozy, anomalie w tworzeniu stereocili i płytek naskórka, zaburzenie polaryzacji i architektury stereocili oraz aktywowaną kaspazę-3. Ekspresja *SPTANI* była obniżona oraz obserwowano postępującą utratę tego białka wraz z wiekiem. Wykazano, iż α -II spektryna pełni zasadniczą rolę w morfologii i funkcjonowaniu stereocili komórek rzęsatych kontrolując tworzenie oraz sygnalizację ogniskowej adhezji i integryny.

W celu ominięcia śmiertelności prenatalnej dla modeli EIEE pomocne może okazać się połączenie edycji genomu gryzoni in vivo i ludzkich modeli indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, gdyż nadekspresja patogennych ludzkich mutacji *SPTANI* w mysich neuronach hipokampa i korowych wywołuje zaburzenia i daje wyniki podobne do tych obserwowanych w neuronach wygenerowanych z komórek macierzystych pochodzących od pacjentów (**Wang i in. 2018**). Hodowle korowych mysich neuronów ze zwiększoną ekspresją zmutowanych form α -II spektryny oraz komórek limfoblastoidalnych pacjentów wykorzystano w badaniach nad tworzeniem heterodimerów, agregacją, rozmieszczeniem ankiryiny-G i VGSC oraz potencjałem czynnościowym (**Saito i in. 2010; Syrbe i in. 2017; Hamdan i in. 2012**). Komórki mysiej neuroblastomy N2A oraz pierwotne hodowle mysich neuronów korowych użyto do porównania wzorca ekspresji i profilu agregacji zmutowanych form α -II spektryny (**Tohyama i in. 2015; Hamdan i in. 2012**). Na fibroblastach pozyskanych od pacjentów z mutacjami w obrębie α -II spektryny testowano podatność do formowania agregatów, na cięcie oraz apoptozę i autofagię jak również ekspresję białka (**Syrbe i in. 2017; Morsy i in. 2023**). Nowotworowe linie komórkowe z obniżoną ekspresją *SPTANI* wykorzystywane są również w badaniach nad wpływem α -II spektryny na zdolność do przerzutów, proliferację, adhezję, ruchliwość, a więc progresję nowotworów i jako potencjalny kandydat do terapii celowanej lub marker

agresywności (**Ackermann i in. 2019**). Rekombinowane białka α -II spektryny z mutacjami obserwowanymi u pacjentów zostały wykorzystane do oceny tworzenia heterodimerów i agregatów (**Saito i in. 2010**).

W przypadku modelu myszy z nokautem β -III spektryny opisano postępującą utratę komórek Purkiniego w mózdku, niewłaściwą morfologię neuronów (zwłaszcza części dendrytycznej), bardzo wczesną ataksję mózdkową oraz zaburzenia zdolności do rozpoznawania przedmiotów i pamięci (**Lise i in. 2012**). β -III spektryna wykazywała błędną lokalizację w korze przedczołowej. Nie zaobserwowano zmian w ciele modzelowatym. Myszy przejawiały zaburzenia behawioralne oraz pamięciowo-poznawcze.

2. Materiały i metody.

2.1. Materiały.

2.1.1. Odczynniki.

Tabela 1. Wykaz odczynników chemicznych, enzymów oraz komercyjnych zestawów odczynników wykorzystanych do realizacji pracy.

Odczynnik ogólne	Producent
Tris	Fluka, LabEmpire
NP-40	Sigma-Aldrich, IITD
Na-deoxycholate	Sigma-Aldrich
NaCl	Stanlab
EDTA	Sigma-Aldrich
Glicyna	LabEmpire
SDS	POCH, LabEmpire
MilliQ	IITD
Metanol	POCH, Chempur
Tween 20	Sigma-Aldrich
Akrylamid 29:1	Sigma-Aldrich
APS	Serva, POCH
TEMED	Sigma-Aldrich
Luminol	Sigma-Aldrich
Kwas kumarynowy	Sigma-Aldrich
Perfect™ Tricolor Protein Ladder	EUR _x ®
Perfect™ Color Protein Ladder	EUR _x ®
Perfect Plus 1 kb DNA Ladder	EUR _x ®
TMB	BioShop
Kwas siarkowy	POCH
Dulbecco's Modified Eagle Medium	IITD
FBS	EUR _x
β-merkaptotanol	Sigma-Aldrich, LabEmpire
DMSO	Sigma-Aldrich
L-glutamina (200mM)	Thermo Scientific
Penicillina-Streptomycyna	Sigma-Aldrich
Non-essential amino acids	Sigma-Aldrich
Błękit bromofenolowy	Sigma-Aldrich
Glicerol	Chempur, POCH

Triton X-100	Serva
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Protease Inhibitor Cocktail P8340	Sigma-Aldrich
RNazy A	EUR _x ®
pHrodo™ BioParticles™ Phagocytosis Kits	Invitrogen
Calpain Activity Assay Kit	Abcam
Proteome Profiler™ Array Mouse Angiogenesis Array Kit	R&D Systems
Murine IFN- γ Single-Color Enzymatic ELISPOT Assay	CTL ImmunoSpot
Owoalbumina	Sigma-Aldrich
Sigma Adjuvant System	Sigma-Aldrich
Culture-Insert 4 Well in μ -Dish 35 mm	ibidi
Membrana PVDF	Merck
Bibuła Whatman	Whatman
Tusz do znaczenia łap	Astra
Anty-mysie IgG HRP	SantaCruz, Thermo Scientific
Jodek propidyny	Sigma
Anty- α -II spektyna	Merck
Anty- β -III spektryna	Merck

2.1.2. Bufory, roztwory i pożywki.

Tabela 2. Skład buforów wykorzystanych do realizacji pracy.

Bufor/Roztwór/Pożywka	Odczynnik	Ilość / Stężenie
Bufor Laemmliego (5x)	SDS	5%
	Błękit bromofenolowy	0,5%
	β -merkaptioetanol	5%
	Glicerol	50%
	0,5M Tris-HCl pH 6,8	1,75 ml (87,5 mM)
	H ₂ O MQ do 10 ml	
Bufor do elektroforezy SDS-PAGE (5x)	Tris	15,1 g (125 mM)
	10% SDS	50 ml (0,5%)
	Glicyna	94 g (1,25 M)
	H ₂ O dest do 1000ml	
Bufor do lizy tkanek/komórek	Tris H-Cl pH 7,4	50 mM
	NP-40	1%
	Na-deoxycholate	0,25 %
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM

	H ₂ O MQ		
Żel poliakrylamidowy rozdzielający		12% żel	7% żel
	MQ	2,15 ml	2,775 ml
	40% akrylamid	1,5 ml	0,875 ml
	Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml	1,25ml
	10% SDS	50 µl	50 µl
	10% APS	50 µl	50 µl
	TEMED	5 µl	5 µl
Żel poliakrylamidowy zagęszczający		5% żel	4% żel
	MQ	1,83 ml	1,95 ml
	40% akrylamid	0,325 ml	0,250 ml
	Tris-HCl pH 6,8	0,325 ml	0,325 ml
	10% SDS	25 µl	25 µl
	10% APS	25 µl	25 µl
	TEMED	5 µl	5 µl
Bufor do transferu	Glicyna	3 g (40 mM)	
	Tris	6 g (50 mM)	
	10% SDS	3,75 ml (0,0375%)	
	metanol	50 ml (5%)	
	H ₂ O MQ do 1000 ml		
Bufor do płukania membran	2M NaCl	50 ml (200 mM)	
	0,5 M Tris-HCl pH 7,6	20 ml (20 mM)	
	Tween 20	0,5 ml (0,1%)	
	H ₂ O MQ do 500 ml		
Bufor do blokowania	2M NaCl	5 ml (200 mM)	
	0,5M Tris-HCl pH 7,6	2 ml (20 mM)	
	Tween 20	0,05 ml (0,1%)	
	H ₂ O MQ do 50 ml		
Substrat do Western Blot (luminol)	1M Tris-HCl pH 8,8	1 ml (100 mM)	
	250 mM luminol	50 ul (1,24 mM)	
	90 mM kwas kumarynowy	22 ul (0,196 mM)	
	30% H ₂ O ₂	0,03%	
	H ₂ O MQ do 10 ml		
Trypsyna (roztwór w PBS)	Trypsyna	0,25%	
	EDTA	0,02%	
Kompletne medium DMEM + 10% FBS (100ml)	baza DMEM	86 ml	
	FBS	10 ml	
	0,007% β-merkaptioetanolu	1 ml	
	Pen-Strep	1 ml	

	200mM L-glutamina	1 ml
	Non-essential amino acids	1 ml
Bufor PBS	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	KCl	2,7 mM
	dostosowanie pH do 7,4	
Bufor fosfocytrynianowy, pH 5	0,2 M Na ₂ HPO ₄	25,7 ml
	0,1 M kwas cytrynowy	24,3 ml
	H ₂ O dest.	50 ml
Substrat do ELISA (roztwór TMB)	1 mg TMB rozpuszczony w 1ml DMSO	
	9 ml buforu fosfocytrynianowego, pH 5	
	30% H ₂ O ₂	2 µl
Bufor FACS	FBS	2%
	PBS	
Bufor do lizy erytrocytów	NH ₄ Cl	150 mM
	KHCO ₃	10 mM
	Na ₄ EDTA	100 µM
	H ₂ O MQ do 1000 ml	

2.1.3. Myszy Spna2R1098Q.

Myszy Spna2R1098Q powstały w wyniku spontanicznej punktowej mutacji na tle genetycznym szczepu C57BL/6J. Mutacja ta jest mutacją zmiany sensu, która występuje w genie Spna2 (mysim ortologu ludzkiego genu *SPTANI*) kodującym białko α -II spektrynę i prowadzi do zamiany (tranzycji) guaniny na adeninę w pozycji 3293 w sekwencji genowej, co skutkuje zamianą argininy na glutaminę w pozycji 1098 w sekwencji aminokwasowej (Spna2 c.3293G > A:p.R1098Q) w obrębie 10. powtórzenia spektrynowego α -II spektryny.

Myszy bytują w pomieszczeniach klimatyzowanych (temp. 22 +/-2°C), z kontrolowanym poziomem wilgotności (55% ± 10%) oraz z automatyczną regulacją cyklu dobowego dnia/nocy (12/12 godzin). Myszy są przetrzymywane w klatkach indywidualnie wentylowanych w liczbie 2-5 myszy/klatkę ze stałym dostępem do filtrowanej i sterylizowanej wody oraz standardowej wyjałowionej paszy dla gryzoni. W klatkach znajdują się elementy wzbogacenia środowiska w postaci drewnianych tuneli do ścierania siekaczy i zabawy, materiału do budowy gniazd, kartonowych rurek do zabawy.

System wentylacji zapewnia ogrzewanie i chłodzenie powietrza w zależności od warunków atmosferycznych panujących na zewnątrz zwierzętarni. System ten zapewnia 15-krotną wymianę powietrza w ciągu godziny, przy prędkości przepływu powietrza nieprzekraczającej 0,3 m/s. We wszystkich pomieszczeniach występuje nadciśnienie powodujące przepływ powietrza na zewnątrz zwierzętarni, co pomaga w utrzymaniu standardu strefy SPF (ang. specific pathogen free). Centrala klimatyzacyjna nawiewno-wywiewna wyposażona jest w system filtrów chroniących przed nawiewaniem pyłu, owadów i innych niepożądanych cząstek z zewnątrz zwierzętarni. Stacje nawiewu powietrza do klatek oraz same klatki wyposażone są w filtry HEPA, chroniące myszy przed patogenami.

2.1.4. Urządzenia wykorzystane w testach behawioralno-pamięciowych.

2.1.4.1. Test obracającego się wałka.

Do testu wykorzystano urządzenie zbudowane we własnym zakresie (przez mgr inż. Roberta Budzińskiego) na podstawie wskazówek z artykułów (**Deacon 2013; Carter, Morton, Dunnett 2001; Shiotsuki i in. 2010**). Urządzenie składało się z wałka o średnicy 25 mm zawieszono na wysokości 200 mm (ryc. 1). Programator umożliwiał wybór sposobu obrotów wałka z jednostajną prędkością lub przyspieszeniem oraz regulację prędkości (od 4-40 obrotów/minutę) i przyspieszenia. Obszar testowy był przedzielony przegrodą umożliwiającą przeprowadzenie dwóch testów równolegle. Pojedynczy obszar testowy miał szerokość 100 mm. Na dole aparatu znajdowały się płytki wyposażone w sensor nacisku (upadku) zatrzymujące elektroniczne stopery. Całość została wykonana z materiałów umożliwiających łatwe i szybkie czyszczenie pomiędzy próbami.



Ryc. 1. Urządzenie zastosowane w teście obracającego się wałka.

2.1.4.2. Test koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów.

Do testu wykorzystano urządzenie zbudowane we własnym zakresie (przez mgr inż. Roberta Budzińskiego) na podstawie wytycznych z artykułu (Kamens, Crabbe 2007). Testowa arena miała wymiary 150 mm x 150 mm i była wykonana z równoległych metalowych prętów o średnicy 1,2 mm i rozmieszczonych co 0,75 cm (ryc. 2). Arena była otoczona ścianami z pleksiglasu o wysokości 200 mm. Urządzenie zostało wyposażone w automatyczny licznik błędnie stawianych kroków, czujnik przebytej drogi na podczerwień oraz elektroniczny zegar.



Ryc. 2. Urządzenie wykorzystane do przeprowadzenia testu koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów.

2.1.4.3. Test siły mięśniowej „wire-hang”.

Urządzenie wykorzystane w tym teście składało się ze ścianek o wysokości 350 mm i szerokości 200 mm, oddalonych od siebie o 350 mm. Pomiedzy ścianami na wysokości 300 mm nad podłożem był rozpięty nierozciągliwy i niewibrujący metalowy drut o średnicy 2 mm i długości 350 mm. Na dnie urządzenia znajdowała się warstwa amortyzująca, chroniąca myszy przed skutkami upadku z wysokości.

2.2. Metody.

2.2.1. Ocena morfometryczna myszy.

2.2.1.1. Określenie długości całkowitej, tułowia i ogona.

Długość całkowitą myszy określono mierząc odległość od czubka nosa do końca ogona. Długość tułowia zwierząt oznaczono poprzez pomiar odległości od czubka nosa do nasady ogona. Długość ogona określano poprzez zaznaczenie odległości pomiędzy nasadą ogona a końcem ogona.

2.2.1.2. Określenie masy ciała.

Pomiar masy ciała myszy wykonano poprzez umieszczenie myszy w przeznaczony do tego misce zamontowanej na wadze analitycznej Mettler Toledo AB204 i zważenie.

2.2.2. Zmodyfikowana skala Racine'a.

Tabela 3. Zmodyfikowana skala Racina zastosowana w ocenie napadów padaczkowych u myszy (Van Erum i in. 2019; Cela i in. 2019; Ihara i in. 2016; Terzic i in. 2021).

Stopień / faza	Zmodyfikowana skala Racine'a
0	brak zmian w zachowaniu
1	drżenie wąsów, zneruchomienie, osłupienie, bezruch, skurcze twarzy, ruch ust i twarzy, drgawki mięśni twarzy, wpatrywanie się w bezruch (z automatyzmem ustno-twarzowym)
2	kiwanie głową, kloniczne ruchy głowy, skurcze szyi, sztywnienie ogona, nagłe miokloniczne szarpnięcia i powtarzalne ruchy głowy i szyi
3	napad kloniczny (w pozycji siedzącej), jednostronne kloniczne ruchy kończyny przedniej, postawa lordotyczna
4	napad kloniczny, toniczno-kloniczny obustronne (leżenie na brzuchu), zwierzę staje dęba (pozycja stojąca) i wykazuje kloniczne obustronne ruchy kończyn przednich, wstawanie i upadanie
5	uogólniony napad kloniczny, toniczno-kloniczny (leżenie na boku), dzięki podskoki lub bieganie, zwierzę staje dęba i wykonuje kloniczne obustronne ruchy kończyn przednich oraz upada (często do tyłu), wydawanie dźwięków, wyprost kończyn przednich i tylnych, kręcenie się lub toczenie wzdłuż lub poprzecznie do osi ciała

2.2.3. Ocena częstotliwości występowania i czasu trwania napadów.

Myszy podnoszono poprzez standardowy chwyt, następnie obracano tak, by odchylić głowę zwierzęcia do tyłu na 5 sekund, po czym odkładano do klatki i obserwowano z jaką częstością występują napady oraz mierzono czas ich trwania. Dodatkowo oceniano nasilenie wywołanych w ten sposób epizodów napadów padaczkowych według zmodyfikowanej skali Racine'a.

2.2.4. Testy behawioralno-pamięciowe myszy.

Każdy z opisanych poniżej testów był poprzedzony oswojeniem zwierząt z urządzeniami i pomieszczeniem, w którym odbywały się doświadczenia oraz osobą przeprowadzającą eksperyment, a także przyzwyczajane do podnoszenia i dotyku.

Procedury były wykonywane za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu według zezwoleń o numerze 78/2018 i 70/2021.

2.2.4.1. Test obracającego się wałka.

Podczas testu mierzono czas, w którym myszy poruszały się po obracającym się wałku dla trzech stałych prędkości obrotu wałka – 4, 8 i 14 obrotów/min. Dane zebrano podczas jednej sesji, w trakcie której każda mysz miała trzy próby dla danej prędkości. Wyniki prób zostały uśrednione. Maksymalny zadany czas na każdą próbę wynosił 120 sekund. Jeśli mysz przed osiągnięciem zadanego czasu 120 sekund przestawała chodzić i obracała się pasywnie traktowano to jako upadek. Odstęp między kolejnymi próbami wynosił 3 minuty. Po każdej próbie do czyszczenia aparatu używano 70% etanolu.

2.2.4.2. Test koordynacji chodu na siatce z równoległych.

Myszy umieszczano pojedynczo na środku areny i pozwalano im na swobodne poruszanie się wewnątrz areny do momentu pokonania odległości 10 m. Zanotowano liczbę błędnie postawionych kroków i czas potrzebny na pokonanie tej odległości. Test wykonywano przez 4 kolejne dni, po jednej próbie dziennie.

2.2.4.3. Test analizy chodu zwierząt.

Przednie i tylne łapy myszy zostały pomalowane nietoksycznym tuszem odpowiednio w kolorze zielonym i czarnym. Następnie myszom pozwolono przejść wzdłuż ograniczonego ścianami wybiegu wyłożonego arkuszem bibuły Whatman o wymiarach 300 mm x 100 mm do zamkniętego pudełka, pozostawiając ślady swoich łap na papierze. Zmierzono odległości między poszczególnymi śladami, dla co najmniej 5 kroków, aby określić następujące parametry: odległość między kolejnymi kontaktami tej samej łapy (ang. stride length), długość kroku (odległość między kolejnymi śladami przeciwległych przednich lub tylnych łap wzdłuż osi kierunku ruchu), rozstawu łap (ang. BOS - base of support, odległość między kolejnymi

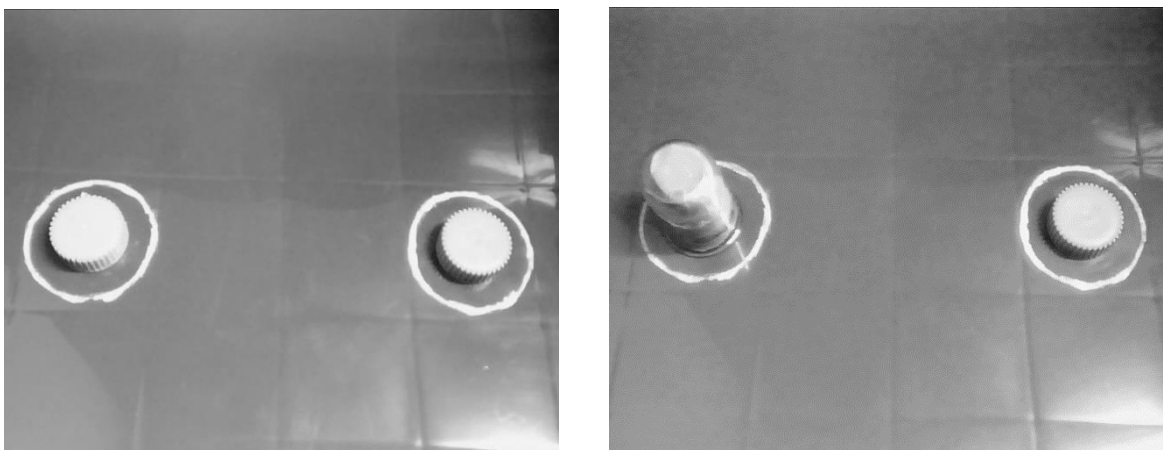
przeciwnymi przednimi lub tylnymi łapami prostopadła do osi kierunku ruchu), zbieżności dostawiania łap (ang. interlimb distance, odległość między przednimi i tylnymi łapami po tej samej stronie).

2.2.4.4. Test siły mięśniowej „wire-hang”.

Test rozpoczął się w momencie zawieszenia zwierzęcia na przednich łapach na środku drutu i polegał na zmierzeniu czasu do chwili upadku lub do osiągnięcia 180 sekund. Test przeprowadzono w dwóch następujących po sobie dniach, po jednej sesji na dzień składającej się z 2 prób z 3-minutowym odstępem.

2.2.4.5. Test rozpoznawania nowych obiektów.

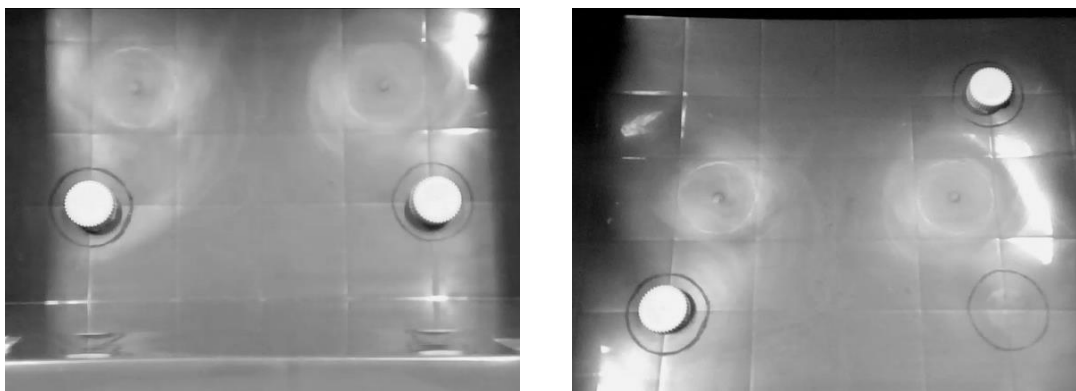
Jeden dzień przed testem każdą mysz przyzwyczajano do pustej areny (500 × 300 × 500 mm). W pierwszym dniu testu (tzw. sesja treningowa) każdą mysz umieszczano na arenie z dwoma identycznymi obiektami zlokalizowanymi pośrodku i oddalonymi od siebie o 200 mm oraz pozwolono na swobodną eksplorację przez 10 minut. Następnego dnia (dzień testu) myszom pozwolono eksplorować jeden niezmienny i jeden nowy obiekt przez 10 minut (ryc. 3). Sesje były rejestrowane za pomocą kamery zamontowanej nad areną. Po każdej sesji arena i obiekty były czyszczone 70% etanolem. Czas interakcji mierzono, gdy mysz wykazywała zainteresowanie obiektem (jej głowa była skierowana w stronę obiektu i znajdowała się w odległości nie większej niż 15 mm).



Ryc. 3. Arena w teście rozpoznawania nowych obiektów w dniu sesji treningowej (zdjęcie po lewej) i testowym (zdjęcie po prawej stronie).

2.2.4.6. Test lokalizacji obiektu.

Test przebiegał jak opisano w rozdziale 2.2.4.5. z tym, że w dniu testu podczas tzw. sesji treningowej każdą mysz umieszczano na arenie z dwoma identycznymi obiektami zlokalizowanymi w narożnikach przy jednej krawędzi (ryc. 4) i oddalonymi od siebie o 200 mm oraz pozwolono na swobodną eksplorację przez 10 minut. Po godzinnej przerwie następowała faza testu. W fazie testowej jeden przedmiot został przesunięty do przeciwległego narożnika, a mysz miała 5 minut na eksplorację.



Ryc. 4. Arena w teście lokalizacji obiektu w trakcie sesji treningowej (zdjęcie po lewej) i testowej (zdjęcie po prawej stronie).

2.2.5. Oznaczenia morfologii krwi myszy.

Parametry morfologiczne krwi myszy zostały oznaczone w laboratorium NeoLek IITD oraz zewnętrznym laboratorium Vetlab. Do analizy wybrano następujące parametry: liczbę i udział procentowy leukocytów, limfocytów, monocytów, granulocytów, liczbę erytrocytów i płytek krwi, hemoglobinę, hematokryt, wskaźnik średniej objętości krwinek (MCV – ang. mean corpuscular volume), średnią masę hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH – ang. mean corpuscular hemoglobin, mean cell hemoglobin), średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC – ang. mean corpuscular hemoglobin concentration), zróżnicowanie objętości krwinek czerwonych (RDW – ang. red blood cell distribution width), średnia objętość płytek krwi (MPV – ang. mean platelet volume), zróżnicowanie objętości płytek krwi (PDW – ang. platelet distribution width) oraz hematokryt płytkowy (PCT – ang. plateletcrit).

2.2.6. Immunizacja myszy.

Preparat do immunizacji jednej myszy zawierał 100 µg peptydu owoalbuminy zawieszony w 100 µl adjuwantu (Sigma Adjuvant System). Preparaty zostały podane jednorazowo i dootrzewnowo.

Procedury były wykonywane za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu według zezwolenia o numerze 78/2018.

2.2.7. Hodowle komórkowe.

Linie pierwotnych fibroblastów wyizolowanych z embrionów myszy Spna2R1098Q hodowano w kompletnym medium DMEM z dodatkiem 10% cielęcej surowicy płodowej (FBS – ang. fetal bovine serum), antybiotyków (100 IU/ml penicyliny, 0,1 mg/ml streptomycyny) oraz L-glutaminy (2 mM) w inkubatorze o stałej temperaturze 37°C i 5% CO₂.

2.2.8. Oznaczanie cyklu komórkowego.

Materiałem do oznaczenia cyklu komórkowego były pierwotne hodowle fibroblastów wyizolowane z homozygotycznych, heterozygotycznych i kontrolnych embrionów myszy Spna2R1098Q. Pobrane z hodowli fibroblasty przepłukano dwukrotnie schłodzonym PBS z dodatkiem 0,1% FBS. Zwirowaną peletkę komórek delikatnie rozbito i bardzo powoli wkroplono 1 ml schłodzonego do -20°C czystego (96%) etanolu ciągle mieszając próbkę. Następnie próbki umieszczono na noc w -20°C w celu utrwalenia lub do czasu barwienia i analizy cytometrycznej. Po etapie utrwalania fibroblasty przepłukano dwukrotnie PBS, po czym do każdej próbki dodano RNazy A (500ug/ml) oraz jodku propidyny (PI) (10ug/ml) i inkubowano przez 40 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskane preparaty analizowano na cytometrze przepływowym BD FACSCalibur™ (BD Biosciences).

2.2.9. Test fagocytozy.

Do oznaczenia zdolności do fagocytozy wykorzystano komercyjny zestaw pHrodo™ BioParticles™ Phagocytosis Kits (Invitrogen, A10025), a wyniki odczytano przy użyciu cytometru przepływowego BD FACSCalibur™ (BD Biosciences) stosując do wzbudzenia wiązkę laserową o długości fali $\lambda = 488$ nm, zaś do obserwacji filtr 585/42 nm. Procedurę doświadczenia przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta dołączoną do zestawu. Badania wykonano na krwi dorosłych myszy. Oznaczenie zdolności do fagocytozy przeprowadzono w dwóch warunkach w temperaturze 37°C oraz na lodzie z dodatkiem azydki. Wyniki opracowano przy użyciu programu Flowing Software 2.

2.2.10. Test migracji fibroblastów.

Test zdolności do migracji i zarastania rysy został przeprowadzony z użyciem komercyjnych zestawów insertów z płytkami do hodowli komórkowej Culture-Insert 4 Well in μ -Dish 35 mm (ibidi). Materiałem do badań były pierwotne hodowle mysich fibroblastów płodowych po 3 linie dla każdego genotypu. W celu wyeliminowania wpływu proliferacji hodowle zostały potraktowane mitomycyną. Na insert wysiano po 400 tys. komórek, czyli po 100 tys. komórek na jedną z czterech studzienek. Komórki były zawieszane w kompletnym medium DMEM. Po czym hodowle fibroblastów pozostawiono na noc, aby komórki przytwierdziły się do podłoża. Następnie usunięto inserty, hodowle przepłukano PBS i dodano świeżego medium hodowlanego. W celu oznaczenia migracji i zarastania rysy wykonano zdjęcia hodowli mysich pierwotnych fibroblastów płodowych po 0, 6, 12, 24 i 48 godzinach hodowli. Dla każdej linii komórkowej w danym punkcie czasowym wykonano zdjęcia części centralnej szczeliny oraz każdego z ramion rozdzielających sąsiednie pola. Analizę zdjęć przeprowadzono przy użyciu programu ImageJ, określając powierzchnię zajętą przez poszczególne hodowle komórkowe i wolną od komórek.

2.2.11. Test ELISA.

Wysoko adhezyjne płytki (MaxiSorp, NUNC) zostały opłaszczane poprzez nałożenie 100 μ l peptydu owoalbuminy (1 μ g/ml w PBS), czyli 100 ng i inkubację przez noc w 4°C. Następnego dnia usunięto mieszaninę opłaszczającą oraz płytki zostały przepłukane 200 μ l buforu PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20, po czym płytki blokowano w 5% odtłuszczonym mleku przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Wyblokowane płytki zostały przepłukane ponownie buforem PBS + Tween 20. W kolejnym etapie nałożono po 100 μ l surowicy myszy immunizowanych owalbuminą oraz kontrolnych w dwóch rozcieńczeniach 1:5000 i 1:10000, a całość inkubowano przez półtorej godziny w temperaturze pokojowej. Potem płytki zostały trzykrotnie przepłukane buforem PBS + Tween 20. Później nakroplono rozcieńczony w stosunku 1:10000 koniugat przeciwciała rozpoznającego fragmenty mysich przeciwciał sprzężony z peroksydazą chrzanową (anty-mysz-HRP) w objętości 100 μ l i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po okresie inkubacji płytki zostały pięciokrotnie odpłukane z przeciwciała buforem PBS + Tween 20. Do studzienek płytki dodano po 100 μ l substratu dla HRP, czyli TMB (tetrametylobenzydyna) zawieszoną w buforze fosforanowo-cytrynianowym, a następnie płytki pozostawiono na 15 minut w ciemni. W celu zatrzymania reakcji dodano po 100 μ l 1M H₂SO₄. Absorbancję odczytano przy długości fali 450 nm na spektrofotometrze Perkin Elmer Wallac 1420 Victor².

2.2.12. Test immunoenzymatyczny typu „sandwich ELISA” na macierzach przeciwciał (ang. membrane antibody arrays).

W celu równoległej oceny względnych poziomów sekrecji 53 wybranych mysich białek związanych z angiogenezą zastosowano komercyjny zestaw Proteome Profiler™ Array Mouse Angiogenesis Array Kit (Nr kat. ARY015, R&D Systems). Materiałem do badań było medium zebrane z hodowli pierwotnych mysich fibroblastów płodowych. Każdą z linii komórkowych (3 homozygotyczne i 3 dzikie) posiano na płytce w równych ilościach po 400 tys. kom. i inkubowano w 5 ml kompletnego medium DMEM. Medium z każdej hodowli zebrano i odwirowano, przenosząc medium do świeżych probówek. Następnie połączono ze sobą po 2,5 ml medium z każdej hodowli fibroblastów homozygotycznych oraz oddzielnie po 2,5 ml medium z każdej hodowli fibroblastów dzikich. Uzyskane mieszaniny medium zatężono z 7,5 ml do 1 ml. Stężenie białek z zagęszczonych mediach zmierzono przy pomocy BCA i Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific). Wyniki BCA odczytano przy pomocy analizatora Perkin Elmer Wallac 1420 Victor². Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w załączonej do zestawu instrukcji. Dodatkowo w celu porównania zawartości białek w niezgęszczonych i zagęszczonych mediach pochodzących z hodowli przeprowadzono ich elektroforezę w żelu poliakrylamidowym, a następnie wysrebrzenie otrzymanego żelu. Analizę zdjęć przeprowadzono przy użyciu programu ImageJ określając densytometrię (intensywność) par punktów reprezentujących każde białko związane z angiogenezą, a następnie określono względny stosunek poziomu białek w supernatancie pobranym z fibroblastów homozygot do dzikich. Przy obliczeniach uwzględniono poprawkę sygnału o różnicę między próbkami określaną na podstawie srebrzenia próbek użytych do inkubacji oraz punktami referencyjnymi obecnymi na membranach.

2.2.13. Test ELISPOT.

Z wypreparowanych śledzion myszy Spna2R1098Q oraz typu dzikiego immunizowanych owoalbuminą przygotowano zawiesinę komórek. Doświadczenie przeprowadzono z użyciem komercyjnego zestawu Murine IFN- γ Single-Color Enzymatic ELISPOT Assay (CTL ImmunoSpot), postępując według instrukcji producenta. Do stymulacji komórek w teście użyto owoalbuminę w stężeniu 5 μ g/ml. Wyniki zostały odczytane przy użyciu analizatora S6 Entry M2 firmy CTL ImmunoSpot.

2.2.14. Homogenizacja tkanek.

Homogenizację mózdków przeprowadzono w buforze do lizy tkanek z dodatkiem koktajlu inhibitorów proteaz z użyciem homogenizatora Dounce wykonując 20 ruchów tłokiem. Na każde 100 mg tkanki użyto 100 ul buforu. Preparat pozostawiano na 15 minut na lodzie, wytrząsając mieszaninę co 5 minut. Zawiesinę zwirowano przy 15000 obr./min w -1°C przez 20 minut. Supernatant przeniesiono do świeżych probówek i przechowywano w -80°C.

2.2.15. Oznaczanie białka całkowitego.

Stężenie białka w uzyskanych preparatach m. in. lizatach mózdkowych określono przy użyciu zestawu PierceTM BCA Protein Assay Kit postępując zgodnie z instrukcją producenta. Do przygotowania krzywej wzorcowej wykorzystano bufor użyty do lizy tkanek oraz dołączony do zestawu roztwór BSA (2mg/ml). Absorbancję zmierzono przy długości fali 562 nm na spektrofotometrze Perkin Elmer Wallac 1420 Victor².

2.2.16. Elektroforeza SDS-PAGE.

Elektroforezę przeprowadzono w żelu poliakrylamidowym zanurzonym w buforze do elektroforezy przy stałym napięciu 180 V przez 50 minut. Dla białek o masie powyżej 120 kDa użyto 4% żelu zagęszczającego i 7% żelu rozdzielającego, natomiast dla białek poniżej 120 kDa użyto żeli odpowiednio 5% i 12%. Otrzymane lizaty mózdkowe zmieszano z buforem Laemmli'ego w stosunku 4:1 i zdenaturowano w 95°C przez 5 min.

2.2.17. Western blotting.

Transfer póluchy białek rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym na membranę z polifluorku winylidenu przeprowadzono w buforze do transferu przy stałym napięciu 15 V przez 18 minut. Po transferze membranę blokowano przez noc w 5% odtłuszczonym mleku w buforze do płukania. Po wyblokowaniu membrany przeprowadzono inkubację z I-rzędowymi przeciwciałami specyficznymi wobec białek docelowych. Do detekcji wykorzystywano II-rzędowe przeciwciała anty-mysie IgG lub anty-szczurze sprzęgnięte z peroksydazą chrzanową (HRP). Po każdej inkubacji membran z przeciwciałami stosowano trzykrotne 10-minutowe płukanie w buforze do płukania. Normalizację próbek przeprowadzono względem poziomu b-aktyny lub GAPDH.

2.2.18. Oznaczanie aktywności enzymatycznej kalpain.

Aktywność kalpains została zbadana przy użyciu komercyjnego, fluorymetrycznego zestawu Calpain Activity Assay Kit z firmy Abcam (ab65308) z wykorzystaniem czarnych 96-dołkowych płytek do pomiaru fluorescencji (FluoroNunc). Poziom aktywności kalpains został zmierzony w lizatach mózdkowych embrionów, noworodków i myszy dorosłych, fibroblastach pozyskanych z embrionów oraz surowicy z krwi dorosłych myszy. Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z instrukcją załączoną do zestawu. W przypadku lizatów mózdkowych do testów wykorzystano po 50 ug, a następnie aktywność przeliczono dla 1 mg lizatu. W doświadczeniu z użyciem hodowli pierwotnych embrionalnych fibroblastów w celu przeprowadzenia testu pobrano po 200 tys. komórek, które następnie zhomogenizowano, zaś w przypadku oznaczania kalpains w surowicy pobrano po 2 ul. Fluorescencja została zmierzona przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 400$ nm i emisji $\lambda = 505$ nm (Ex/Em = 400/505nm) w wielofunkcyjnym czytniku mikropłytek CLARIOstar Plus (BMG Labtech) i wyrażona w relatywnych jednostkach fluorescencji (RFU) na miligram białka.

2.2.19. Procedury wykonywane na zwierzętach.

Procedury były wykonywane za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu według zezwoleń o numerze 78/2018 i 70/2021.

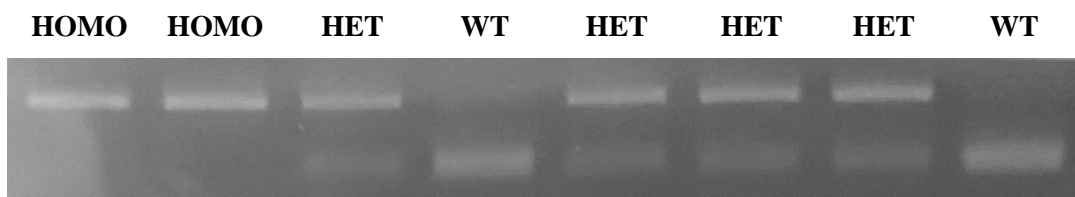
2.2.20. Metody analizy statystycznej danych.

Do analiz statystycznych wykorzystano program GraphPad Prism 5. W zależności od wyniku testu normalności Shapiro-Wilk'a do analizy wykorzystano test t-Studenta, test Mann'a-Whitney'a lub test t-Studenta z korektą Welch'a. W przypadku analizy więcej niż dwóch grup przy jednej zmiennej zastosowano jednostronną analizę wariancji ANOVA (ang. analysis of variance), a w przypadku dwóch zmiennych dwustronną analizę wariancji ANOVA.

3. Wyniki.

3.1. Sposób dziedziczenia mutacji R1098Q.

Mutacja Spna2R1098Q jest mutacją autosomalną dominującą dziedziczoną stabilnie zgodnie z prawami Mendla. Analiza genotypu potomstwa myszy wykazała (ryc. 5), że mutacja Spna2R1098Q jest dziedziczona zgodnie z prawami Mendla jako autosomalna dominująca (Miazek i in. 2021). Zgenotypowanie 190 dorosłych myszy oraz 24 zarodków myszy potwierdzono 100% korelację genotypu z fenotypem.

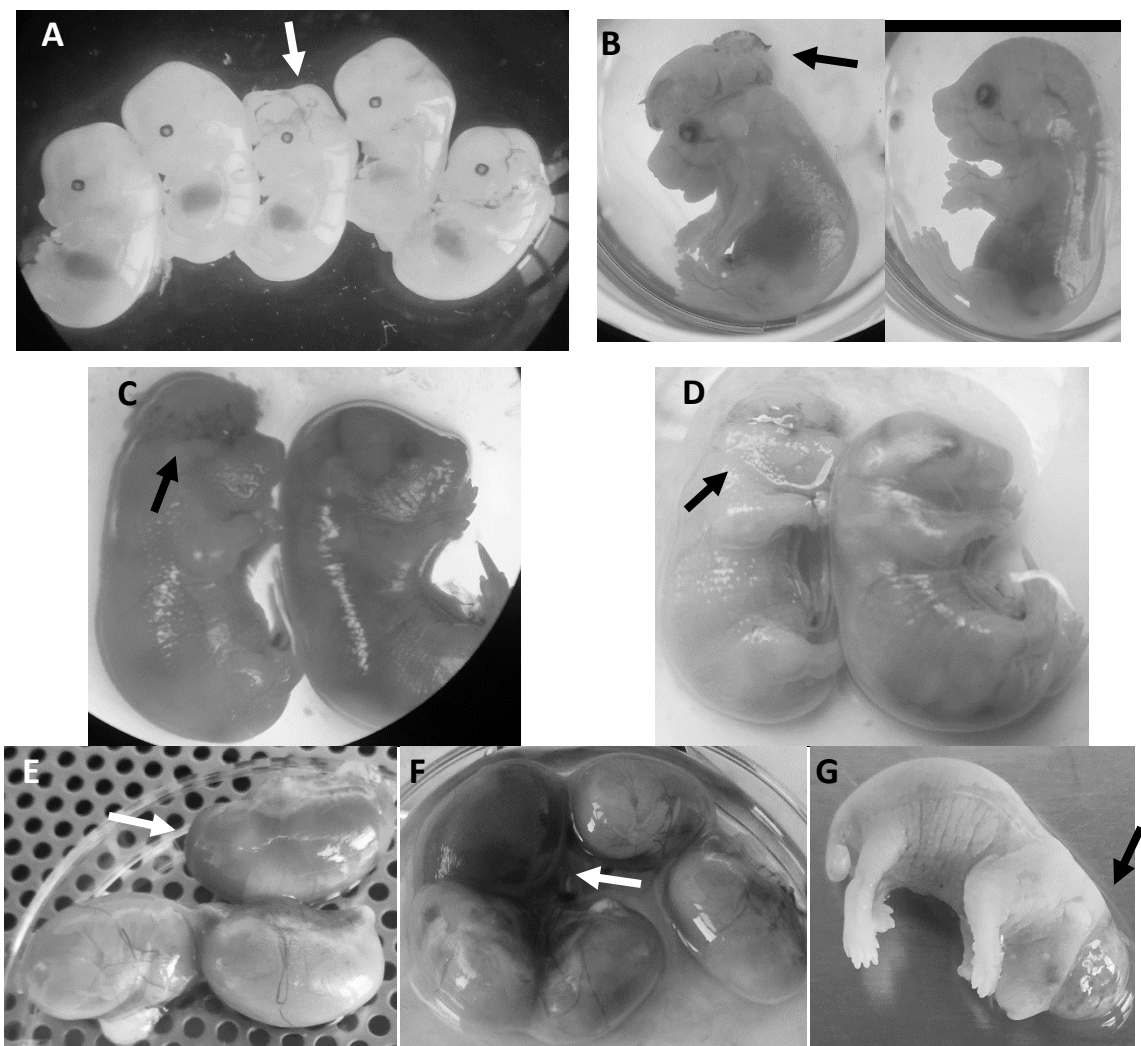


Ryc. 5. Przykładowe genotypowanie zarodków myszy Spna2R109Q.

3.2. Opis fenotypowy myszy R1098Q.

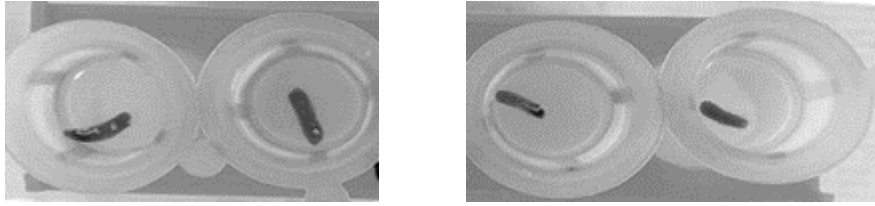
Osobniki homozygotyczne zmutowane rodzą się martwe z widoczną deformacją twarzy, cechami atrofii mózgu, a zwłaszcza struktury mózdzku (Miazek i in. 2021) i czasami z krwotokami podczaszkowymi lub brakiem wykształconej mózgowiczaszki. Już na etapie 14-dniowego zarodka u homozygot R1098Q można zauważyć spłaszczenie i skrócenie trzewioczaszki oraz czasami brak wykształcenia mózgowiczaszki oraz worek owodniowy wypełniony krwią (ryc. 6). U osobników heterozygotycznych nie zauważono wpływu mutacji na długość życia jak również zdolności rozrodcze, chociaż z obserwacji wynika, iż sukces reprodukcyjny kojarzeń heterozygotycznych myszy jest niższy w przybliżeniu o 25%, co związane jest ze śmiertelnością osobników homozygotycznych (Miazek i in. 2021). Osobniki heterozygotyczne wydają się na początku normalne, ale szybko zaczynają przejawiać zaburzenia motoryczne. Charakterystyczny jest dla nich chwiejny chód. Oprócz zaburzeń chodu myszy te odznaczają się również zaburzeniami równowagi. W testach pamięciowych zauważono trudności w utrzymaniu kontroli nad głową i utrzymaniu głowy w bezruchu. Heterozygotycznym myszom Spna2R1098Q towarzyszą również napady padaczkowe 4-5 stopnia w zmodyfikowanej skali Racine'a (tab. 4). Zauważono, że napady te są dodatkowo wywoływane przez odwrócenie myszy podczas rutynowej opieki nad zwierzętami lub podczas upadku zwłaszcza gdy uderzą głową bądź w przypadku testu RotaRod, gdy chwyciły się wałka i obracały razem z nim. Napady te mają charakter napadów tonicznych, którym towarzyszy naprężenie mięśni, wygięcie i odchylenie

głowy do tyłu przypominające opistotonus. Jednocześnie następuje rozprostowanie kończyn, po czym napady padaczkowe przechodzą w fazę kloniczną, podczas których myszy zaczynają się toczyć i kręcić w różnych kierunkach oraz wykonują szybkie ruchy łapami. Pomiedzy napadami padaczkowymi myszom towarzyszą ciągle drgawki jako drżenie czynnościowe i spoczynkowe, które utrzymują się przez całe życie. Również u heterozygotycznych myszy występuje atrofia mózdzku, który jest mniejszy i słabiej pofałdowany. Ataksja mózdzkowa postępuje wraz z wiekiem myszy. Szerokość warstw molekularnych, organizacja i liczba neuronów w mózgu jak również w korze nowej i hipokampie ulega zaburzeniu (Miazek i in. 2021). Poza tym myszy te cechują się mniejszą śledzioną niż myszy kontrolne (ryc. 7).



Ryc. 6. Zdjęcia porównujące homozygotyczne zarodki myszy Spna2R1098Q z dzikimi embrionami myszy Spna2R1098Q.

Homozygotyczne zarodki myszy Spna2R1098Q w wieku od od 14-18 dpc (ang. days post coitum) zostały zaznaczone strzałkami (A-G). Homozygotyczne embriony myszy Spna2R1098Q w worku owodniowym wypełnionym krwią (E-F). Homozygotyczny embrion wyjęty z worka owodniowego wypełnionego krwią (G).



Ryc. 7. Porównanie wielkości śledzion dzikich myszy Spna2R1098Q (zdjęcie po lewej stronie) z śledzionami heterozygotycznych myszy Spna2R1098Q (zdjęcie po prawej stronie).

3.3. Badania morfometryczne heterozygot myszy Spna2R1098Q.

Realizację zadania badawczego rozpoczęto od porównania cech morfometrycznych myszy Spna2R1098Q, ponieważ w czasie obserwacji myszy Spna2R1098Q podczas hodowli dostrzeżono, iż myszy z tym fenotypem są mniejsze w porównaniu z myszami o fenotypie dzikim pochodzącymi z tego samego miotu lub będącymi ich rówieśnikami. W celu potwierdzenia zaobserwowanych w trakcie hodowli różnic zmierzono następujące cechy morfologiczne: długość całkowitą, długość tułowia i długość ogona oraz masę ciała, a także wyliczono współczynnik masy ciała i indeks Lee. Do badanych parametrów włączono również pomiar masy śledziony, gdyż zaobserwowano, iż części osobników myszy Spna2R1098Q śledziona są mniejsze w porównaniu do myszy typu dzikiego pochodzących z tego samego miotu lub będących rówieśnikami dla myszy heterozygotycznych.

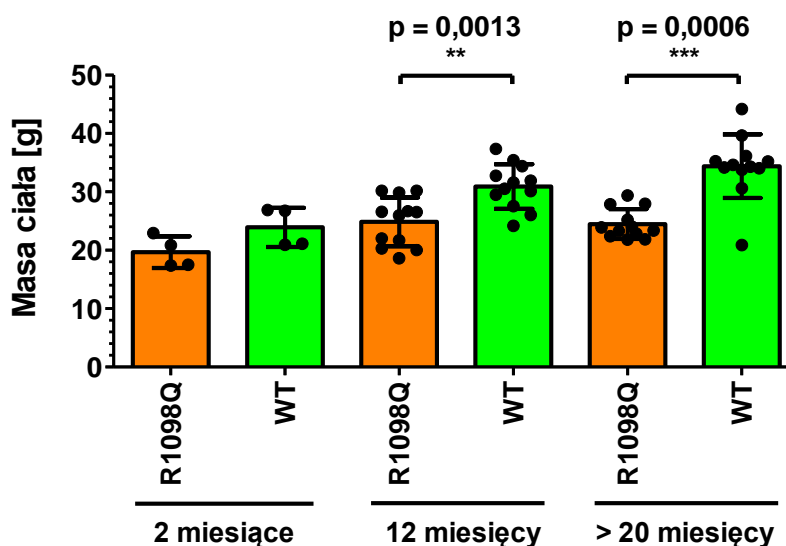
Do badań wykorzystano myszy w wieku 2 miesięcy oraz w wieku ponad 20 miesięcy. Ze względu na wpływ płci na cechy morfologiczne do analizy wybrano losowo równocenne grupy. Grupę młodych myszy stanowiły 2 samce i 2 samice Spna2R1098Q oraz 2 samce i 2 samice dzikie. Starszą grupę tworzyło po 8 samic i po 4 samce typu Spna2R1098Q oraz dzikiego. Dodatkowo dla porównania masy ciała włączono grupę rocznych myszy, która składała się z 24 myszy, w tym po 8 samic i 4 samców typu Spna2R1098Q oraz dzikiego.

3.3.1. Masa ciała.

Zebrane pomiary masy ciała wskazują na występowanie i pogłębianie się wraz z wiekiem myszy różnic masy ciała pomiędzy myszami Spna2R1098Q i dzikimi w wieku 12 miesięcy (**p = 0,0013) i u ponad 20-miesięcznych (**p = 0,0006, $n_1 = 12$, $n_2 = 12$, $U = 12$), które nie występują pomiędzy myszami w wieku 2 miesięcy (p = 0,1143, $n_1 = 4$, $n_2 = 4$, $U = 2$), co przedstawia ryc. 8. Na podstawie otrzymanych wyników średnia masa ciała młodych (2-miesięcznych) myszy Spna2R1098Q wyniosła $19,68 \pm 2,71$ g, zaś dla myszy dzikich średnia masa ciała wyniosła $23,93 \pm 3,36$ g. Różnica w wadze pomiędzy 2-miesięcznymi myszami dzikimi i Spna2R1098Q wyniosła

4,25 g, czyli myszy Spna2R1098Q są w tym wieku lżejsze o około 18%. Roczne dojrzałe myszy Spna2R1098Q ważyły średnio $24,88 \pm 4,199$ g, podczas gdy średnia masa ciała rocznych myszy dzikich wyniosła $30,95 \pm 3,830$ g. Blisko 20% mniejszą masę ciała (6,07 g) zarejestrowano także dla rocznych myszy Spna2R1098Q względem dzikich. Starsze (> 20 miesięczne) myszy Spna2R1098Q osiągnęły przeciętnie wagę $24,50 \pm 2,57$ g, natomiast myszy dzikie w tym wieku ważą przeciętnie $34,41 \pm 5,44$ g. Wśród starszych myszy dzikich i Spna2R1098Q zaobserwowano różnicę 9,91 g, zatem niemal dwuletnie myszy Spna2R1098Q są lżejsze o blisko 30%. Szczegółowe dane pomiarów zebrano w tabeli 4.

Mutacja Spna2R1098Q w sposób istotny negatywnie wpływa na masę ciała myszy.



Ryc. 8. Masa ciała myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Pomiary wykonano dla trzech grup wiekowych (2-miesięcznych, 12-miesięcznych i ponad 20-miesięcznych) myszy. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu t-Student'a oraz Mann'a-Whitney'a. Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami (●) zaznaczono masę ciała każdej myszy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

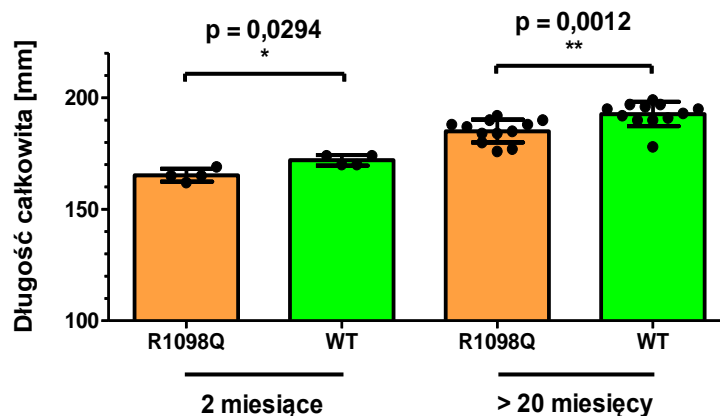
Tabela 4. Porównanie masy ciała myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Wiek	2-miesięczne		12-miesięczne		> 20-miesięczne	
	R1098Q	WT	R1098Q	WT	R1098Q	WT
Ogólnie	$19,68 \pm 2,71$ g	$23,93 \pm 3,36$ g	$24,88 \pm 4,199$ g	$30,95 \pm 3,830$ g	$24,50 \pm 2,57$ g	$34,41 \pm 5,44$ g
Różnica	4,25 g (17,8%)		6,07 g (20%)		9,91 g (28,8%)	
Samice	$17,45 \pm 0,08$ g	$21,02 \pm 0,11$ g	$20,15 \pm 1,271$ g	$27,85 \pm 2,675$ g	$23,11 \pm 1,152$ g	$33,60 \pm 6,44$ g

Różnica	3,57 g (17%)		7,7 g (27,6%)		10,49 g (31,2%)	
Samce	21,90 ± 1,47 g	26,84 ± 0,10 g	27,25 ± 2,801 g	32,5 ± 3,431 g	27,28 ± 2,36 g	36,02 ± 2,60 g
Różnica	4,94 g (18,4%)		5,25g (16%)		8,74g (24,3%)	

3.3.2. Długość całkowita.

Podobnie jak dla masy ciała tak również w zebranych pomiarach dla długości całkowitej różnica występuje zarówno pomiędzy 2-miesięcznymi myszami Spna2R1098Q a dzikim (* $p = 0,0294$, $n_1 = 4$, $n_2 = 4$, $U = 0$) jak i pomiędzy ponad 20-miesięcznymi myszami Spna2R1098Q oraz dzikim (** $p = 0,0012$, $n_1 = 12$, $n_2 = 12$, $U = 15,5$), opisane wyniki badań zaprezentowano na rycinie nr 9. Dwumiesięczne myszy Spna2R1098Q mają średnio długość $165,3 \pm 2,87$ mm, jednocześnie myszy dzikie będące ich rówieśnikami lub pochodzące z tego samego miotu w tym samym okresie mierzą $172 \pm 2,31$ mm. Różnica w długości całkowitej pomiędzy fenotypem dzikim a Spna2R1098Q w wieku 2 miesiące wynosi 6,7 mm, co stanowi niecałe 4%. Wśród myszy ponad 20-miesięcznych średnia długość całkowita myszy Spna2R1098Q wyniosła $185,1 \pm 5,16$ mm, natomiast myszy dzikie osiągały średnio $192,8 \pm 5,50$ mm, świadczy to o występowaniu 7,7 mm różnicy pomiędzy fenotypami, co także odpowiada 4%. Dokładne dane zebrano w tabeli 5. Mutacja Spna2R1098Q istotnie w sposób negatywny wpływa na rozmiar myszy.



Ryc. 9. Porównanie długości całkowitej myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Pomiary zebrano dla dwóch grup wiekowych (2-miesięcznych i ponad 20-miesięcznych) myszy. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o test Mann'a-Whitney'a. Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami (●) zaznaczono długość całkowitą każdej myszy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tabela 5. Porównanie długości całkowitej myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

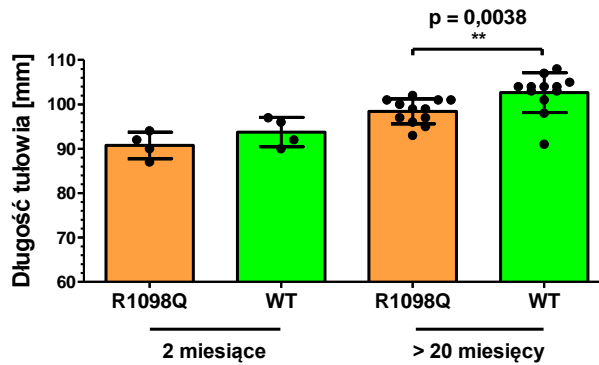
Wiek	2-miesięczne		> 20-miesięczne	
Fenotyp	R1098Q	WT	R1098Q	WT
Ogólnie	165,3 ± 2,87 mm	172 ± 2,31 mm	185,1 ± 5,16 mm	192,8 ± 5,50 mm
Różnica	6,7 mm (3,9%)		7,7 mm (4%)	
Samice	163,5 ± 2,12 mm	170 mm	182,6 ± 4,47 mm	191,3 ± 5,75 mm
Różnica	6,5 mm (3,8%)		8,7 mm (4,5%)	
Samce	167 ± 2,83 mm	174 mm	190 ± 1,63 mm	195,8 ± 3,95 mm
Różnica	7 mm (4%)		5,8 mm (3%)	

3.3.3. Długość tułowia.

Pomiędzy 20-miesięcznymi myszami Spna2R1098Q a dzikimi istnieje różnica (**p = 0,0038, n₁ = 12, n₂ = 12, U = 21,5) w długości tułowia, co ilustruje ryc. 10. Długość tułowia młodych myszy Spna2R1098Q osiągnęła średnio 90,75 ± 2,99 mm, tymczasem długość tułowia młodych myszy dzikich wyniosła 93,75 ± 3,30 mm, czyli dysproporcja wyniosła 3 mm (3,2%). Długość tułowia starych myszy Spna2R1098Q osiąga przeciętnie długość 98,42 ± 2,81 mm, z kolei tułów starych myszy dzikich osiąga długość 102,7 ± 4,48 mm, zatem 20-miesięczne myszy Spna2R1098Q są mniejsze o 4,28 mm (4,2%). Szczegółowe dane z pomiarów zamieszczono w tabeli 6. Mutacja działa ograniczająco na długość tułowia myszy w późniejszym wieku.

Tabela 6. Porównanie długości tułowia myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Wiek	2-miesięczne		> 20-miesięczne	
Fenotyp	R1098Q	WT	R1098Q	WT
Ogólnie	90,75 ± 2,99 mm	93,75 ± 3,30 mm	98,42 ± 2,81 mm	102,7 ± 4,48 mm
Różnica	3 mm (3,2%)		4,28 mm (4,2%)	
Samice	88,50 ± 2,12 mm	91 ± 1,41 mm	97,38 ± 2,83 mm	102,9 ± 5,28 mm
Różnica	2,5 mm (2,7%)		5,52 mm (5,4%)	
Samce	93 ± 1,41 mm	96,50 ± 0,71 mm	100,5 ± 1,29 mm	102,3 ± 2,87 mm
Różnica	3,5 mm (3,6%)		1,8 mm (1,8%)	



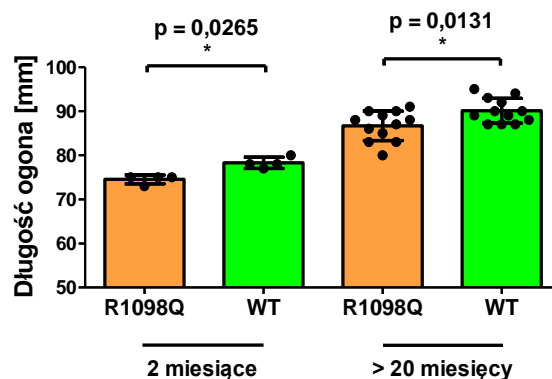
Ryc. 10. Porównanie długości tułowia myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Pomiary wykonano dla dwóch grup wiekowych (2-miesięcznych i ponad 20-miesięcznych) myszy. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o test Mann'a-Whitney'a. Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami (●) zaznaczono długość tułowia każdej myszy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.3.4. Długość ogona.

Myszy Spna2R1098Q mają krótszy ogon w porównaniu do myszy dzikich w grupie dwumiesięcznej (* $p = 0,0265$, $n_1 = 4$, $n_2 = 4$, $U = 0$) i ponad 20-miesięcznej (* $p = 0,0131$), co ukazano na ryc. 11. Średnia długość ogona dla myszy Spna2R1098Q i dzikich w zależności od wieku wyniosła dla: 2-miesięcznych myszy Spna2R1098Q – $74,5 \pm 1$ mm, 2-miesięcznych myszy dzikich – $78,25 \pm 1,26$ mm, ponad 20-miesięcznych myszy Spna2R1098Q – $86,67 \pm 3,37$ mm oraz wśród 20-miesięcznych myszy dzikich – $90,08 \pm 2,81$ mm. Pomiędzy młodymi myszami różnica ta wyniosła 3,75 mm, co stanowi niemal 5%. Natomiast rozbieżność dla starszych myszy osiągnęła wartość 3,4 mm (blisko 4%). Dane z pomiarów umieszczono w tabeli 7.

Jednym z efektów mutacji jest nieznaczne skrócenie długości ogona myszy niosących mutację Spna2R1098Q.



Ryc. 11. Zestawienie długości ogona myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

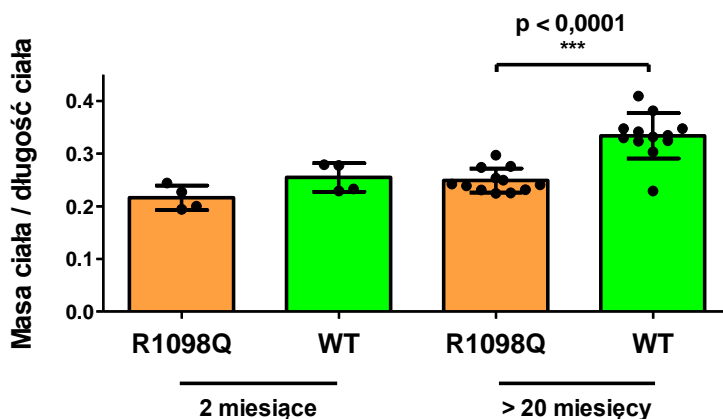
Dane zebrano w obrębie dwóch grup wiekowych (2-miesięcznych i ponad 20-miesięcznych) myszy. W analizie statystycznej zastosowano test t-Student'a oraz Mann'a-Whitney'a. Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami (●) zaznaczono długość ogona każdej myszy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tabela 7. Porównanie długości ogona myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Wiek	2-miesięczne		> 20-miesięczne	
Fenotyp	R1098Q	WT	R1098Q	WT
Ogólnie	74,5 ± 1 mm	78,25 ± 1,26 mm	86,67 ± 3,37 mm	90,08 ± 2,81 mm
Różnica	3,75 mm (4,8%)		3,4 mm (3,8%)	
Samice	75 mm	79 ± 1,41 mm	85,25 ± 3,2	88,38 ± 1,3 mm
Różnica	4 mm (5,1%)		3 mm (3,4%)	
Samce	74 ± 1,41 mm	77,5 ± 0,71 mm	89,5 ± 1,29 mm	93,5 ± 1,29
Różnica	3,5 mm (4,5%)		4 mm (4,3%)	

3.3.5. Stosunek wagi do długości tułowia.

Współczynnik Mc/Dc wyraża stosunek masy ciała do długości ciała. Wartość współczynnika dla młodych myszy Spna2R1098Q wyniosła $0,216 \pm 0,023$ a dla dzikich $0,255 \pm 0,027$, czyli wartość współczynnika była o 15% mniejsza dla młodych myszy z mutacją. Dowodzi to, iż myszy dzikie są większe i bardziej rozbudowane w stosunku do myszy Spna2R1098Q. Uzyskane na podstawie zebranych danych wartości współczynnika Mc/Dc wskazują, że myszy Spna2R1098Q mają odmienny i zaburzony stosunek Mc/Dc, świadczący o tym, iż są mniejsze, szczuplejsze oraz smuklejsze [pod względem masy i wielkości/rozmiarów] w obu grupach wiekowych, chociaż różnica ta (*** $p < 0,0001$) jest zdecydowanie bardziej widoczna wśród starszych myszy Spna2R1098Q ($0,249 \pm 0,023$) względem dzikich ($0,334 \pm 0,043$), a zatem wartość stosunku była o 25% mniejsza w grupie myszy z mutacją. Rycina nr 12 przedstawia rezultaty uzyskanych pomiarów i analiz.



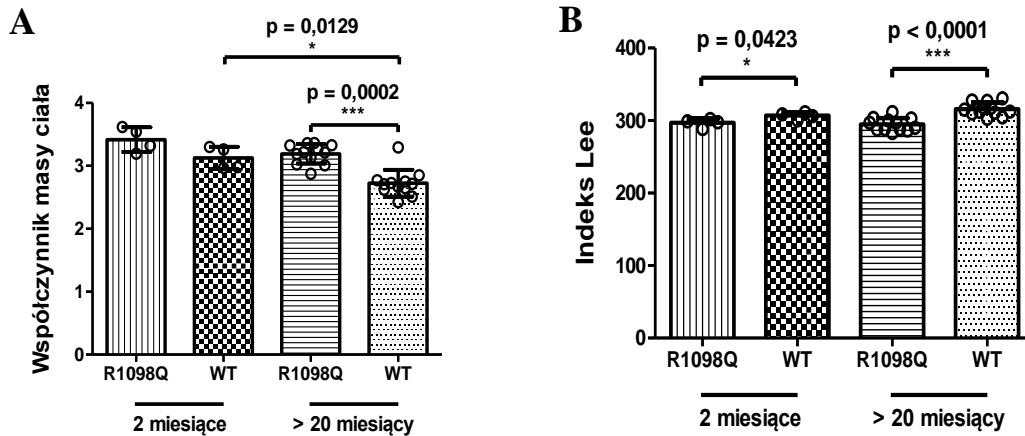
Ryc. 12. Współczynnik stosunku masy ciała do długości ciała myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Pomiary wykonano w obrębie dwóch grup wiekowych (2-miesięcznych i ponad 20-miesięcznych) myszy. W analizie statystycznej zastosowano test t-Student'a. Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami (●) zaznaczono stosunek Mc/Dc każdej myszy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.3.6. Indeks masy ciała myszy i indeks otyłości Lee.

Współczynnik masy ciała (stosunek powierzchni ciała do masy ciała) wskazuje na występowanie różnic (***) $p = 0,0002$, $n_1 = 12$, $n_2 = 12$, $U = 8$) pomiędzy ponad 20-miesięcznymi myszami Spna2R1098Q i dzikimi oraz spadek indeksu z wiekiem u myszy dzikich (* $p = 0,0129$). Istnienie różnic ($p < 0,0001$) pomiędzy ponad 20-miesięcznymi myszami Spna2R1098Q i dzikimi potwierdza również indeks Lee (pierwiastek sześcienny z masy ciała / długość tułowia), dodatkowo ujawniając różnicę (* $p = 0,0423$) w grupie 2-miesięcznych myszy (ryc. 13). Obliczone wartości współczynnika masy ciała prezentowały się w poszczególnych grupach następująco: 2-miesięczne myszy Spna2R1098Q – $3,419 \pm 0,195$, 2-miesięczne myszy dzikie – $3,129 \pm 0,178$, ponad 20-miesięczne myszy Spna2R1098Q – $3,193 \pm 0,155$ mm oraz wśród 20-miesięcznych myszy dzikich – $2,724 \pm 0,213$. Natomiast indeks Lee osiągnął wartość dla 2-miesięcznych myszy Spna2R1098Q – 297 ± 6 , 2-miesięcznych myszy dzikich – 307 ± 5 mm, ponad 20-miesięcznych myszy Spna2R1098Q – 295 ± 8 oraz wśród 20-miesięcznych myszy dzikich – 316 ± 9 .

Mutacja prowadzi do zmian w proporcji powierzchni lub długości tułowia do masy ciała.

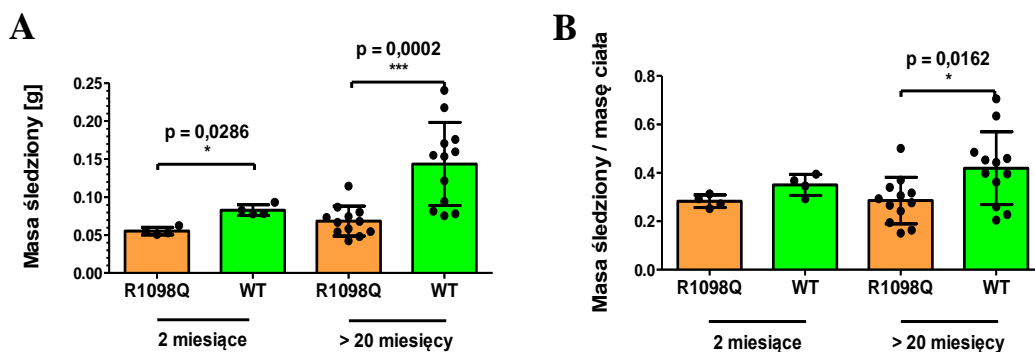


Ryc. 13. Współczynnik masy ciała i indeks Lee myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Współczynnik masy ciała (A). Indeks Lee (B). Pomiar wykonano w obrębie dwóch grup wiekowych (2-miesięcznych i ponad 20-miesięcznych) myszy. W analizie statystycznej zastosowano test t-Student'a oraz Mann'a-Whitney'a. Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Okręgami (O) zaznaczono współczynnik masy ciała każdej myszy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.3.7. Masa śledziony i stosunek masy śledziony do wagi myszy.

Śledziona starszych myszy Spna2R1098Q ($0,0684 \pm 0,0196$ g, $n = 12$) była 2 razy mniejsza niż ich dzikich odpowiedników ($0,1436 \pm 0,0547$ g, $n = 12$) i różnica wyniosła $0,0752$ g, co stanowiło 52%. W przypadku młodych myszy Spna2R1098Q ($0,0552 \pm 0,005$ g) śledziona była 1,5 razy mniejsza niż śledziona młodych myszy dzikich ($0,0829 \pm 0,007$ g), zatem różnica osiągnęła $0,0277$ g, co odpowiada 33 %. Powyższe rezultaty badań zaprezentowano na rycinie nr 14A. Mutacja prowadzi do redukcji wielkości śledzion u myszy Spna2R1098Q, gdyż mają wyraźnie mniejsze śledziona w porównaniu do dzikich myszy zarówno w grupie młodych (* $p = 0,0286$, $n_1 = 4$, $n_2 = 4$, $U = 0$) oraz starszych myszy (***) $p = 0,0002$)



Ryc. 14. Porównanie masy śledziony oraz wartości współczynnika będącego stosunkiem masy śledziony do masy ciała myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Masa śledziony (A). Stosunek masy śledziony do masy ciała myszy (B). Badania przeprowadzono wśród dwóch grup wiekowych (2-miesięcznych i ponad 20-miesięcznych) myszy. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu t-Student'a oraz Mann'-Whitney'a. Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami (●) zaznaczono masę śledziony lub stosunek Ms/Mc każdej myszy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).*

Współczynnik stosunku masy śledziony do masy ciała (Ms/Mc) potwierdził różnicę występującą pomiędzy starszymi myszami Spna2R1098Q oraz dzikimi (* $p = 0,0162$). Wartość współczynnika dla młodych myszy Spna2R1098Q wyniosła $0,283 \pm 0,026$, podczas gdy wśród młodych myszy dzikich osiągnął wartość $0,35 \pm 0,043$, a zatem dla młodych myszy Spna2R1098Q był o niemal 20% niższy. Wartość współczynnika dla starszych myszy Spna2R1098Q wyniosła $0,285 \pm 0,096$, podczas gdy wśród starszych myszy dzikich osiągnął wartość $0,419 \pm 0,150$, a zatem dla starszych myszy Spna2R1098Q był mniejszy o nieco ponad 30%. Graficzna interpretacja współczynnika (Ms/Mc) znajduje się na ryc. 14B.

3.4. Oznaczenie poziomu α -II i β -III spektryny oraz białka GFAP w lizatach mózdkowych myszy R1098Q.

Mutacja Spna2R1098Q występuje α -II spektrynie. Jednocześnie α -II spektryna jest niezbędna do wiązania β spektryn, które ulegają degradacji, jeśli nie są złożone z α spektryną. Łącząc się ze sobą tworzą heterodimery. Postanowiono określić wpływ mutacji na ekspresję α -II i β -III spektryny oraz GFAP. W tym celu zastosowano metodę Western blot do jakościowej i ilościowej oceny poziomu białek α -II i β -III spektryny oraz GFAP w mózdkach myszy Spna2R1098Q i kontrolnych. W przypadku białek α -II i β -III spektryny na ścieżkę nakładano po 15 ug lizatów, natomiast dla GFAP po 50 ug lizatów.

3.4.1. α -II spektryna.

Z analizy densytometrycznej Western blot zademonstrowanej na ryc. 15 i 16, wynika, iż stosunek poziomu α -II spektryny do aktywności w lizatach mózdkowych wyniósł 2,158 dla myszy kontrolnych, zaś 1,852 dla myszy Spna2R1098Q, a w konsekwencji poziom α -II spektryny u heterozygotycznych myszy Spna2R1098Q stanowił w przybliżeniu 86% zawartości

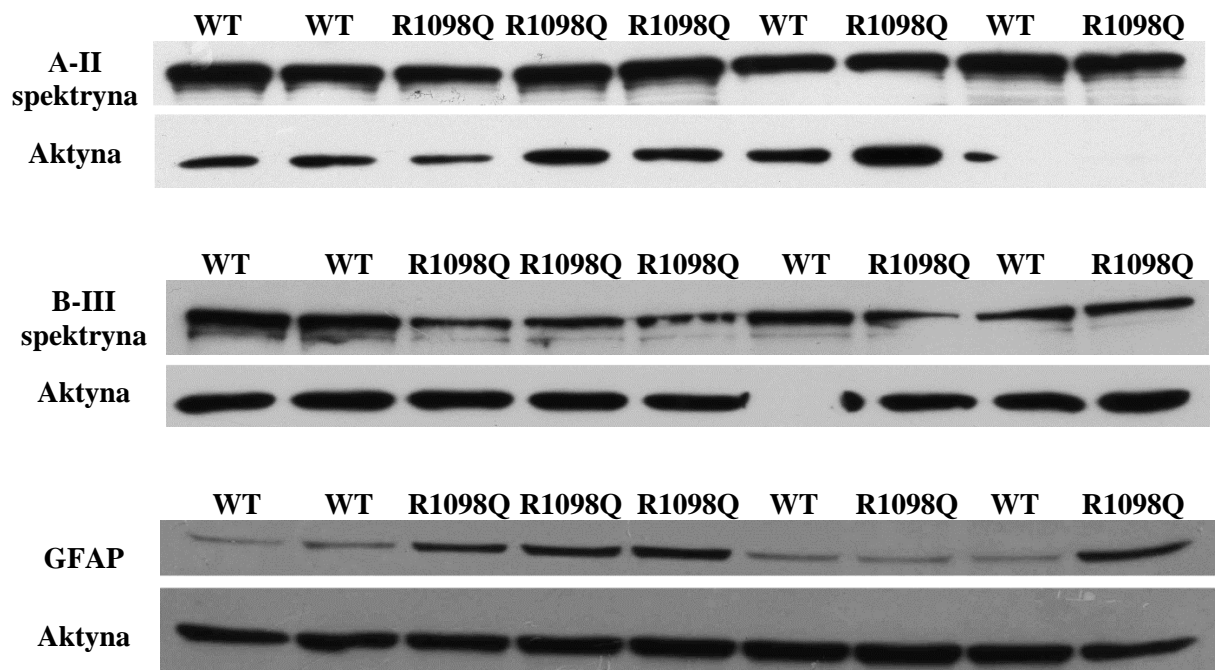
α -II spektryny obserwowanej w lizatach mózdkowych myszy kontrolnych, co wskazuje na nieistotny statystycznie trend obniżenia ekspresji tego białka w mózdkach.

3.4.2. B-III spektryna.

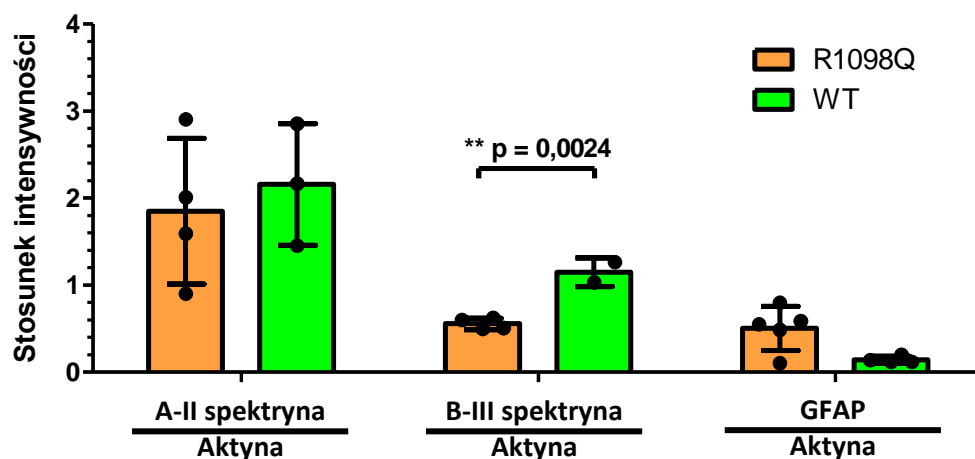
Stosunek β -III spektryny do aktyny osiągnął wartość 1,149 dla myszy kontrolnych, podczas gdy 0,558 dla heterozygotycznych myszy Spna2R1098Q, co świadczy, iż u myszy Spna2R1098Q występuje o 51,4% niższy poziom β -III (** $p = 0,0024$) w odniesieniu do myszy kontrolnych, co przedstawiono na ryc. 15 i 16.

3.4.3. GFAP.

Proporcja GFAP do aktyny wyniosła 0,145 w przypadku myszy kontrolnych, natomiast 0,506 dla myszy Spna2R1098Q, wobec czego heterozygotyczne myszy Spna2R1098Q wykazują 3,5-krotne podwyższenie poziomu GFAP w mózdku (ryc.15 i 16). Świadczy to o nieistotnej statystycznej tendencji mutacji do podwyższenia ekspresji GFAP. Należy zaznaczyć, że 1 z 5 próbek myszy Spna2R1098Q znacząco odstawała. Odrzucając tę jedną próbkę proporcja GFAP do aktyny wyniosła 0,607 w grupie myszy Spna2R1098Q, a różnica zyskała istotność statystyczną (* $p = 0,0286$, $n_1 = 4$, $n_2 = 4$, $U = 0$).



Ryc. 15. Western blotting reaktywności przeciwciał przeciwko α -II spektrynie, β -III spektrynie i GFAP wobec lizatów mózdkowych myszy heterozygotycznych Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).



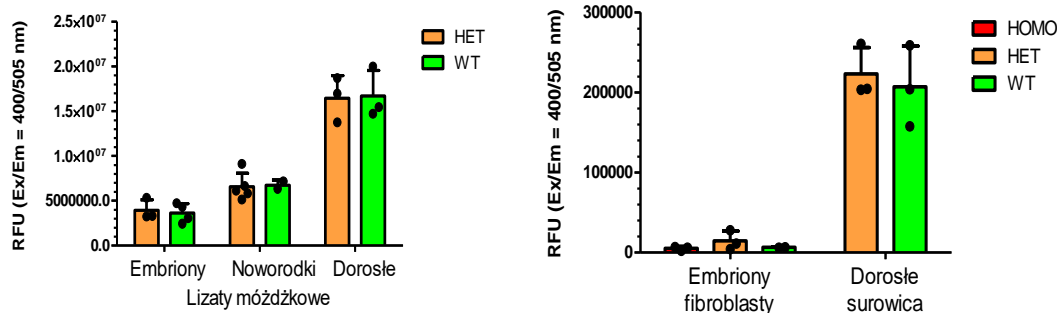
Ryc. 16. Ocena zawartości α -II spektryny, β -III spektryny i GFAP w lizatach mózdkowych myszy heterozygotycznych Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).

Ekspresja każdego z białek została znormalizowana względem poziomu aktyny. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu t-Student'a oraz Mann'a-Whitney'a. Słupki przedstawiają średnią gęstość optyczną sygnałów. Kropki (●) reprezentują stosunek intensywności sygnału badanych białek do sygnału aktyny dla poszczególnych próbek. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe.

3.5. Oznaczenie aktywności kalpajny w mózdkach, fibroblastach oraz surowicy krwi myszy R1098Q

W naturalnych procesach biologicznych spektryny są cięte przez kalpainę. Ze względu na zaobserwowane różnice w poziomie białek α -II i β -III spektryny w mózdkach, postanowiono sprawdzić czy różnice te nie były spowodowane odmienną aktywnością kalpajny.

Aktywność kalpajny w mózdkach wzrasta równomiernie wraz z wiekiem zarówno u myszy heterozygotycznych jak i dzikich. Nie wykazano różnicy w aktywności kalpajny w lizatach z mózdków fibroblastach i surowicy krwi na żadnym z analizowanych etapów rozwojowych (zarodkowym, noworodkowym, dorosłym) pomiędzy myszami heterozygotycznymi i dzikimi, co zaprezentowano na ryc. 17. Aktywność kalpajny w pierwotnych hodowlach, mysich heterozygotycznych fibroblastów płodowych była 2,26 razy większa (o 126%) w stosunku do fibroblastów embrionów o dzikim genotypie. Dla fibroblastów pozyskanych z zarodków homozygot aktywność kalpajny wyniosła 80,2% poziomu aktywności zanotowanej dla fibroblastów embrionów o dzikim genotypie. Nie ma różnicy w aktywności kalpajny pomiędzy myszami heterozygotycznymi a dzikimi.



Ryc. 17. Aktywność kalpajny w lizatach mózdkowych, fibroblastach i surowicy krwi.

Aktywność kalpajny została wyrażona w relatywnych jednostkach fluorescencji (RFU) przypadających na 1 mg lizatu mózdkowego, dla 200 tys. Kom. Fibroblastów lub 2 μ l surowicy krwi. Słupki przedstawiają średnią aktywność kalpajny w badanym materiale. Kropki (●) reprezentują aktywność kalpajny w każdej zmierzonej próbce. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe.

3.6. Testy sprawności motorycznej i siły mięśniowej myszy R1098Q.

Myszy Spna2R1098Q charakteryzują się zaburzeniami ruchowymi w postaci chwiejnego chodu, niezborności ruchowej, drgawek oraz przez napady motoryczne mają problem z utrzymaniem równowagi, przez co upadają. Zaobserwowano, iż napady motoryczne oraz trudności w poruszaniu się pogłębiają się wraz z wiekiem. W celu oceny progresji zaburzeń zdolności motorycznych u myszy Spna2R1098Q oraz czy zaburzenia te wpływają na sprawność myszy Spna2R109Q względem myszy kontrolnych przeprowadzono testy sprawności motorycznej takie jak test obracającego się wałka, koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów, siły mięśniowej oraz analizę chodu w celu sprawdzenia koordynacji ruchowej, deficytów ruchowych oraz siły mięśniowej.

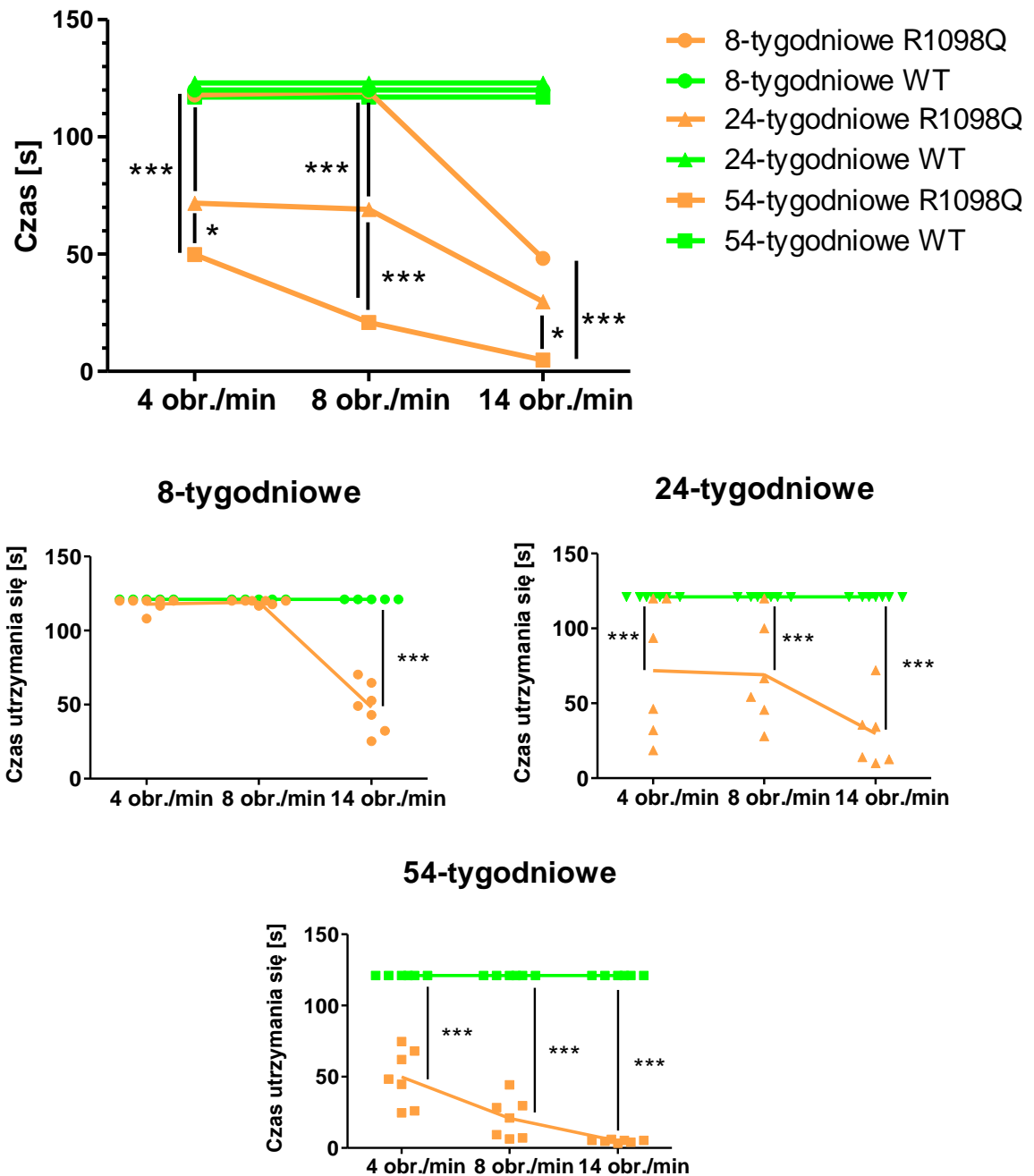
3.6.1. Test obracającego się wałka.

Wyniki badań dowiodły istotnej statystycznie progresji zaburzeń koordynacji ruchowej w obrębie myszy Spna2R1098Q wraz z wiekiem i ze wzrostem prędkości obrotów wałka. Co obserwowano jako spadek sprawności motorycznej wszystkich badanych grup wiekowych myszy Spna2R1098Q, podczas gdy wszystkie myszy dzikie niezależnie od wieku osiągały zawsze maksymalny założony czas testu wynoszący 120 sekund, co pokazano na ryc. 18. Analiza ANOVA w modyfikacji Kruskala-Wallisa wykazała, że istniała istotna interakcja między wiekiem myszy R1098Q, $H(2, N = 60) = 26,824$, $p = 0,0001$, a prędkością rotarodu $H(2, N =$

60) = 16,384, $p = 0,0003$ na czas upadku z urządzenia. Wykazano także istotną statystycznie różnicę w czasie utrzymania się na urządzeniu pomiędzy myszami Spna2R1098Q i dzikimi we wszystkich 3 grupach wiekowych. 8-tygodniowe myszy Spna2R1098Q przy obrotach wałka równych 4 i 8 obr./min radzą sobie równie dobrze w teście jak 8-tygodniowe myszy dzikie, natomiast przy zwiększeniu obrotów do 14 obr./min czas utrzymania się był znacznie krótszy (** $p < 0,001$). Średni czas poruszania się 8-tygodniowych myszy Spna2R1098Q przy prędkości 14 obr./min wyniósł $48,19 \pm 16,244$ s (min – 32,33 s; max – 70,33 s). Pomędzy 24-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q oraz 24-tygodniowymi myszami dzikimi występują istotne statystycznie dysproporcje (** $p < 0,001$) w czasie spędzonym na urządzeniu dla wszystkich prędkości (4, 8 i 14 obr./min). Średni czas utrzymania się 24-tygodniowych myszy Spna2R1098Q wyniósł dla 4 obr./min – $71,78 \pm 45,123$ s (min – 18,67 s; max – 120 s), 8 obr./min – $69,11 \pm 34,664$ s (min – 28 s; max – 100 s) i 14 obr./min – $29,78 \pm 3,542$ s (min – 10 s; max – 72 s). Również wyniki naszych badań wskazują na istotne statystyczne różnice (** $p < 0,001$) w czasie utrzymania się na wałku dla trzech prędkości (4, 8 i 14 obr./min) pomiędzy 54-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q a 54-tygodniowymi myszami dzikimi. Średni czas utrzymania się 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q wyniósł dla 4 obr./min – $49,76 \pm 19,685$ s (min – 24,67 s; max – 74,67 s), 8 obr./min – $20,86 \pm 14,262$ s (min – 6,33 s; max – 44,33 s) i 14 obr./min – $4,86 \pm 0,920$ s (min – 3,33 s; max – 6 s). Zaprezentowane dane zebrano w tabeli 8.

Istotną statystycznie różnicę (** $p < 0,001$) w czasie spędzonym na urządzeniu pomiędzy 8-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q a 54-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q zanotowano dla wszystkich 3 użytych prędkości (4 obr./min – 117,81 s vs 49,76 s; 8 obr./min – 119,19 s vs 20,86 s; 14 obr./min – 48,19 s vs 4,857 s). 54-tygodniowe myszy Spna2R1098Q uzyskały gorszy średni czas od 8-tygodniowych myszy Spna2R1098Q o 57,76%, 82,5% i 89,91% odpowiednio dla prędkości 4, 8 i 14 obr./min. Pomędzy 8-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q a 24-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q dysproporcja w utrzymaniu się na wałku (** $p < 0,001$) wystąpiła dla prędkości 4 i 8 obr./min (4 obr./min – 117,81 s vs 71,78; 8 obr./min – 119,19 s vs 69,11 s), natomiast nie zanotowano różnicy dla prędkości 14 obr./min. 24-tygodniowe myszy Spna2R1098Q uzyskały gorszy średni czas od 8-tygodniowych myszy Spna2R1098Q o 39,07%, 42,01% i 38,2% odpowiednio dla prędkości 4, 8 i 14 obr./min. W przypadku 24-tygodniowych myszy Spna2R1098Q i 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q odnotowano rozbieżność (* $p < 0,05$) w czasie spędzonym na obracającym się wałku dla 4 i 14 obr./min (4 obr./min – 71,78 s vs 49,76 s; 14 obr./min – 29,78 s vs 4,86 s), podczas gdy dla prędkości 8 obr./min różnica wyniosła ** $p < 0,001$ (8 obr./min – 69,11 s vs 20,86 s). Dla 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q zanotowano spadek o 30,68%, 69,82% i 83,68%

w uzyskanym średnim czasie przebywania na wałku względem 24-tygodniowych myszy Spna2R1098Q. Podsumowanie danych zawarto w tabeli 9.



Ryc. 18. Analiza wpływu mutacji Spna2R1098Q (R1098Q) na zdolność utrzymania się myszy na obracającym się wałku.

W teście zastosowano trzy prędkości obracania się wałka (4, 8 i 14 obrotów/minutę). Doświadczenie wykonano na trzech grupach wiekowych (8, 24 i 54-tygodniowych) myszy. Test przeprowadzono na 38 myszach (18 myszy dzikich i 20 myszy Spna2R1098Q), w tym grupie 8-tygodniowej (5 myszy dzikich i 7 myszy Spna2R1098Q), grupie 24-tygodniowej (7 myszy dzikich i 6 myszy Spna2R1098Q) i grupie 54-tygodniowej (6 myszy dzikich i 7 myszy Spna2R1098Q).

Maksymalny zadany czas doświadczenia wynosił 120 sekund. Średnią dla każdej myszy obliczono na podstawie trzech pomiarów dla każdej prędkości. Kropki, trójkąty i kwadraty (●, ▲, ■) reprezentują średni czas uzyskany przez każdą mysz w danych warunkach. Wszystkie myszy dzikie (WT) osiągnęły maksymalny zadany czas 120 sekund z tego względu linie ich wykresów zostały oddzielone. Statystykę obliczono za pomocą testu t-Student'a, Mann'a-Whitney'a oraz dwustronnej analizy wariancji (ANOVA) oraz dwustronną ANOVA w modyfikacji Kruskala-Wallisa. Statystycznie istotne różnice między myszami R1098Q i dzikimi oraz w obrębie myszy R1098Q wskazujące na progresję fenotypu zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tabela 8. Test obracającego się wałka.

	Spna2R1098Q			WT		
	8-tygodni	24-tygodnie	54-tygodnie	8-tygodni	24-tygodnie	54-tygodnie
4 obr./min	117,81	71,78 ± 45,123 s	49,76 ± 19,685 s	120	120	120
8 obr./min	119,19	69,11 ± 34,664 s	20,86 ± 14,262 s	120	120	120
14 obr./min	48,19 ± 16,244 s	29,78 ±2 3,542 s	4,86 ± 0,920 s	120	120	120

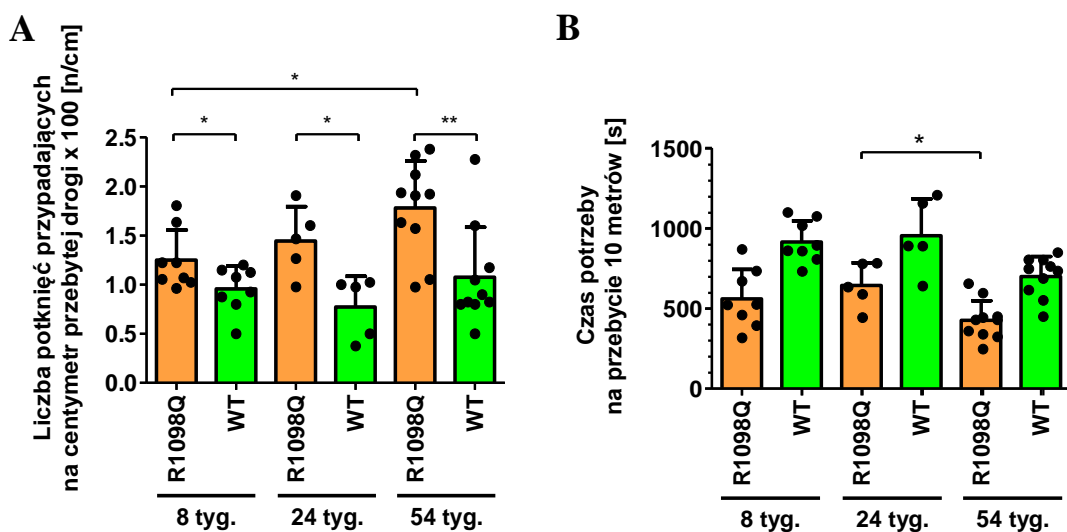
Tabela 9. Progresja fenotypu Spna2R1098Q w teście obracającego się wałka.

	8 vs 24-tygodniowe	8 vs 54-tygodniowe	24 vs 54-tygodniowe
4 obr./min	117,81 s vs 71,78 s	117,81 s vs 49,76 s	71,78 s vs 49,76 s
	39,07%	57,76%	30,68%
8 obr./min	119,19 s vs 69,11 s	119,19 s vs 20,86 s	69,11 s vs 20,86 s
	42,01%	82,5%	69,82%
14 obr./min	48,19 s vs 29,78 s	48,19 s vs 4,857 s	29,78 s vs 4,86 s
	38,2%	89,91%	83,68%

3.6.2. Test koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów.

Analiza liczby błędnie postawionych kroków podczas chodu na siatce z równoległych prętów wykazała (ryc. 19), iż w każdej grupie wiekowej myszy Spna2R1098Q znacznie częściej stawały błędnie kroki niż myszy dzikie (pomiędzy 8-tygodniowymi myszami * $p = 0,0491$; 24-tygodniowymi myszami * $p = 0,0127$, 54-tygodniowymi ** $p = 0,0051$), potwierdzając deficyty koordynacji ruchowej zaobserwowane w teście obracającego się wałka. Również test ten potwierdza zaobserwowaną w teście obracającego się wałka, progresję zaburzeń koordynacji

ruchowej w obrębie fenotypu Spna2R1098Q, wyrażoną jako wzrastająca liczba potknięć wraz z wiekiem, zwłaszcza pomiędzy grupą 8 i 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q (** $p = 0,0153$), podczas gdy liczba potknięć myszy dzikich utrzymuje się na jednakowym poziomie. Liczba błędnie postawionych kroków zarejestrowanych dla poszczególnych grup wiekowych myszy Spna2R1098Q i dzikich wyglądała następująco: 8-tygodniowe myszy dzikie – $0,00956 \pm 0,00233$ potknięć/cm przebytej drogi [n/cm], 24-tygodniowe myszy dzikie – $0,00775 \pm 0,00312$ n/cm, 54-tygodniowe myszy dzikie – $0,01075 \pm 0,00512$ n/cm, 8-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $0,01250 \pm 0,00307$ n/cm, 24 tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $0,01444 \pm 0,00349$ n/cm, 54 tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $0,01782 \pm 0,00479$ n/cm. Dodatkowo wśród 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q zaobserwowano wzrost aktywności ruchowej w porównaniu z 24-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q (* $p = 0,0280$, $n_1 = 5$, $n_2 = 10$, $U = 7$) oraz ogólny trend większej aktywności myszy Spna2R1098Q w odniesieniu do myszy dzikich. Czas potrzebny na pokonanie dystansu 10 metrów w teście przez myszy prezentował się następująco: 8-tygodniowe myszy dzikie ($916,6563 \pm 131,9313$ s), 24-tygodniowe myszy dzikie ($955,150 \pm 229,703$ s), 54-tygodniowe myszy dzikie ($699,550 \pm 126,0495$), 8-tygodniowe myszy Spna2R1098Q ($560,625 \pm 183,8953$ s), 24 tygodniowe myszy Spna2R1098Q ($644,700 \pm 142,0259$ s), 54 tygodniowe myszy Spna2R1098Q ($426,825 \pm 122,9875$ s).



Ryc. 19. Graficzna interpretacja danych testu koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów.

Liczba potknięć przypadających na centymetr przebytej drogi (A). Czas potrzebny na pokonanie 10 metrów drogi (B). Liczba błędnie stawianych kroków została przedstawiona jako liczba potknięć przypadających na centymetr pokonanej odległości [n/cm]. Badanie przeprowadzono na 58 myszach (28 myszy dzikich (WT) i 30 myszy Spna2R1098Q (R1098Q)), w tym grupie 8-tygodniowej (13 myszy dzikich i 15 myszy Spna2R1098Q), grupie 24-tygodniowej (5 myszy dzikich i 5 myszy Spna2R1098Q myszy) i grupie 54-tygodniowej (10 myszy dzikich i 10 myszy

Spna2R1098Q). Słupki przedstawiają średnią dla grupy. Kropki (●) reprezentują średni wynik uzyskany przez każdą mysz na podstawie czterech pomiarów (jedna próba/dzień). Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Statystykę obliczono za pomocą testu *t*-Student'a i *Mann'a-Whitney'a*. Statystycznie istotne różnice między myszami *R1098Q* i dzikimi oraz obrębie myszy *R1098Q* wskazujące na progresję fenotypu zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

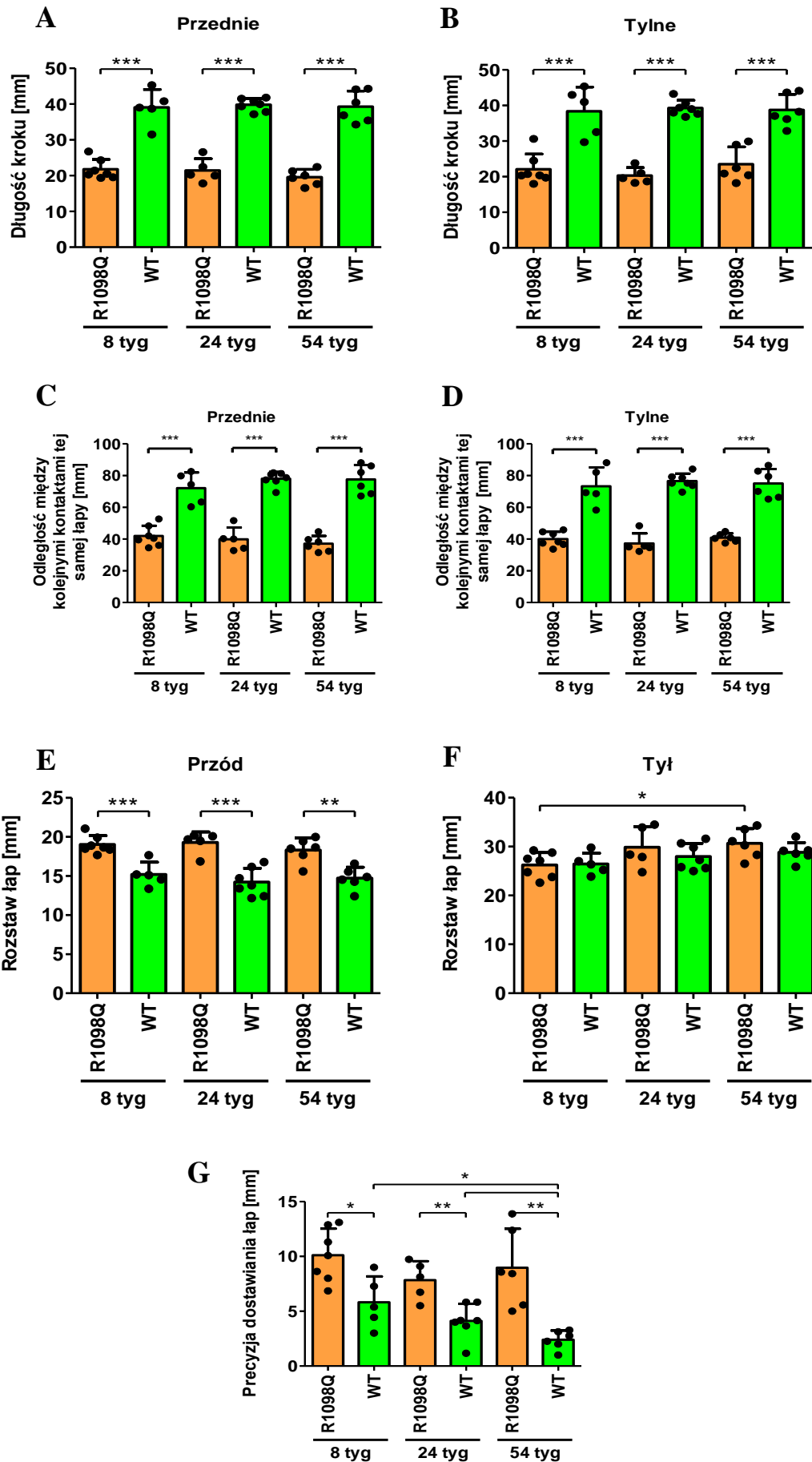
3.6.3. Test analizy chodu zwierząt.

Długość stawianych kroków przez myszy *Spna2R1098Q* jest prawie o połowę krótsza niż długość kroków myszy dzikich dla wszystkich badanych grup wiekowych zarówno dla przednich jak i tylnych łap (*** $p < 0,0001$), co zaprezentowano na ryc. 20A i B. Długość stawianych kroków przez 8-tygodniowe myszy *Spna2R1098Q* wynosiła $21,755 \pm 2,771$ mm dla przednich łap i $22,054 \pm 4,254$ mm dla tylnych łap, podczas gdy przez 8-tygodniowe myszy dzikie $39,070 \pm 4,984$ mm (przednich) oraz $38,340 \pm 6,821$ mm (tylnych), a zatem różnica w długości stawianych kroków wynosiła $17,315$ mm (44%) i $16,286$ mm (42%) odpowiednio dla przednich i tylnych łap. Długość stawianych kroków przez 24-tygodniowe myszy *Spna2R1098Q* wynosiła $21,437 \pm 3,312$ mm dla przednich łap i $20,267 \pm 2,248$ mm dla tylnych łap, natomiast przez 24-tygodniowe myszy dzikie $39,799 \pm 1,772$ mm (przednich) oraz $39,254 \pm 2,173$ mm (tylnych), czyli różnica w długości stawianych kroków wyniosła $18,362$ mm (46%) i $18,987$ mm (48%) odpowiednio dla przednich i tylnych łap. Długość stawianych kroków przez 54-tygodniowe myszy *Spna2R1098Q* wynosiła $19,554 \pm 2,191$ mm dla przednich łap i $23,488 \pm 4,824$ mm dla tylnych łap, z kolei przez 54-tygodniowe myszy dzikie $39,262 \pm 4,368$ mm (przednich) oraz $38,720 \pm 4,402$ mm (tylnych), a zatem różnica w długości stawianych kroków wynosiła $19,708$ mm (50%) i $15,232$ mm (39%) odpowiednio dla przednich i tylnych łap. Dane uzyskane w doświadczeniu zebrano w tabeli 10.

Odległości między kolejnymi kontaktami tych samych łap także były niemal o połowę krótsze (*** $p < 0,0001$) u myszy *Spna2R1098Q* w odniesieniu do myszy dzikich dla wszystkich trzech doświadczalnych grup wiekowych (ryc. 20C i D) i wyniosły dla: 8-tygodniowych myszy dzikich – $72,106 \pm 9,865$ mm (dla przednich łap); $73,285 \pm 11,839$ mm (dla tylnych łap), 24-tygodniowych myszy dzikich – $77,962 \pm 4,297$ mm (przednich); $76,567 \pm 4,624$ mm (tylnych), 54-tygodniowych myszy dzikich – $77,577 \pm 9,061$ mm (przednich); $75,074 \pm 9,012$ mm (tylnych), 8-tygodniowych myszy *Spna2R1098Q* – $41,930 \pm 6,487$ mm (przednich); $39,988 \pm 4,587$ mm (tylnych), 24-tygodniowych myszy *Spna2R1098Q* – $39,839 \pm 7,446$ mm (przednich); $37,182 \pm 6,400$ mm (tylnych), 54-tygodniowych myszy *Spna2R1098Q* – $37,015 \pm 4,930$ mm (przednich); $40,833 \pm 2,669$ mm (tylnych).

Rozstaw przednich łap myszy Spna2R1098Q podczas przemieszczania się jest szerszy o co najmniej 25% w porównaniu do myszy dzikich we wszystkich badanych grupach wiekowych (pomiędzy 8-tygodniowymi myszami *** $p = 0,0006$; 24-tygodniowymi *** $p = 0,0003$; 54-tygodniowymi ** $p = 0,0017$), co ukazano na rycinie 20E i F. Tymczasem nie zaobserwowano różnicy pomiędzy myszami Spna2R1098Q i dzikimi w rozstawie tylnych łap, ale stwierdzono zwiększenie rozstawu tylnych łap (* $p = 0,0148$) pomiędzy 8 i 54-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q. Rozstaw przednich i tylnych łap myszy Spna2R1098Q i dzikich w poszczególnych grupach wiekowych prezentował się następująco: 8-tygodniowe myszy dzikie – $15,196 \pm 1,566$ mm (przednie); $26,461 \pm 2,198$ mm (tylne), 24-tygodniowe myszy dzikie – $14,220 \pm 1,774$ mm (przednie); $27,974 \pm 2,689$ mm (tylne), 54-tygodniowe myszy dzikie – $14,722 \pm 1,397$ mm (przednie); $28,839 \pm 1,973$ mm (tylne), 8-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $19,024 \pm 1,125$ mm (przednie); $26,254 \pm 2,543$ mm (tylne), 24-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $19,273 \pm 1,362$ mm (przednie); $29,897 \pm 4,170$ mm (tylne), 54-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $18,325 \pm 1,550$ mm (przednie); $30,685 \pm 2,995$ mm (tylne). Różnica w rozstawie przednich łap pomiędzy 8-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q i dzikimi wyniosła 3,828 mm (25%), 24-tygodniowymi 5,053 mm (36%) oraz 54-tygodniowymi 3,603 mm (24%).

Interpretacja chodu myszy wskazuje na znaczną różnicę w precyzji dostawiania łap między myszami Spna2R1098Q a dzikimi we wszystkich badanych grupach wiekowych oraz powiększającą się wraz z wiekiem (ryc. 20G), która dla 8-tygodniowych myszy wyniosła 4,3 mm (74%) * $p = 0,0120$, 24-tygodniowych 3,722 mm (90%) ** $p = 0,0030$ oraz 54-tygodniowych już aż 6,568 mm (273%) ** $p = 0,0071$. Jednocześnie myszy dzikie wraz z wiekiem coraz dokładniej dostawiają kończyny do siebie, co wskazuje na rosnącą precyzję kroków wraz z wiekiem myszy dzikich. Rozbieżność obserwowano zarówno pomiędzy 8 i 54-tygodniowymi dzikimi myszami (* $p = 0,0370$) oraz 24 i 54-tygodniowymi myszami dzikimi (* $p = 0,0363$). W poszczególnych grupach wiekowych i genotypowych myszy osiągnęły następujące rezultaty dla tego parametru: 8-tygodniowe myszy dzikie – $5,821 \pm 2,361$ mm, 24-tygodniowe myszy dzikie – $4,116 \pm 1,571$ mm, 54-tygodniowe myszy dzikie – $2,402 \pm 0,846$ mm, 8-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $10,121 \pm 2,422$ mm, 24-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $7,838 \pm 1,730$ mm, 54-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $8,970 \pm 3,561$ mm.



Ryc. 20. Długości kroków, rozstawu i precyzji dostawiania łap przez myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz dzikie (WT).

Długość kroku dla przednich kończyn (A) i tylnych kończyn (B). Odległość między kolejnymi śladami tej samej łapy przedniej (C) i tylnej (D). Rozstaw łap przednich NP. i tylnych (F). Precyzja dostawiania łap (G). Test przeprowadzono na 36 myszach (18 myszy dzikich i 18 myszy Spna2R1098Q), w tym grupie 8-tygodniowych (młodych) (5 myszy dzikich i 7 myszy Spna2R1098Q), grupie 24-tygodniowych (dorosłych) (7 myszy dzikich i 5 myszy Spna2R1098Q) i grupie 54-tygodniowych (stara) (6 myszy dzikich i 6 myszy Spna2R1098Q). Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami (●) zaznaczono średnią uzyskaną przez każdą mysz dla co najmniej pięciu kolejnych kroków. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną wykonano posługując się testem t-Studenta i Mann'a-Whitney'a oraz dwustronną ANOVA z modyfikacją Bonferroni'ego. Statystycznie istotne różnice między myszami R1098Q i dzikimi (WT) zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Analiza chodu myszy dostarczyła dowodów, iż mutacja Spna2R1098Q zaburza zdolności motoryczne myszy oraz potwierdziła obserwacje z testu obracającego się wałka i koordynacji chodu po siatce oraz progresję fenotypu z wiekiem.

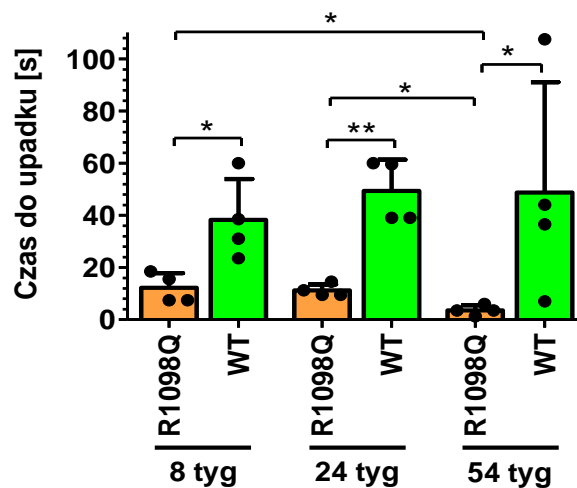
Tabela 10. Długości kroków, rozstawu i zbieżności dostawiania łap myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz dzikich (WT).

Wiek		8-tygodniowe		24-tygodniowe		54-tygodniowe	
Fenotyp		R1098Q	WT	R1098Q	WT	R1098Q	WT
Długość kroków	Przód	21,755 ± 2,771 mm	39,070 ± 4,984 mm	21,437 ± 3,312 mm	39,799 ± 1,772 mm	19,554 ± 2,191 mm	39,262 ± 4,368 mm
	Tył	22,054 ± 4,254 mm	38,340 ± 6,821 mm	20,267 ± 2,248 mm	39,254 ± 2,173 mm	23,488 ± 4,824 mm	38,720 ± 4,402 mm
Różnica	Przód	17,315 mm (44%)		18,362 mm (46%)		19,708 mm (50%)	
	Tył	16,286 mm (42%)		18,987 mm (48%)		15,232 mm (39%)	
Odległość między kolejnymi kontaktami tej samej łapy	Przód	41,930 ± 6,487 mm	72,106 ± 9,865 mm	39,839 ± 7,446 mm	77,962 ± 4,297 mm	37,015 ± 4,930 mm	77,577 ± 9,061 mm
	Tył	39,988 ± 4,587 mm	73,285 ± 11,84 mm	37,182 ± 6,400 mm	76,567 ± 4,624 mm	40,833 ± 2,669 mm	75,074 ± 9,012 mm
Różnica	Przód	30,176 mm (42%)		38,123 mm (49%)		40,562 mm (52%)	
	Tył	33,297 mm (45%)		39,385 mm (51%)		34,241 mm (46%)	

Rozstaw łap	Przód	19,024 ± 1,125 mm	15,196 ± 1,566 mm	19,273 ± 1,362 mm	14,220 ± 1,774 mm	18,325 ± 1,550 mm	14,722 ± 1,397 mm
	Tył	26,254 ± 2,543 mm	26,461 ± 2,198 mm	29,897 ± 4,170 mm	27,974 ± 2,689 mm	30,685 ± 2,995 mm	28,839 ± 1,973 mm
Różnica	Przód	3,828 mm (25%)		5,053 mm (36%)		3,603 mm (24%)	
Zbieżność dostawiania łap		10,121 ± 2,422 mm	5,821 ± 2,361 mm	7,838 ± 1,730 mm	4,116 ± 1,571 mm	8,970 ± 3,561 mm	2,402 ± 0,846 mm
Różnica		4,3 mm (74%)		3,722 mm (90%)		6,568 mm (273%)	

3.6.4. Test siły mięśniowej „wire-hang”.

Zaobserwowano, iż myszy Spna2R1098Q odznaczają się około 3-krotnie, 4,5-krotnie oraz 14,5-krotnie krótszym czasem do upadku mięśniowego w wolnym zwisie na linie stalowej w stosunku do myszy dzikich odpowiednio w 8-tygodniowej (* $p = 0,0294$; $n_1 = 4$, $n_2 = 4$, $U = 0$), 24-tygodniowej (** $p = 0,0082$) i 54-tygodniowej grupie wiekowej (* $p = 0,0294$; $n_1 = 4$, $n_2 = 4$, $U = 0$), co świadczy o mniejszej sile i wytrzymałości mięśniowej myszy Spna2R1098Q w porównaniu z myszami dzikimi (ryc. 21). Dodatkowo analiza danych dostarczyła informacji o progresji fenotypu Spna2R1098Q z wiekiem, widocznej jako skrócenie czasu upadku pomiędzy 24 a 54-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q (* $p = 0,0294$, $n_1 = 4$, $n_2 = 4$, $U = 0$), a także między 8-tygodniowym a 54-tygodniowymi myszami Spna2R1098Q (* $p = 0,0265$). Średnie czasy do upadku myszy z zawieszonoego pręta były następujące: 8-tygodniowe myszy dzikie – $38,250 \pm 15,740$ s, 24-tygodniowe myszy dzikie – $49,375 \pm 11,982$ s, 54-tygodniowe myszy dzikie – $48,750 \pm 42,298$ s, 8-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $12,250 \pm 5,620$ s, 24-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $11,188 \pm 2,357$ s i 54-tygodniowe myszy Spna2R1098Q – $3,563 \pm 1,941$ s.



Ryc. 21. Czas utrzymywania się myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT) w wolnym zwisie na lince stalowej.

Doświadczenie przeprowadzono na 24 myszach (12 myszy dzikich i 12 myszy Spna2R1098Q) podzielonych na trzy grupy wiekowe: 8-tygodniową (4 myszy dzikie i 4 myszy Spna2R1098Q), 24-tygodniową (4 myszy dzikie i 4 myszy Spna2R1098Q) i 54-tygodniową (4 myszy dzikie i 4 myszy Spna2R1098Q). W każdej grupie były 2 samice i 2 samce. Słupki przedstawiają średni czas uzyskany przez daną grupę. Kropkami (●) zaznaczono średni czas uzyskany przez każdą mysz w dwóch następujących po sobie dniach, po jednej sesji na dzień składającej się z 2 prób. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną wykonano posługując się testem t-Student'a z lub bez korekty Welch'a i Mann'a-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice między myszami R1098Q i WT zaznaczono gwiazdkami ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).*

Pomiary w tym doświadczeniu dostarczyły kolejnych dowodów, iż mutacja Spna2R1098Q wpływa negatywnie na siłę i wytrzymałość mięśniową myszy oraz potwierdziła obserwowany w teście obracającego się wałka i testach koordynacji chodu negatywny wpływ mutacji na zdolności ruchowe oraz progresję fenotypu z wiekiem.

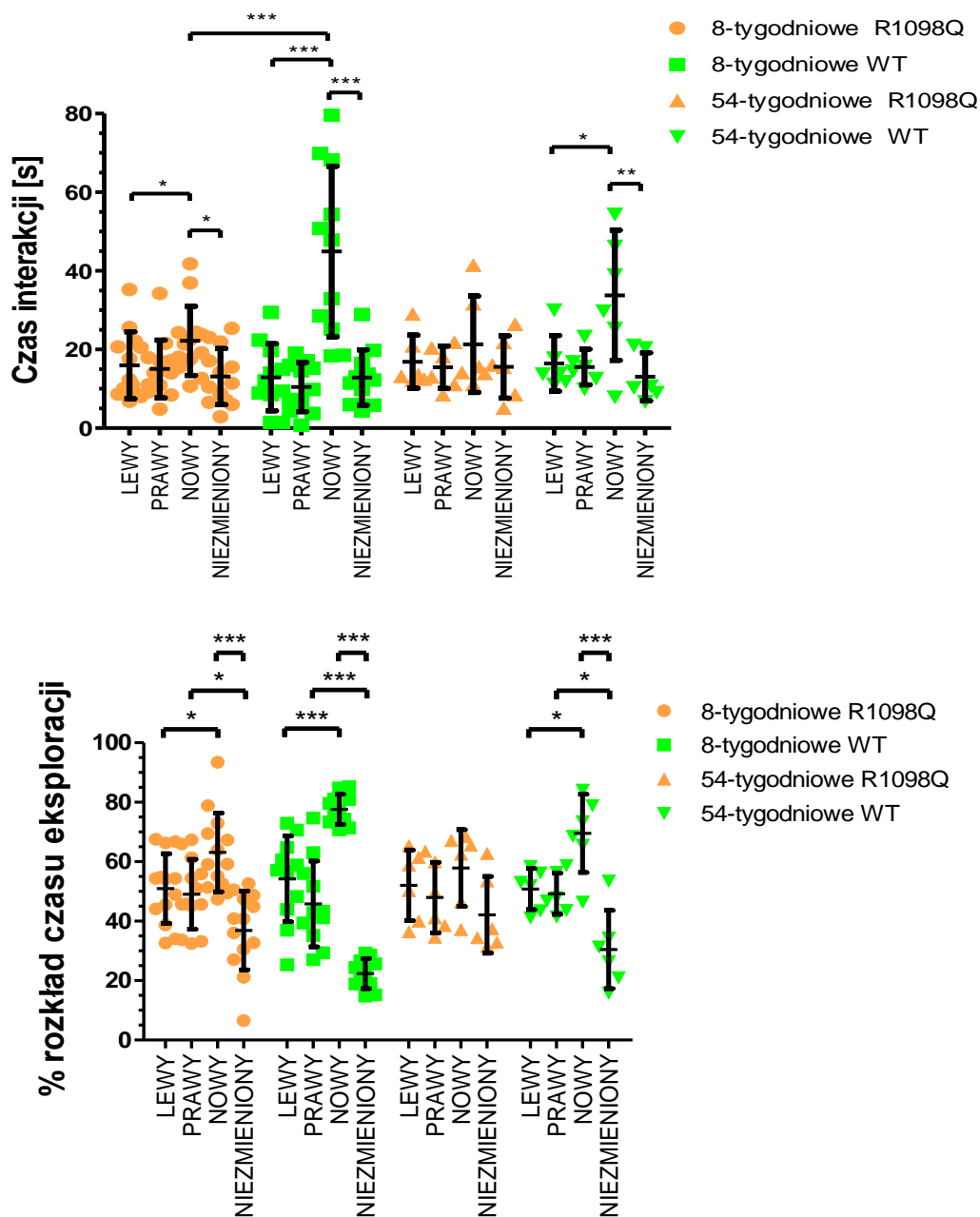
3.7. Testy pamięci (przestrzennej) myszy R1098Q:

W celu oceny wpływu mutacji Spna2R1098Q na rozwój umysłowy i zdolności poznawcze, w tym pamięć przestrzenną myszy Spna2R1098Q oraz ewentualnej progresji zaburzeń pamięci u myszy Spna2R1098Q z wiekiem przeprowadzono testy pamięci długotrwałej (test rozpoznawania nowych obiektów) i krótkotrwałej (test lokalizacji obiektu).

3.7.1. Test rozpoznawania nowych obiektów.

W pierwszej fazie tzw. Szkolenia, gdy oba obiekty były takie same, rozkład czasu interakcji pomiędzy obiektem lewym i prawym zarówno dla myszy Spna2R1098Q jak i dzikich wyniósł mniej więcej po 50% (ryc. 22). Gdy po 24 godzinach został wprowadzony nowy obiekt, zarówno myszy Spna2R1098Q jak i dzikie wykazały większe zainteresowanie nowym przedmiotem niż przedmiotem użytym w pierwszej fazie, jednakże czas interakcji z nowym przedmiotem był różny. Obie grupy wiekowe myszy dzikich wykazały znaczny (3,49-krotny w przypadku 8-tygodniowych *** $p < 0,001$ oraz 2,59-krotny w przypadku 54-tygodniowych ** $p < 0,01$) wzrost czasu eksploracji nowego obiektu w porównaniu z niezmienionym obiektem. Podczas gdy u 8-tygodniowych myszy Spna2R1098Q wystąpiło niewielkie zainteresowanie nowym przedmiotem (* $p < 0,05$), myszy spędzały 1,54-krotnie więcej czasu na eksplorację nowego obiektu. Natomiast w przypadku 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q dostrzeżono tylko

nieistotną oraz bardzo małą tendencją (1,37-krotny) wzrostu zainteresowania. Zatem myszy Spna2R1098Q, niezależnie od ich wieku, nie wykazywały znacząco zwiększonej uwagi na wprowadzenie nowego obiektu. Zarejestrowano znacznie krótszy czas (***) interakcji z nowym obiektem dla grupy 8-tygodniowych myszy Spna2R1098Q w odniesieniu do 8-tygodniowych myszy dzikich. Tej różnicy nie można było rozszerzyć na 54-tygodniowe myszy, głównie z powodu krótszych czasów eksploracji nowych obiektów prezentowanych przez stare myszy WT. Powyższe dane zostały zaprezentowane na ryc. 22. Czas interakcji z nowym obiektem wyniósł dla: 8-tygodniowych myszy Spna2R1098Q – 20,203 s, 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q – 21,329 s, 8-tygodniowych myszy dzikich – 44,927 s, 54-tygodniowych myszy – 33,788 s. Dokładne średnie czasy interakcji uzyskane przez myszy Spna2R1098Q oraz dzikie w obu grupach wiekowych zgromadzono w tabeli 11.



Ryc. 22. Czas eksploracji obiektów i procentowy rozkład czasu eksploracji w teście rozpoznawania nowych obiektów.

Obiekty w pierwszym dniu (tzw. Sesja treningowa) zostały oznaczone jako „lewy” i „prawy”, natomiast obiekty w drugim dniu (dzień testowy) jako „nowy” i „niezmieniony”. W teście wzięły udział 8 i 54-tygodniowe myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikie (WT) w sumie 36 myszy (17 myszy dzikich i 19 myszy Spna2R1098Q), z czego 24 myszy w grupie 8-tygodniowej (11 myszy dzikich i 13 myszy Spna2R1098Q) oraz 12 myszy w grupie 54-tygodniowej (6 myszy dzikich i 6 myszy Spna2R1098Q). Kreski (—) przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami, kwadratami i trójkątami (●, ■, ▲, ▼) zaznaczono średnią uzyskaną przez każdą mysz. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem dwustronnej ANOVA z modyfikacją Bonferroni’ego oraz testu t-Student’a. Statystycznie istotne różnice między i w obrębie i pomiędzy myszami R1098Q i WT zaznaczono gwiazdkami ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).*

Oprócz czasu eksploracji postanowiono również sprawdzić procentowy rozkład czasu interakcji z obiektami, by sprawdzić, czy uzyskane różnice dla czasu interakcji znajdą odbicie w procentowym udziale czasu poświęconym poszczególnym obiektom, czyli w jakich proporcjach myszy poświęcały czas każdemu obiektowi. Młode (8-tygodniowe) myszy Spna2R1098Q poświęciły procentowo znacznie więcej czasu (*** $p < 0,001$) nowemu obiektowi podobnie jak 8 i 54-tygodniowe myszy dzikie (*** $p < 0,001$), co zilustrowano na ryc. 22. Natomiast u 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q nie ma różnic w czasie jaki przeznaczyły na eksplorację nowego i niezmienionego obiektu, podczas gdy u 54-tygodniowych myszy dzikich odnotowano znaczny przyrost udziału czasu spędzonego z nowym obiektem (*** $p < 0,001$). Niezależnie od wieku i genotypu w pierwszej fazie doświadczenia myszy poświęcały mniej więcej po 50% czasu obu obiektom. W drugiej fazie eksperymentu 8-tygodniowe myszy Spna2R1098Q przeznaczyły 63% czasu na eksplorację nowego obiektu, tymczasem myszy dzikie w tym samym wieku prawie 78%. Roczne myszy Spna2R1098Q i dzikie przeznaczyły odpowiednio 58% oraz 70% z całkowitego czasu interakcji na eksplorację nowego obiektu. Poszczególne wartości rozkładu procentowego zamieszczono w tabeli 12. Zestawiając nowy obiekt z niezmienionym 8-tygodniowe myszy Spna2R1098Q poświęciły nowemu obiektowi 26,188% więcej czasu, 54-tygodniowe myszy Spna2R1098Q jedynie 15,75%, tymczasem 8 i 54-tygodniowe myszy dzikie odpowiednio 55,306% i 39,116%.

Tabela 11. Czas eksploracji obiektów w teście rozpoznawania nowych obiektów.

Faza testu	I Faza (sesja treningowa)		II faza (dzień testu)	
Obiekt	LEWY	PRAWY	NOWY	NIEZMIENIONY
8-tygodniowe Spna2R1098	15,975 ± 8,530 s	15,030 ± 7,338 s	20,203 ± 8,810 s	13,118 ± 7,146 s
8-tygodniowe dzikie	12,935 ± 8,512 s	10,457 ± 6,236 s	44,927 ± 21,687 s	12,872 ± 7,069 s
54-tygodniowe Spna2R1098	16,892 ± 6,776 s	15,497 ± 5,400 s	21,329 ± 12,285 s	15,571 ± 7,953 s
54-tygodniowe dzikie	16,458 ± 7,076 s	15,519 ± 4,542 s	33,788 ± 16,536 s	13,064 ± 6,132 s

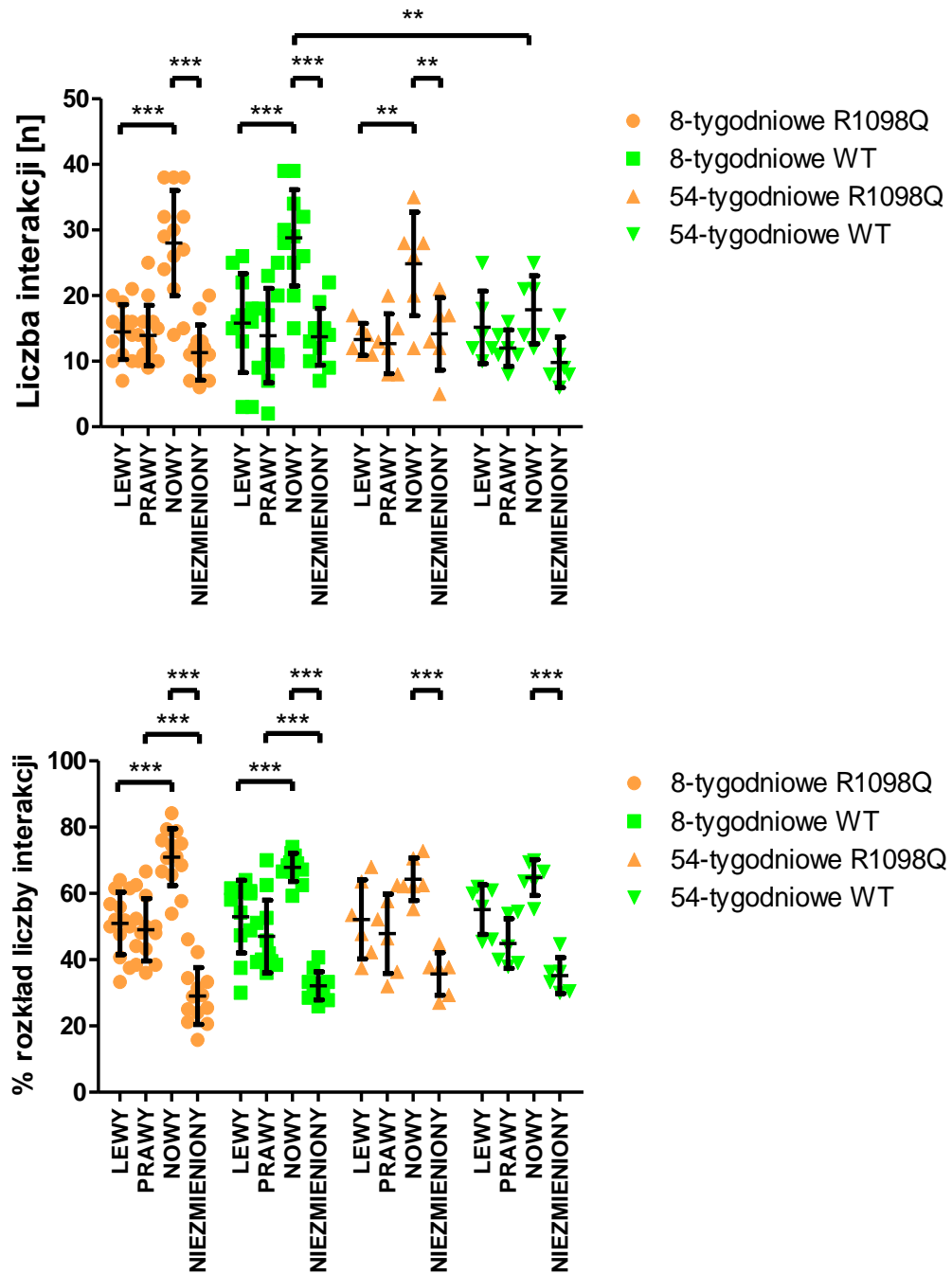
Tabela 12. Procentowy rozkład czasu eksploracji w teście rozpoznawania nowych obiektów.

Faza testu	I Faza (sesja treningowa)		II faza (dzień testu)	
Obiekt	LEWY	PRAWY	NOWY	NIEZMIENIONY
8-tygodniowe Spna2R1098	50,943 ± 11,763%	49,057 ± 11,763%	63,094 ± 13,245%	36,906 ± 13,245%
8-tygodniowe dzikie	54,210 ± 14,434%	45,790 ± 14,434%	77,653 ± 5,074%	22,347 ± 5,074%
54-tygodniowe Spna2R1098	52,073 ± 11,873%	47,927 ± 11,873%	57,875 ± 12,940%	42,125 ± 12,940%
54-tygodniowe dzikie	50,787 ± 6,935%	49,213 ± 6,935%	69,558 ± 13,164%	30,442 ± 13,164%

Ze względu na odnotowane różnice w czasie poświęconym na eksplorację przedmiotów, postanowiono dodatkowo oszacować liczbę interakcji oraz procentowy rozkład liczby interakcji z obiektami, by sprawdzić, czy skrócone czasy interakcji spowodowane niezbornością ruchową myszy R1098Q nie są rekompensowane przez zwiększenie liczby interakcji. W dniu treningowym liczba interakcji pomiędzy obiektami była niemalże równa we wszystkich badanych grupach i średnia mieściła się w przedziale od 12 do 16 interakcji (tabela 13). W dniu testowym liczba interakcji z nowym obiektem oraz różnica w liczbie interakcji pomiędzy nowym a niezmiennym obiektem była prawie identyczna dla 8-tygodniowych myszy (**p < 0,001), co przedstawiono na ryc. 23. Dla 8-tygodniowych myszy Spna2R1098Q zanotowano średnio 28 interakcji z nowym przedmiotem i 11,3 interakcji z niezmiennym, jednocześnie dla 8-tygodniowych myszy dzikich było to odpowiednio 28,8 oraz 13,7 interakcji. Większą liczbę interakcji (24,8) z nowym przedmiotem oraz dysproporcję (** p < 0,01) w liczbie interakcji między nowym a niezmiennym obiektem dostrzeżono również w grupie 54-tygodniowych myszy Spna2R1098Q, która nie wystąpiła u odpowiadającym im myszom dzikim, które wykonały 17,8 interakcji z nowym przedmiotem. W dodatku pomiędzy 8 i 54-tygodniowymi myszami dzikimi zaobserwowano istotny spadek liczby interakcji z nowym obiektem (**p < 0,01). Procentowy rozkład liczby interakcji pokazał, iż wszystkie grupy

w swoich kategoriach wiekowych poświęcają taki sam odsetek interakcji pomiędzy nowym i niezmiennym przedmiotem (**p < 0,01) w drugim dniu oraz pomiędzy lewym i prawym przedmiotem (**p < 0,01) w pierwszym dniu. W przypadku 8-tygodniowych myszy około 70% interakcji przypadało na nowy obiekt, zaś dla 54-tygodniowych myszy było to około 65%, przy blisko 50% rozkładzie interakcji między obiektami w pierwszym dniu.

Podsumowując powyższe dane potwierdzają, iż mutacja prowadzi do pogorszenia pamięci długotrwałej.



Ryc. 23. Liczba interakcji i procentowy rozkład liczby interakcji w teście rozpoznawania nowych obiektów.

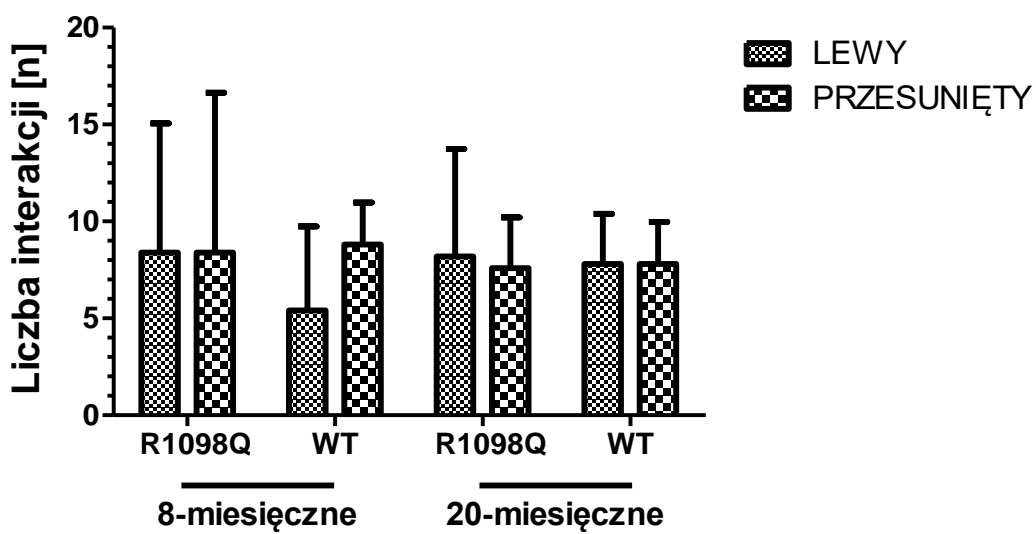
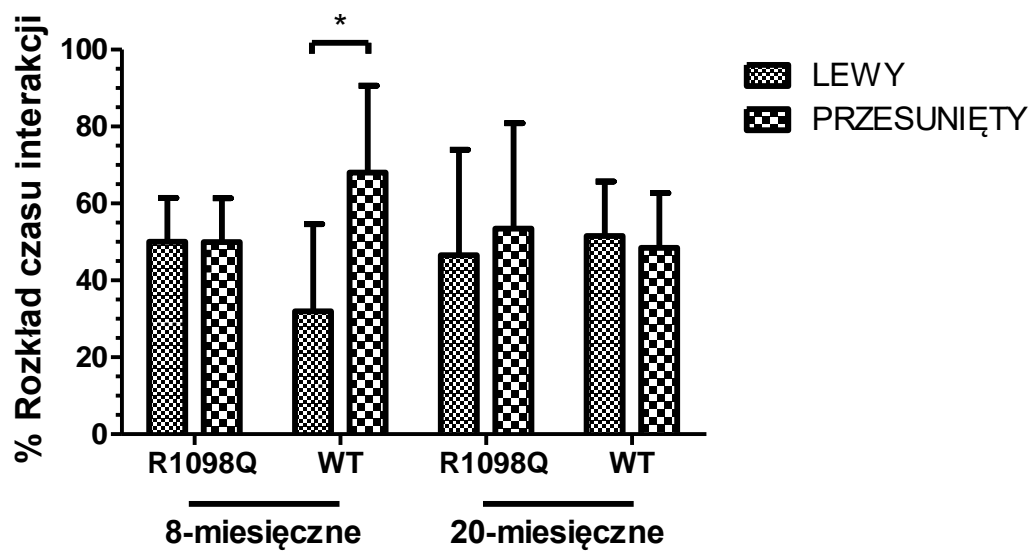
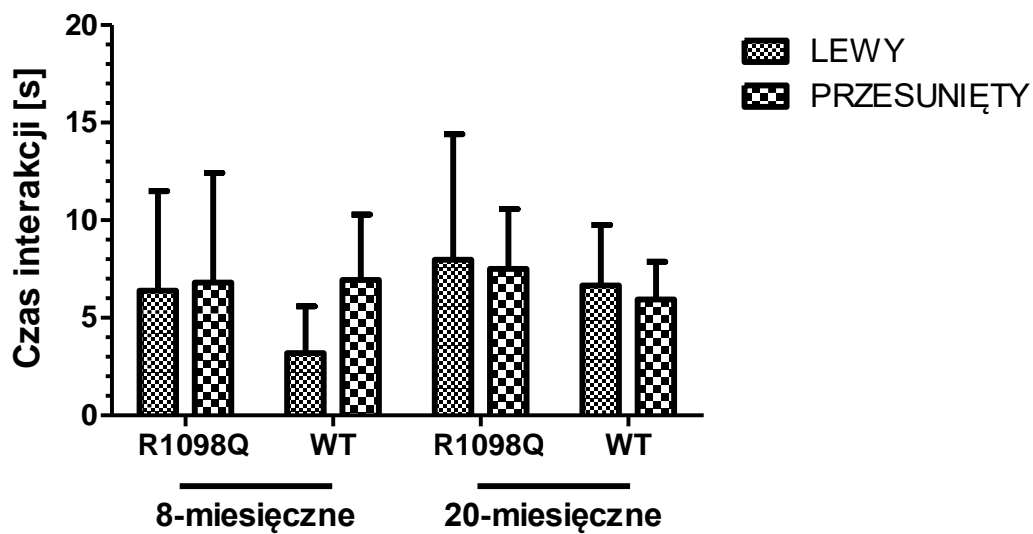
Obiekty w pierwszym dniu (tzw. Sesja treningowa) zostały oznaczone jako „lewy” i „prawy”, natomiast obiekty w drugim dniu (dzień testowy) jako „nowy” i „niezmieniony”. W teście wzięły udział 8 i 54-tygodniowe myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikie (WT) w sumie 36 myszy (17 myszy dzikich i 19 myszy Spna2R1098Q), z czego 24 myszy w grupie 8-tygodniowej (11 myszy dzikich i 13 myszy Spna2R1098Q) oraz 12 myszy w grupie 54-tygodniowej (6 myszy dzikich i 6 myszy Spna2R1098Q). Kreski (—) przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami, kwadratami i trójkątami (●, ■, ▲, ▼) zaznaczono średnią uzyskaną przez każdą mysz. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem dwustronnej ANOVA z modyfikacją Bonferroni’ego. Statystycznie istotne różnice między i w obrębie i pomiędzy myszami R1098Q i WT zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

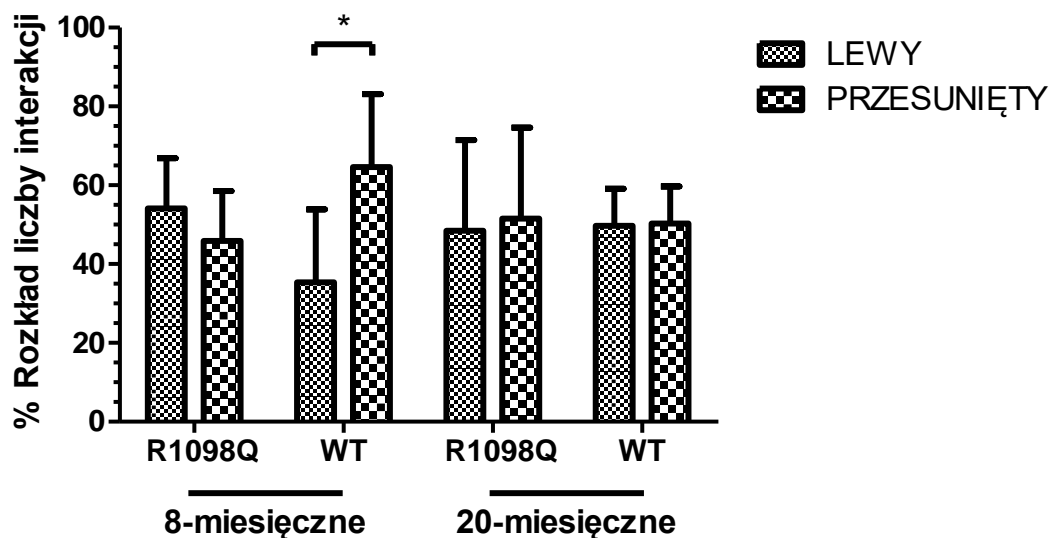
Tabela 13. Liczba interakcji w teście rozpoznawania nowych obiektów.

Faza testu	I Faza (sesja treningowa)		II faza (dzień testu)	
Obiekt	LEWY	PRAWY	NOWY	NIEZMIENIONY
8-tygodniowe Spna2R1098	14,462 ± 4,196	13,923 ± 4,591	28,00 ± 8,021	11,308 ± 4,211
8-tygodniowe dzikie	15,818 ± 7,547	13,909 ± 7,176	28,818 ± 7,332	13,727 ± 4,315
54-tygodniowe Spna2R1098	13,333 ± 2,422	12,667 ± 4,546	24,833 ± 7,910	14,167 ± 5,529
54-tygodniowe dzikie	15,167 ± 5,529	12,00 ± 2,757	17,833 ± 5,193	9,833 ± 3,869

3.7.2. Test lokalizacji obiektu.

Czas eksploracji, udział procentowy czasu, liczba interakcji i rozkład procentowy liczby interakcji z przedmiotami po zmianie lokacji jednego z nich był zbliżony dla wszystkich grup poza 8-miesięcznymi myszami dzikimi, które jako jedyne wykazały większe zainteresowanie przesuniętym przedmiotem, co potwierdziła istotna różnica w procentowym rozkładzie czasu eksploracji (* $p < 0,01$) i liczby interakcji (* $p < 0,01$), co zostało zademonstrowane na ryc. 24. Dodatkowo w przypadku czasu interakcji i liczby interakcji również tylko dla 8-tygodniowych myszy dzikich obserwowany jest nieistotny statystycznie trend, wskazujący na większe zainteresowanie przemieszczonym obiektem, co łącznie potwierdza, iż krótkotrwała pamięć przestrzenna myszy Spn2R1098Q jest gorsza.





Ryc. 24. Czas eksploracji, procentowy rozkład czasu eksploracji, liczba interakcji oraz procentowy rozkład liczby interakcji w teście lokalizacji obiektu.

Test przeprowadzono na 20 myszach (10 myszy dzikich (WT) i 10 myszy Spna2R1098Q (R1098Q)), w tym w grupie 8-miesięcznej (myszy 5 dzikich i 5 myszy Spna2R1098Q) oraz w grupie 20-miesięcznej (5 myszy dzikich i 5 myszy Spna2R1098Q). Słupki przedstawiają średni czas uzyskany przez daną grupę. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną wykonano w oparciu o dwustronną ANOVA z modyfikacją Bonferroni'ego. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

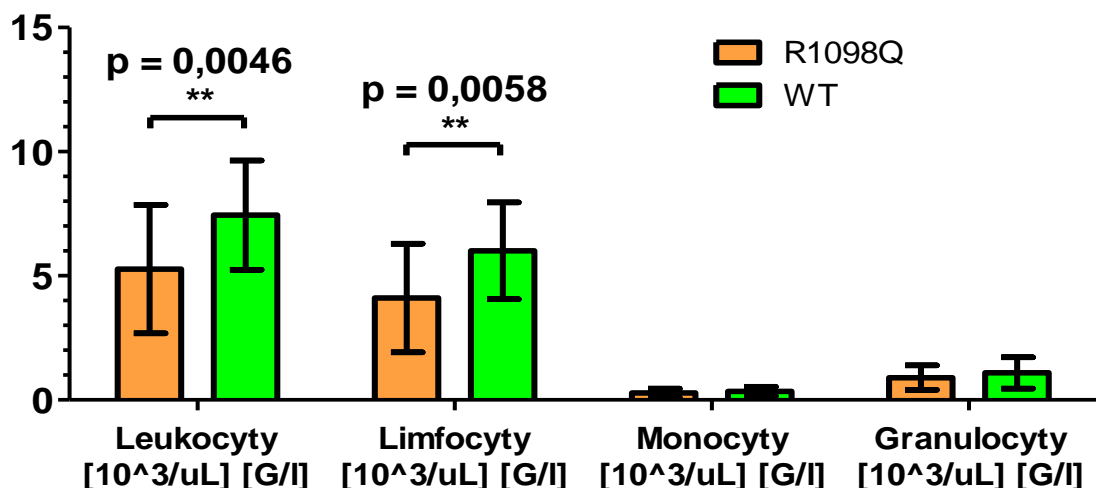
3.8. Morfologia krwi myszy Spna2R1098Q.

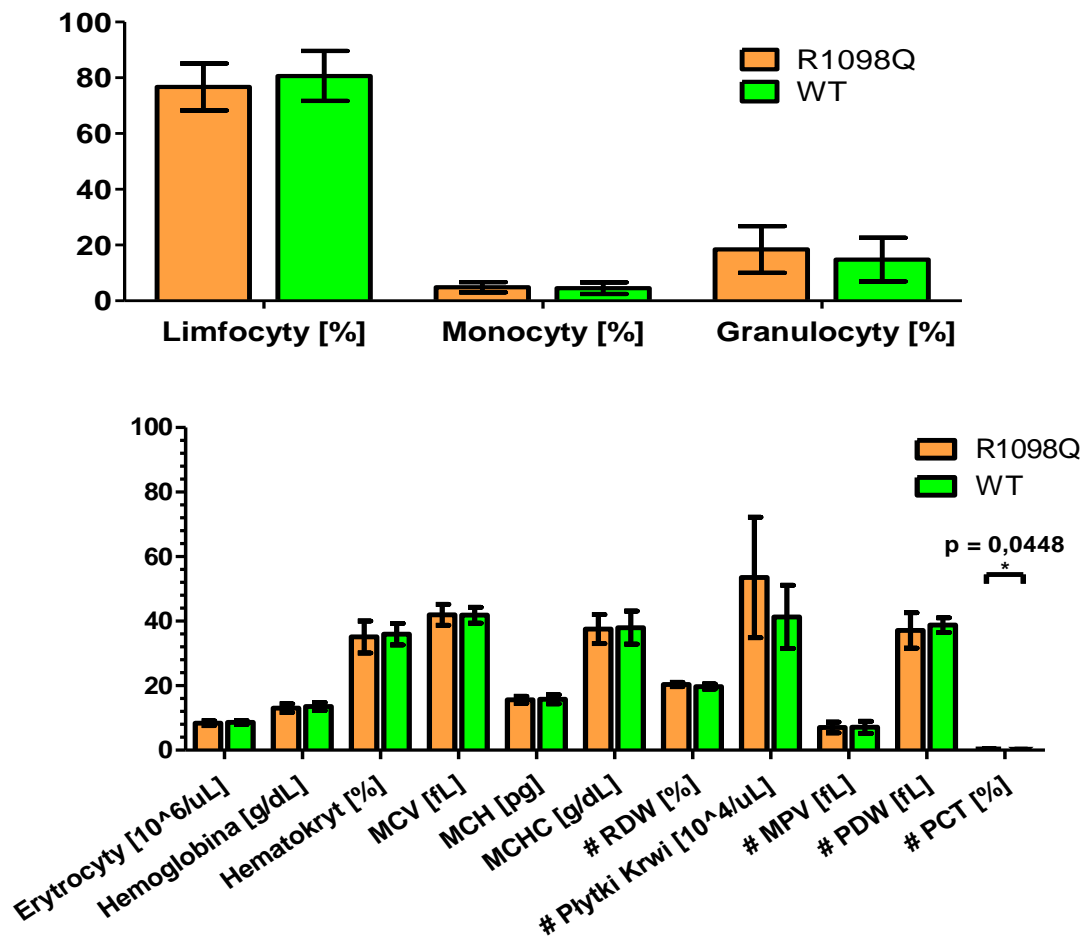
Analizę przeprowadzono w celu sprawdzenia czy mutacja Spna2R1098Q ma wpływ na morfologię krwi obwodowej. Ocenę parametrów morfologicznych krwi postanowiono przeprowadzić również ze względu na obserwowane i potwierdzone różnice w wielkości śledzion, by sprawdzić, czy zmiana ta nie skutkuje odmiennym rozkładem populacji poszczególnych leukocytów we krwi. Parametry krzepnięcia krwi postanowiono prześledzić ze względu na obserwowane wylewy u niektórych homozygotycznych embrionów. W tym celu pobrano próbki krwi i przesłano do oznaczenia maszynowego w laboratorium NeoLek IITD oraz zewnętrznym laboratorium Vetlab.

Z otrzymanych wyników wynika, iż myszy Spna2R1098Q mają obniżoną liczbę leukocytów (** $p = 0,0046$, $n_1 = 19$, $n_2 = 19$, $U = 83$) i limfocytów (** $p = 0,0058$, $n_1 = 19$, $n_2 = 19$, $U = 85,5$) przypadających na jednostkę objętości krwi oraz w objętości zajmowanej przez płytki krwi w krwi, czyli PCT (* $p = 0,0448$) w odniesieniu do myszy dzikich. Przebadana populacja myszy

Spna2R1098Q miała znaczący, bo aż 29,35% spadek liczby leukocytów przypadających na określoną jednostkę objętości krwi w stosunku do poziomu obserwowanego u myszy dzikich. Niemal taką samą tendencję zaobserwowano dla liczby limfocytów występujących w mikrolitrze krwi, gdzie wśród myszy Spna2R1098Q odnotowano ich ubytek, wynoszący 31,69% w porównaniu do myszy dzikich. Myszy R1098Q miały również mniejszą liczbę monocytów (18,5%) i granulocytów (17,8%) obecnych w mikrolitrze krwi, jednak obserwowane różnice nie osiągnęły istotności statystycznej. Podczas gdy nie zaobserwowano aż tak dużych różnic w udziale procentowym poszczególnych frakcji białych krwinek, co świadczy o podobnym składzie. Limfocyty stanowiły 76,69% i 80,64% wszystkich leukocytów odpowiednio u myszy Spna2R1098Q oraz dzikich. Granulocyty stanowiły 18,42% i 14,82% wszystkich leukocytów odpowiednio u myszy Spna2R1098Q oraz dzikich. Udział monocytów był taki sam dla obu genotypów myszy. Z kolei krew myszy Spna2R1098Q zawierała znacznie więcej płytek krwi w jednym mikrolitrze, aż o 29,58% oraz podwyższony także o 30% hematokryt płytkowy (PCT). Nie zaobserwowano rozbieżności w wynikach lub rozbieżność była mniejsza niż 5% dla takich parametrów jak liczba erytrocytów obecna w mikrolitrze krwi (2,94%), hemoglobina (3,9%), hematokryt (2,42%), MCV (0,24%), MCH (1,08%), MCHC (1,18%), RDW (3,24%), MPV (1%), PDW (4,13%). Podsumowanie analizy morfologii krwi myszy Spna2R1098Q przedstawiono na ryc. 25.

Mutacja prowadzi w sposób istotny do spadku liczby leukocytów i limfocytów oraz wzrostu PCT, a także powoduje nieistotnie statystycznie podwyższenie poziomu płytek krwi.





Ryc. 25. Graficzna interpretacja parametrów morfologicznych krwi.

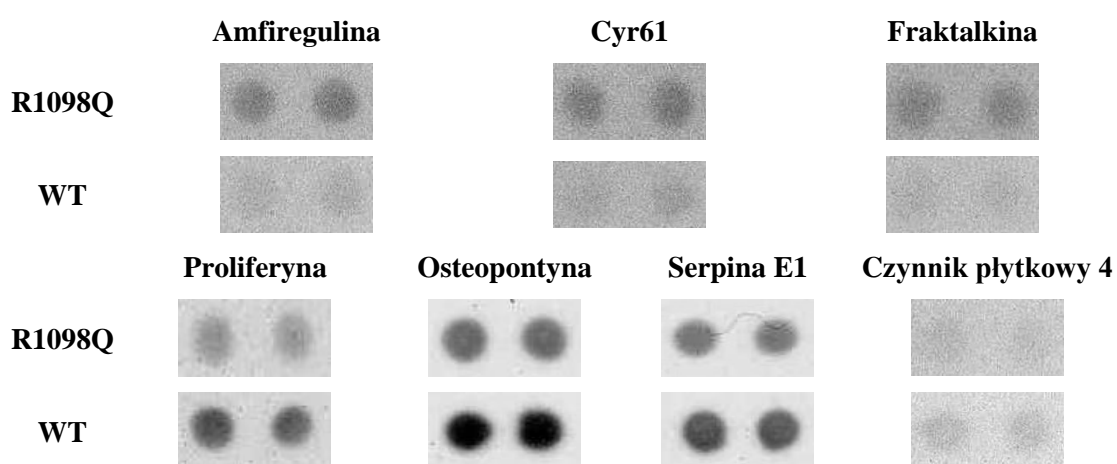
Przebadano próbki krwi 19 myszy *Spna2R1098Q* (R1098Q) oraz 19 myszy dzikich (WT). Jedynie dla parametrów oznaczonych kratką (#) tj. RDW, płytek krwi, MPV, PDW, PCT oznaczenie wykonano dla 10 myszy (R1098Q) oraz 10 myszy WT. Słupki przedstawiają średnie wartości parametrów krwi uzyskane przez daną grupę mysz. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Analiza statystyczna została wykonana testem *t*-Studenta, *t*-Studenta z wykorzystaniem korekcji Welch'a lub Mann'a-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.9. Oznaczenie poziomu białek biorących udział w tworzeniu naczyń krwionośnych u myszy R1098Q.

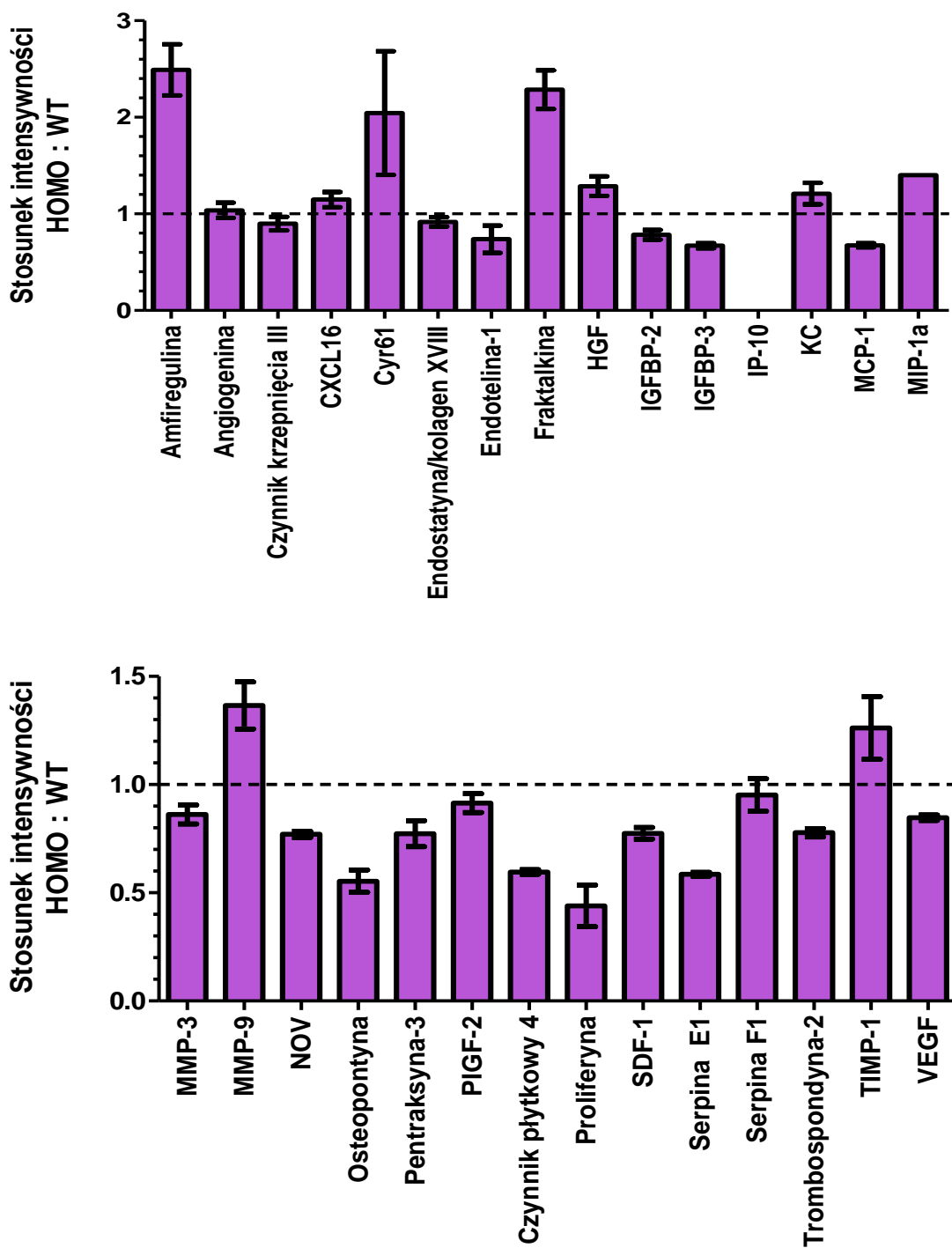
W celu sprawdzenia wpływu mutacji na sekrecję białek biorących udział w procesie tworzenia naczyń krwionośnych ze względu na obserwowane wady homozygotycznych embrionów zastosowano komercyjną membranę opartą na macierzach przeciwciał i wykorzystano medium znad hodowli pierwotnych mysich fibroblastów płodowych.

Interpretacja intensywności par punktów reprezentujących białka związane z procesem angiogenezy pomiędzy medium z nad fibroblastów myszy R1098Q homozygotycznych, a dzikich (ryc. 26), pozwoliła na wyliczenie względnych stosunków w zawartości (sekrecji) poszczególnych białek, przedstawionych na rycinie 27. Na podstawie otrzymanych w ten sposób wyników, można stwierdzić, iż poziom takich białek jak amfiregulina (AR; 2,49), Cyr61 (CCN1, IGFBP-10; 2,04), fraktalkina (CX3CL1; 2,28) uległ ponad dwukrotnemu zwiększeniu w medium pozyskanym od homozygotycznych fibroblastów, tym samym wydzielają go dwa razy więcej niż kontrolne komórki. Również homozygotyczne fibroblasty wydzielają więcej o około 29% HGF (Hepatopietiny A), 20% KC (CXCL1, CINC-1, GRO α), 40% MIP-1 α (CCL3), 37% MMP-9, 26% TIMP-1. Z obserwacji wynika, iż kontrolne fibroblasty wydzielały 2,28 razy więcej proliferyny, zaś ponad 1,5-krotne podwyższenie sekrecji stwierdzono w przypadku takich czynników jak osteopontyna (OPN; 1,8) serpiny E1 (PAI-1; 1,7) i czynnika płytkowego 4 (CXCL4, PF4; 1,68). Ponadto otrzymane dane sugerują, iż dzikie fibroblasty wydzielają więcej o blisko 49% IGFBP-3, 48% MCP-1 (CCL2/VE), 36% endoteliny-1 (ET-1), 30% NOV (CCN3, IGFBP-9), 29% pentraksyny-3 (PTX3, TSG-14), 29% SDF-1 (CXCL12), 29% trombospondyny-2 (TSP-2), 28% IGFBP-2 oraz 18% VEGF (VPF). Można przyjąć, iż pozostałe czynniki zaangażowane w angiogenezę jak CXCL16 (15%), angiogenina (4%), serpina F1 (5%), endostatyna/kolagen XVIII (9%), PIGF-2 (9%), czynnik krzepnięcia III (11%) a także MMP-3 (16%) występowały na podobnym poziomie, gdzie różnica wyniosła maksymalnie 16%.

Mutacja powoduje podwyższenie sekrecji białek proangiogennych jak: amfiregulina, Cyr61, fraktalkina oraz obniżenie wydzielania takich białek jak: proliferyna, osteopontyna, serpina E1 i czynnik płytkowy 4.



Ryc. 26. Western blotting reaktywności przeciwciał przeciwko czynnikom proangiogennym obecnym w medium z nad hodowli fibroblastów myszy heterozygotycznych Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).



Ryc. 27. Względy stosunek poziomu proangiogennych białek obecnych w pochodowlanym medium znad hodowli fibroblastów myszy R1098Q homozygotycznych (HOMO) i dzikich (WT).

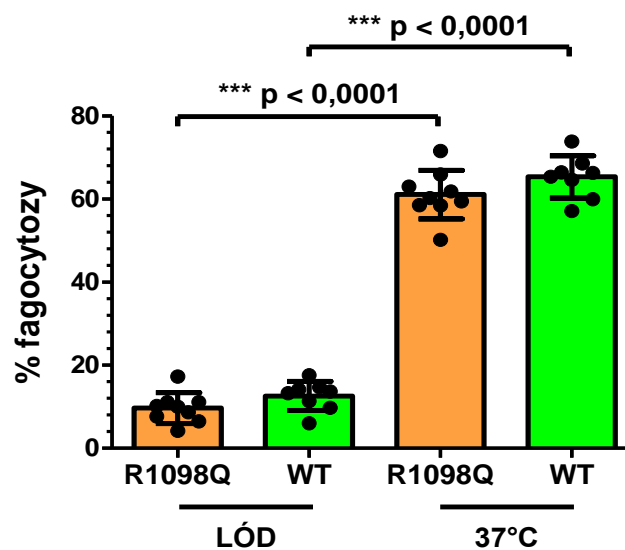
Do badania wykorzystano medium znad 3 linii fibroblastów płodowych HOMO i 3 linii fibroblastów płodowych WT. Pomiar densytometryczny każdego z białek został znormalizowany względem średniego sygnału z punktów referencyjnych obecnych na membranach. Słupki przedstawiają średnią gęstość optyczną sygnałów. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe z trzech ekspozycji czasowych membran.

3.10. Ocena zdolności leukocytów krwi i makrofagów otrzewnowych do fagocytozy.

W celu zbadania efektu mutacji α -II spektryny R1098Q na proces fagocytozy przeanalizowano pochłanianie cząstek przez leukocyty krwi obwodowej.

Z analizy danych z cytometrii przepływowej można przypuszczać, iż nie ma znaczących różnic w procesie fagocytozy przeprowadzonym przez leukocyty obwodowe krwi pomiędzy myszami Spna2R1098Q a dzikimi (ryc.28). Zdolność do fagocytozy w temperaturze 37°C wykazało blisko 61% leukocytów myszy Spna2R1098Q oraz nieco ponad 65% leukocytów myszy dzikich, zaś w warunkach inhibicji, czyli na lodzie z dodatkiem azydku, proces fagocytozy odnotowano na poziomie 9,5% leukocytów myszy Spna2R1098Q, natomiast dla myszy dzikich wyniósł 12,5%.

Mutacja Spna2R1098Q nie oddziałuje na proces fagocytozy przeprowadzany przez leukocyty obwodowe krwi.

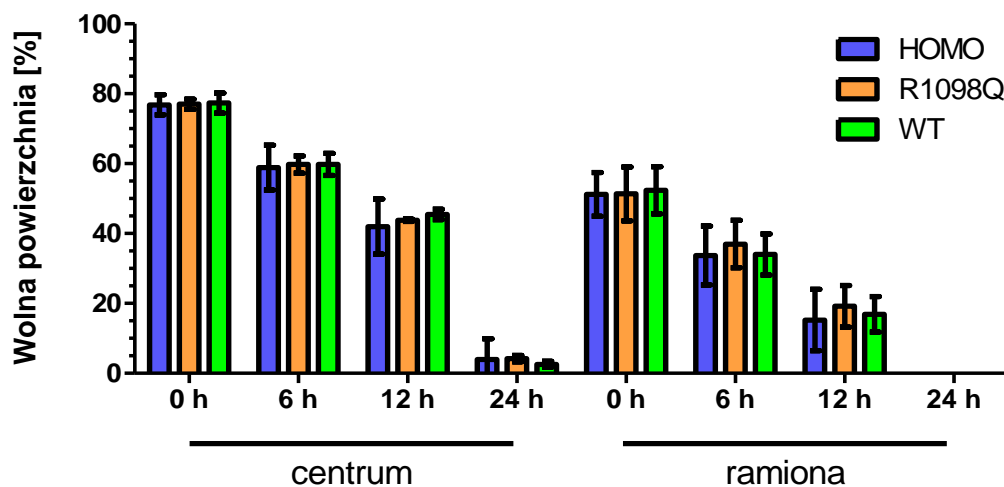


Ryc. 28. Zdolność do fagocytozy leukocytów krwi obwodowej myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz dzikich (WT).

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach inhibicji na lodzie oraz w temperaturze 37°C. W eksperymencie wykorzystano krew 9 myszy Spna2R1098Q oraz 8 myszy dzikich. Słupki przedstawiają średnią wartość dla grupy. Kropkami (●) zaznaczono poszczególne wyniki. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Analizę statystyczną przeprowadzono używając testu t-Student'a. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.11. Ocena wpływu mutacji R1098Q na tempo migracji fibroblastów płodowych.

W celu oceny wpływu mutacji R1098Q na tempo migracji przeprowadzono test migracji i zarastania rysy z udziałem pierwotnych hodowli fibroblastów płodowych. Dwustronna ANOVA nie wykazała różnic i zależności w migracji oraz zarastaniu rysy od genotypu i czasu pomiędzy pierwotnymi hodowlami fibroblastów płodowych wszystkich trzech genotypów, tym samym genotyp i czas nie miały wpływu na stopień migracji i zarastania rysy, gdyż nie zaobserwowano różnic w powierzchni wolnej i zarośniętej przez fibroblasty pozyskane od homozygotycznych, heterozygotycznych i dzikich embrionów w poszczególnych wybranych punktach czasowych. Dowodzi to, iż mutacja Spna2R1098Q nie wpływa na migrację i zarastanie rysy przez fibroblasty homozygotyczne i heterozygotyczne oraz osiągały one takie same postępy jak fibroblasty embrionów dzikich. Również jednostronna ANOVA nie wykazała wpływu mutacji na tempo migracji i zarastania rysy w obrębie poszczególnych punktów czasowych, jednocześnie wskazując na brak różnic między genotypami. Postępy w migracji i zarastaniu rysy w poszczególnych wybranych punktach czasowych ukazano na ryc. 29.



Ryc. 29. Tempo migracji i zarastania powierzchni przez fibroblasty płodowe.

Porównanie migracji i zarastania powierzchni przez fibroblasty wykonano dla czterech punktów czasowych – po 0, 6, 12 i 24 godzinach. Czas zerowy (0 h) oznacza zdjęcie wykonane zaraz po wyjęciu insertów. Eksperyment przeprowadzono z udziałem 3 linii fibroblastów płodowych homozygotycznych (HOMO), 3 linii fibroblastów płodowych heterozygotycznych (R1098Q) oraz 3 linii fibroblastów płodowych dzikich (WT). Dla centralnej części obszaru obserwacji dokonywano jednego pomiaru w każdym punkcie czasowym dla każdej linii. Dla zewnętrznych obszarów obserwacji (ramion) dokonywano czterech pomiarów dla każdej linii. Słupki

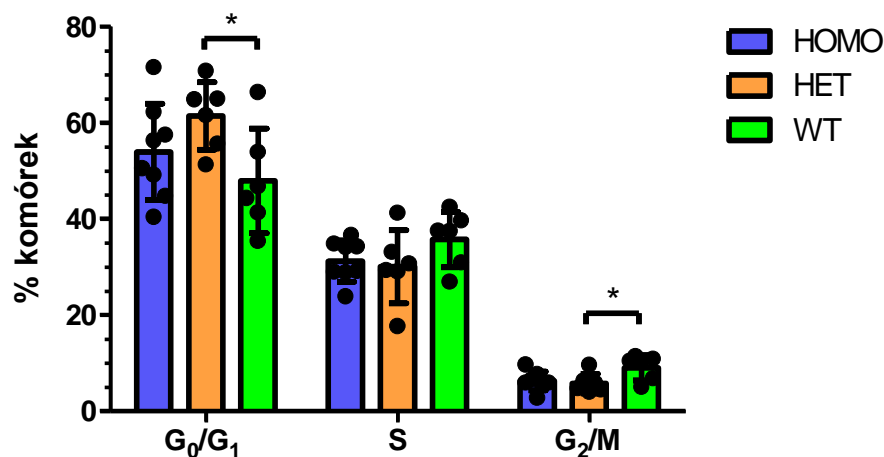
przedstawiają wartość średnią dla danego genotypu. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe.

3.12. Ocena wpływu mutacji R1098Q na cykl komórkowy.

W celu oceny wpływu mutacji R1098Q na cykl komórkowy przeprowadzono analizę cytometryczną pierwotnych homozygotycznych, heterozygotycznych i kontrolnych fibroblastów płodowych myszy Spna2R1098Q w obecności Rnazy i jodku propidyny.

W fazie G₂/M występuje o 3% więcej fibroblastów dzikich niż heterozygotycznych (* p = 0,0260 n₁ = 6, n₂ = 6, U = 4), co zademonstrowano na ryc. 30. Z kolei w fazie G₀/G₁ występuje o 13% mniej fibroblastów dzikich niż heterozygotycznych (* p = 0,0287). W przypadku próbek fibroblastów homozygotycznych w fazie G₀/G₁ znajdowało się przeciętnie 54% ± 10% komórek, w fazie S – 31% ± 4%, G₂/M – 6,4% ± 2%. W preparatach fibroblastów heterozygotycznych w poszczególnych fazach występowało średnio: G₀/G₁ – 61,5% ± 7% , S – 30% ± 7,5%, G₂/M – 5,8% ± 2%, zaś w preparatach z fibroblastami dzikimi rozkład w poszczególnych fazach wyglądał następująco: G₀/G₁ – 48% ± 11%, S – 36% ± 6%, G₂/M – 9,1% ± 2,6%. Można zauważyć, iż dzikie fibroblasty wykazują przesunięcie (mają tendencję) w kierunku fazy S i G₂/M oraz jest ich odpowiednio o blisko 6% i 3% więcej w tych fazach w porównaniu do fibroblastów homozygotycznych i heterozygotycznych. Podczas gdy zarówno fibroblasty homozygotyczne i heterozygotyczne występują w podobnych odsetkach w fazie S i G₂/M, na które przypada odpowiednio około 30% i 6% populacji.

Mutacja zmniejsza w sposób istotny odsetek komórek osiągających fazę G₂/M oraz promuje pozostawanie w fazie G₀/G₁.



Ryc. 30. Analiza cyklu komórkowego fibroblastów płodowych pozyskanych z homozygotycznych (HOMO), heterozygotycznych (HET) i dzikich (WT) zarodków Spna2R1098Q.

W sumie wykorzystano 6 linii fibroblastów dzikich, 6 linii heterozygotycznych i 8 linii homozygotycznych. Słupki przedstawiają średni odsetek komórek. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Kropkami (●) oznaczono odsetek komórek w danej fazie dla każdej z linii fibroblastów. Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując test t-Student'a i Mann'a-Whitney'a. Statystycznie istotne różnice zaznaczono gwiazdkami ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).*

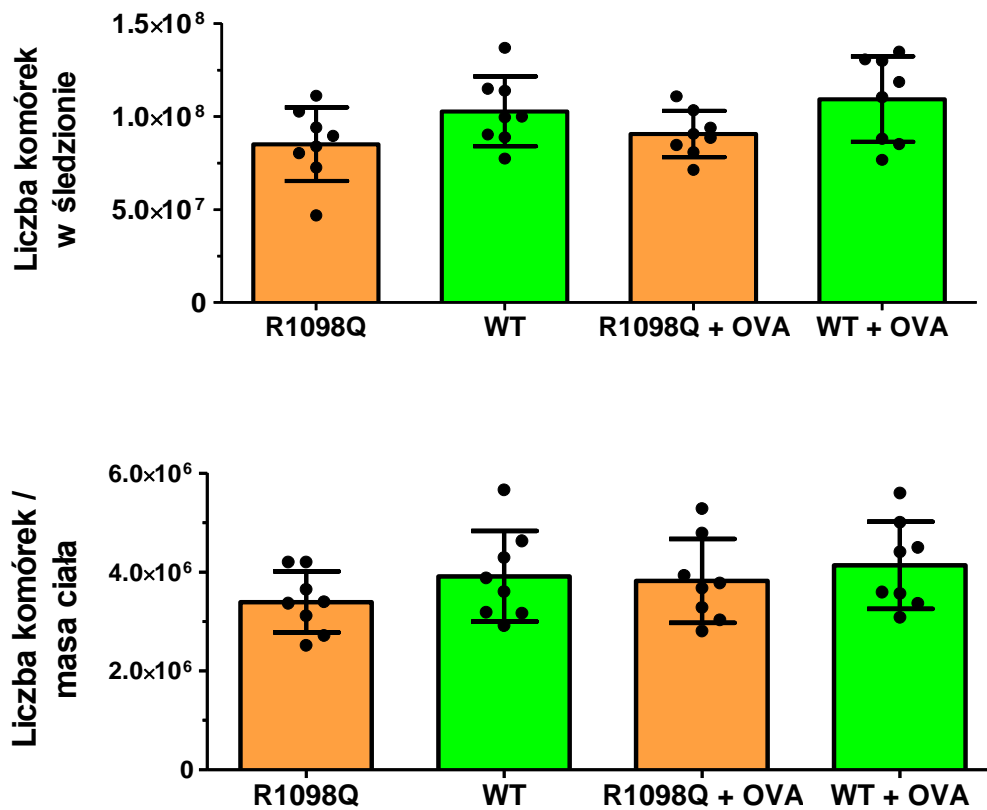
3.13. Ocena odpowiedzi immunologicznej myszy Spna2R1098Q na immunizację owoalbuminą (OVA).

Ze względu na zaobserwowane i potwierdzone wynikami morfometrycznymi różnice w masie śledzion i stosunku masy śledziony do masy ciała u myszy Spna2R1098Q względem myszy dzikich, postanowiono przetestować funkcjonowanie układu odpornościowego. W tym celu myszy Spna2R1098Q oraz dzikie stymulowano peptydem OVA, a następnie porównywano poziomy swoistych wobec OVA przeciwciał oraz odsetki swoicie pobudzonych limfocytów T między zaszczepionymi myszami. Stopień pobudzenia układu odpornościowego oceniono poprzez przesłedzenie poziomu proliferacji, określenie poziomu przeciwciał anti-OVA w surowicy i zdolności limfocytów T do produkcji INF-y oraz zbadać wpływ mutacji na zdolności do procesowania i przetwarzania antygeny przez układ odpornościowy.

3.13.1. Oznaczenie komórkowości śledzion.

Nie wykazano różnic w komórkowości śledzion i liczbie komórek śledziony przypadających na jednostkę masy ciała pomiędzy myszami Spna2R1098Q oraz dzikimi zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej, która otrzymywała owoalbuminę (OVA), co przedstawiono na ryc. 31. U myszy Spna2R1098Q i dzikich podanie OVA spowodowało podobny 6-7% wzrost komórkowości śledzion. Komórkowość śledzion myszy Spna2R1098Q była o około 17% mniejsza w porównaniu do myszy dzikich zarówno w grupie kontrolnej oraz badanej. Stymulacja OVA spowodowała zwiększenie o 12,6% i 7,3% liczby komórek śledziony przypadających na masę ciała odpowiednio dla myszy Spna2R1098Q oraz dzikich w porównaniu do kontroli. Różnica pomiędzy myszami Spna2R1098Q a dzikimi w liczbie komórek przypadających na jednostkę masy ciała wyniosła 12% w grupie kontrolnej i prawie 8% w grupie badanej. Podsumowując myszy Spna2R1098Q mają mniejszą liczbę komórek śledziony, ale ich układ

odpornościowy zostaje pobudzony przez stymulację OVA równie dobrze jak myszy dzikich i różnica między nimi utrzymuje się na podobnym poziomie przed jak i po iniekcji OVA.



Ryc. 31. Porównanie komórkowości śledzion oraz liczby komórek śledziony przypadających na jednostkę masy ciała pomiędzy myszami Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikimi (WT) w grupie niestymulowanej i stymulowanej owoalbuminą (OVA)

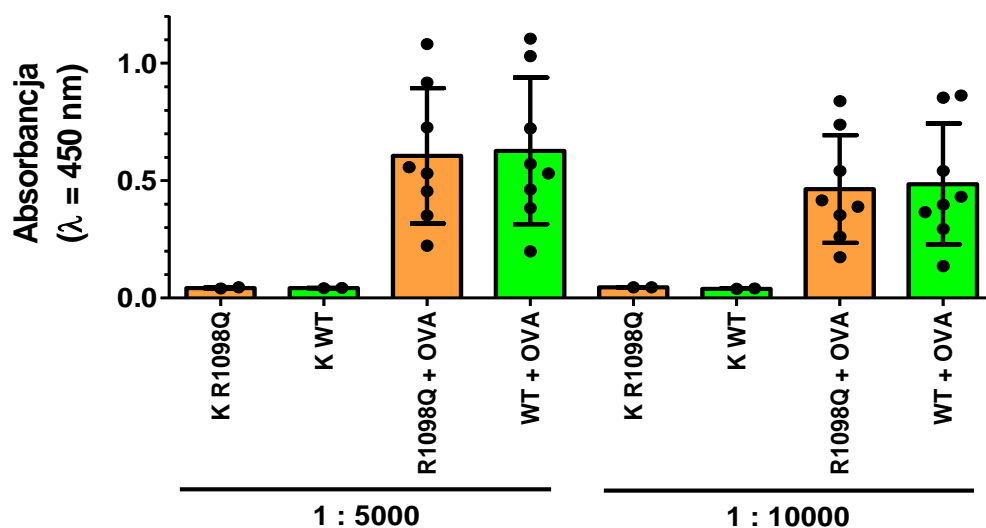
Doświadczenie wykonano na 8 śledzionach myszy Spna2R1098Q i 8 śledzionach myszy dzikich. Słupki przedstawiają średnie wartości. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Kropkami (●) zaznaczono pomiar uzyskany dla poszczególnych śledzion myszy.

3.13.2. Ocena odpowiedzi humoralnej myszy R1098Q po immunizacji białkiem OVA

Dalszym krokiem było porównanie odpowiedzi humoralnej poprzez wykorzystanie metody ELISA i surowicy myszy Spna2R1098Q oraz dzikich immunizowanych i nieszczepionych, w celu określenia poziomu przeciwciał anti-OVA, a co za tym idzie zdolności do procesowania i przetwarzania antygeny przez układ immunologiczny.

Nie wykazano różnic w odpowiedzi humoralnej pomiędzy myszami Spna2R1098Q i dzikimi, których układ immunologiczny był stymulowany poprzez immunizację owoalbuminą (ryc. 32). Poziom absorbancji (reaktywności przeciwciał w) surowicy myszy Spna2R1098Q + OVA w teście ELISA był niższy od poziomu absorbancji (reaktywności przeciwciał) surowicy myszy dzikich, którym podano OVA o 3,23% oraz 4,35% odpowiednio dla rozcieńczenia 1:5000 i 1:10000.

Otrzymany rezultat badań potwierdza uzyskany wcześniej wyniki przy badaniu komórkowości śledziony i jednocześnie pozwala stwierdzić biorąc pod uwagę oba wyniki, że układ odpornościowy myszy Spna2R1098Q reaguje podobnie na symulację OVA jak myszy dzikich oraz że nie ma różnic pomiędzy nimi w odpowiedzi swoistej i humoralnej na zbadanym do tej pory poziomie, pomimo zaobserwowanej i potwierdzonej różnicy w wadze śledzion.



Ryc. 32. Reaktywność surowicy krwi myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz dzikich (WT) immunizowanych owoalbuminą (OVA) oraz kontrolnych (K) nieimmunizowanych.

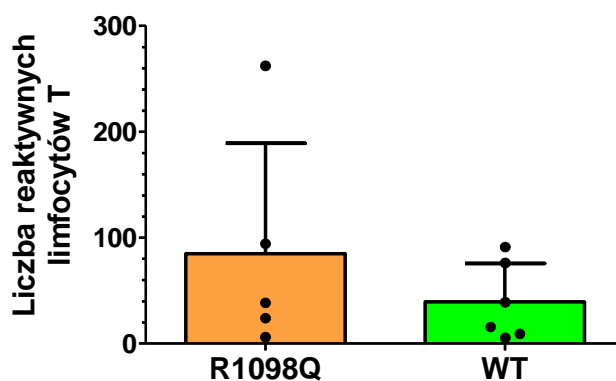
Badanie przeprowadzono na surowicy 20 myszy, w tym 8 myszy Spna2R1098Q i 8 myszy dzikich otrzymało owoalbuminę, zaś kontrolę stanowiły po 2 myszy z obu genotypów. Płytkę została opłaszczona antygenem (owoalbuminą). Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm. Do oceny zastosowano dwa rozcieńczenia surowicy 1:5000 i 1:10000. Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Kropkami (●) zaznaczono reaktywność surowicy poszczególnych myszy.

3.13.3. Ocena odpowiedzi komórkowej Th1 myszy R1098Q po immunizacji białkiem OVA.

Po sprawdzeniu odpowiedzi humoralnej postanowiono się przyjrzeć bliżej odpowiedzi komórkowej związanej z limfocytami T, a dokładniej porównać liczbę limfocytów T zdolnych do produkcji i wyrzutu cytokin, w tym przypadku INF- γ na powtórna stymulację OVA przy użyciu metody ELISPOT. Immunizacja myszy dojrzałych (3-miesięcznych) owoalbuminą miała na celu pobudzenie limfocytów T wobec podanego antygeny, co umożliwiło prześledzenie poziomu produkowanych przez nie cytokin oraz zbadanie zdolności do procesowania i przetwarzania antygeny.

Dokonując interpretacji wyników można stwierdzić, iż odpowiedź komórkowa myszy Spna2R1098Q jest zbliżona do odpowiedzi limfocytów T myszy dzikich i nie ma między nimi różnic, co przedstawiono na ryc. 33.

Podsumowując brak różnic w odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej, a także podobny wzrost komórkowości śledziony po immunizacji owoalbuminą wskazuje, iż mutacja nie zaburza odpowiedzi układu immunologicznego myszy Spna2R1098Q, który po stymulacji owoalbuminą zostaje pobudzony w taki sam sposób jak myszy dzikich, co świadczy o poprawnym procesowaniu i przetwarzaniu antygeny przez układ odpornościowy.



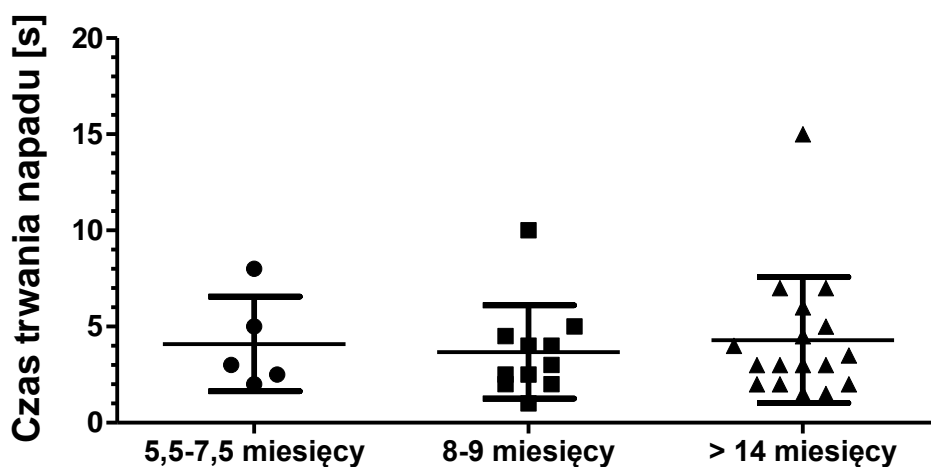
Ryc. 33. Porównanie liczby reaktywnych limfocytów T produkujących INF- γ na powtórna stymulację owoalbuminą.

Do eksperymentu wykorzystano komórki śledziony pozyskane od 5 myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz 5 myszy dzikich (WT). Słupki przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Kropkami (●) zaznaczono liczbę reaktywnych limfocytów w poszczególnych próbkach.

3.14. Ocena częstotliwości występowania i czasu trwania napadów padaczkowych.

Ze względu na obserwowane ataki drgawkowo-napadowe podczas podnoszenia i obracania myszy w trakcie rutynowej opieki lub upadku z urządzenia wykorzystanego w teście obracającego się wałka, przeprowadzono ocenę częstotliwości występowania i czasu trwania ręcznie wywołanych napadów.

Analiza otrzymanych danych wskazuje, iż ogólnie czas trwania napadów padaczkowych u myszy Spna2R1098Q niezależnie od wieku wynosi średnio około 4 sekund, przy czym najdłuższy zanotowany napad padaczkowy trwał 15 sekund, zaś najkrótszy 1,5 sekundy, co przedstawiono na ryc. 34 i w tabeli 14. Napady padaczkowe wystąpiły u 33 z 43 myszy Spna2R1098Q podczas pojedynczej próby, co świadczy, iż częstotliwość wywołania napadów wynosi około 75%. Należy zaznaczyć, iż u pozostałych 10 myszy również występują napady padaczkowe, ale nie zostały wywołane w trakcie przeprowadzania próby. Czas trwania napadów padaczkowych w grupie myszy Spna2R1098Q w wieku 5,5-7,5 miesięcy wyniósł $4,1 \pm 2,46$ s. Najkrótszy napad padaczkowy w tej grupie wiekowej trwał 2 sekundy, zaś najdłuższy 8 sekund, a częstotliwość wywołania napadów padaczkowych dla tej grupy oszacowana na 71,43% (5 z 7 myszy). U myszy Spna2R1098Q w wieku 8-9 miesięcy czas trwania napadów padaczkowych wyniósł $3,68 \pm 2,42$ s (najdłuższy – 10 sekund, najkrótszy – 1 sekundę), a częstotliwość wywołania napadów padaczkowych wyniosła 78,57%. W grupie myszy Spna2R1098Q w wieku powyżej 14 miesięcy napady padaczkowe trwały średnio $4,29 \pm 3,27$ s (najdłuższy – 15 sekund, najkrótszy – 1,5 sekundy), natomiast częstotliwość wywołania napadów padaczkowych wynosi 77,27%.



Ryc. 34. Czas trwania napadów padaczkowych u myszy Spna2R1098Q.

Analizę ręcznie wywołanych napadów przeprowadzono na 43 myszach podzielonych na trzy grupy wiekowe. Grupę wiekową 5,5-7,5 miesięcy stanowiło 7 myszy Spna2R1098Q, grupę

wiekową 8-9 miesięcy stanowiło 14 myszy Spna2R1098Q, a w grupie wiekowej powyżej 14 miesięcy znalazły się 22 myszy Spna2R1098Q. Wyniki zebrano podczas jednej próby dla każdej myszy. Kreski (—) przedstawiają średnią z pomiarów dla grupy. Kropkami, kwadratami i trójkątami (●, ■, ▲) zaznaczono czas trwania napadu dla każdej myszy. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe.

Tabela 14. Czas trwania i częstotliwość napadów padaczkowych u myszy Spna2R1098Q.

Grupa wiekowa	Średnia czasu trwania napadu	Min – max trwania napadu	Częstotliwość
5,5 – 7,5 miesięcy	4,1 ± 2,46 sekundy	2 – 8 sekund	71,43 %
8 – 9 miesięcy	3,68 ± 2,42 sekundy	1 – 10 sekund	78,57 %
> 14 miesięcy	4,29 ± 3,27 sekundy	1,5 – 15 sekund	77,27 %

4. Dyskusja.

Głównymi założeniami pracy doktorskiej były opis i ocena fenotypowa myszy niosących mutację genu spektryny nieerytrocytarnej (Spna2R1098Q) jako zwierzęcego modelu badawczego dla zespołu spektrynozależnych ataksji mózdkowych (spektrynopatii neuronalnych), diagnozowanych u pacjentów jako zespół West'a, wczesne niemowlęce encefalopatie padaczkowe, ciężkie rozwojowe encefalopatie padaczkowe, spazmy niemowlęce, dziedziczne neuropatie ruchowe, dziedziczne paraplegie spastyczne lub dziedziczne ataksje, a w przypadku wystąpienia mikrodelecji obejmującej gen α -II spektryny rozpoznano dodatkowo występowanie zespołu Ohtahara'y i wczesnej encefalopatii mioklonicznej (Syrbe i in. 2017; Wang i in. 2018; Saitu i in. 2010; Tohyama i in. 2015; Writzl i in. 2012; Morsy i in. 2023; Morrison-Levy i in. 2020; Campbell i in. 2012; Mastrangelo i Leuzzi 2012; Matsumoto i in. 2014; Nicita i in. 2015; Aravindhhan i in. 2018).

W literaturze opublikowano i opisano do tej pory około 47 pacjentów z prawdopodobnymi patogennymi i patogennymi wariantami w *SPTANI*, pomijając przypadki mikrodelecji w regionie 9q33.3–q34.11 lub wyłącznym zaangażowaniem obwodowego układu nerwowego (Marco Hernández i in. 2022). Zdecydowana większość zidentyfikowanych mutacji *SPTANI* jest mutacjami typu de novo oraz są to mutacje typu zmiany sensu (23 warianty), delecji (8 wariantów), duplikacji (5 wariantów), nonsensowne (1 wariant) lub mikrodelecje. Początkowo zdecydowana większość diagnozowanych mutacji była zlokalizowana w regionie C-końcowym i związanych z 16-20 powtórzeniem spektrynowym, a jeszcze ściślej duża część mutacji przypadała na 19 i 20 powtórzenie odpowiedzialne za heterodimeryzację α/β spektryn, ponieważ mutacje te były w ogromnej większości odpowiedzialne za cięższy stan łatwiejszy do zaobserwowania (Syrbe i in. 2017; Tohyama i in. 2015). Tymczasem wiele z łagodnych przypadków miało mutacje *SPTANI* umiejscowione daleko od regionu C-końcowego w przeważającej większości prowadziły do łagodnych form choroby (Rapaccini i in. 2018). Wyszuto trzy hipotezy takiego stanu (Tohyama i in. 2015). Według pierwszego założenia była to zwykła losowość. Druga teoria wskazywała, iż różne typy mutacji lub w odmiennym regionie mogą prowadzić do niejednakowych fenotypów lub ich braku. Zaś trzecia hipoteza zakładała, iż mutacje w N-końcowym regionie w sposób krytyczny wpływa na funkcję spektryny i wywołuje efekt letalny. Ostatnio, w wyniku rozwoju metod przesiewowych zaczęto diagnozować więcej pacjentów z mutacjami zlokalizowanymi poza regionem C-końcowym, którzy prezentowali łagodniejsze objawy chorobowe, co znacznie rozszerzyło obraz i spektrum spektrynopatii zależnych od α -II spektryny (Morsy i in. 2023). Sugeruje się, iż owych przypadków może być znacznie więcej, lecz brak rozpoznania jest wynikiem braku wiedzy na temat schorzenia i dostępu

do szybkich, łatwych i tanich metod pozwalających wykryć mutacje u niezdiagnozowanych pacjentów o nietypowych objawach dla mutacji *SPTANI*. Asymetryczny rozkład pod względem liczby zgłoszonych wariantów może być spowodowany gorącym punktem mutacji w domenach 19 i 20, ale prawdopodobnie wynika również z faktu, że pacjenci z łagodniejszymi fenotypami są rzadziej diagnozowani lub ich przypadki nie są publikowane. Oprócz wpływu lokalizacji mutacji na fenotyp istotny wpływ ma również rodzaj mutacji. Delecje mają łagodniejszy fenotyp niż duplikacje występujące w tym samym miejscu. W wyniku czego mutacje w obszarze genu *SPTANI* obejmują szerokie spektrum zaburzeń neurorozwojowych od łagodnych po ciężkie lub postępujące. Toteż modele zwierzęce niosące różne typy mutacji *SPTANI* mogą dostarczyć dalszych dowodów na to, w jaki sposób poszczególne mutacje upośledzają funkcje spektryny lub też nie. Znajomość profili klinicznych i cech MRI w encefalopatii *SPTANI* pomoże klinicyście przeprowadzać skuteczne testy genetyczne i identyfikować mutacje *SPTANI*. Potrzebne jest zidentyfikowanie i scharakteryzowanie większej ilości osób z mutacją w genie *SPTANI* by określić, które z obserwowanych symptomów należą do spektrum fenotypowego mutacji *SPTANI* i wynikają z niepełnej penetracji bądź zmiennego przejawu efektów mutacji albo są zbiegiem okoliczności. Identyfikacja mutacji w obrębie *SPTANI* u pacjentów z HA i HSP potwierdza, że mutacje *SPTANI* prowadzą do szerokiego spektrum fenotypowym (**Morsy i in. 2023**). Zaburzenia mogą być zatem wypadkową wynikającą bezpośrednio ze zmian spowodowanych w α -II spektrynie i pośrednio przez wywołanie zaburzeń w β -II i β -III spektrynie. Podsumowując stopień zaburzeń neurologicznych i napadów padaczkowych koreluje z rodzajem oraz lokalizacją mutacji, a także nieprawidłowościami strukturalnymi.

Dowodzono, iż poza kanoniczną rolą cytoszkieletu spektryna jest również zaangażowana w szereg innych procesów, funkcji i ról takich jak: stabilizacja, organizacja i wsparcie białek oraz kanałów błonowych, morfologia i kształt komórek, transport wewnątrzkomórkowy, przekazywanie sygnałów, fagocytoza, angiogeneza, regulacja cyklu komórkowego, kształtowanie odpowiedzi immunologicznej, synaptogenezie czy też mielinizacji.

W przypadku zwierzęcego modelu napadów niemowlęcych należy rozważyć szereg warunków, które można zgrupować w 6 kryteriów: wiek, charakter spazmów i napadów, cechy EEG, zaburzenie rozwoju, odpowiedź na leczenie i etiologia (**Stafstrom, Holmes 2002; Marsh, Golden 2009; Cortez i in. 2009**). Porównując obraz kliniczny i spektrum fenotypowe pacjentów z mutacjami w α -II spektrynie z mającym go naśladować modelem zwierzęcym, należałoby rozpatrzyć następujące cechy/symptomy pogrupowane w 7 kategorii (które w dużej części pokrywają się z kryteriami dla modelu IS): stan upośledzenia neurorozwojowego, umysłowego, rozwojowego lub poznawczego, cechy obrazu EEG, charakter napadów i skurczów, cechy obrazu

rezonansu magnetycznego, stopień zaburzeń motorycznych, stopień zaburzeń komunikacyjnych (wzrokowy, słuch, wydawanie dźwięków) oraz indywidualne objawy.

Zburzenie rozwoju, stan upośledzenia zdolności poznawczych oraz stopień zaburzeń motorycznych modelu myszy Spna2R1098Q.

Jednym z głównych objawów prezentowanych przez pacjentów są zaburzenia neurorozwojowe, umysłowe, intelektualne lub poznawcze o różnym stopniu nasilenia od łagodnego przez umiarkowane do ciężkich i głębokich, które są najczęściej obserwowane. Obok zaburzeń intelektualnych u pacjentów w równym stopniu obserwuje się opóźnienie w rozwoju. Na podstawie przeprowadzonych badań, których wyniki zamieszczono w pracy doktorskiej stwierdzono, iż myszy Spna2R1098Q nie wykazały znacząco zwiększonego zainteresowania nowym przedmiotem w teście rozpoznawania nowych obiektów (ryc. 22 i tab. 12), a w dodatku można zaobserwować progresję zaburzeń pamięciowych, co świadczy o pogorszeniu pamięci długotrwałej i zdolności poznawczych wśród myszy Spna2R1098Q, które dodatkowo ulegają osłabieniu z wiekiem. Myszy Spna2R1908Q posiadają dodatkowo zaburzenie pamięci krótkotrwałej, co wykazano w teście lokalizacji obiektu (ryc. 24). Można zatem przypuszczać, iż model posiada upośledzenie neurorozwojowe i/lub poznawcze oraz jest to pierwsza i jedna z wielu cech łączących model myszy Spna2R1098Q z obrazem klinicznym pacjentów, którą można w łatwy sposób ocenić oraz porównać podczas stosowania różnych nowych terapii przy pomocy wspomnianych łatwych testów pamięciowych. W pracy doktorskiej wykazano, iż myszy Spna2R1098Q mają zaburzone cechy morfometryczne takie jak: masa ciała (ryc. 8) i śledziony (ryc. 14), długość całkowita (ryc. 9), tułowia (ryc. 10) i ogona (ryc. 11), współczynnik masy ciała oraz indeks Lee (ryc. 12 i 13), co świadczy o opóźnieniu w rozwoju i koreluje z objawami pacjentów. Negatywny wpływ α -II spektryny na rozmiary myszy zaobserwowano także w modelu zaprezentowanym przez Stankewich'a. Do często powtarzających się objawów wśród pacjentów należą także zaburzenia motoryczne, które mogą mieć postać spastycznej kwadriplegii, ataksji, dyskinezy, paraplegii, dystonii, drżenia czynnościowego i spoczynkowego, drobne niezborności ruchowe, niestabilność lub umiarkowana zdolność chodu. Innym często wspomnianym objawem jest brak kontroli pozycji i ruchów głowy, jak również brak umiejętności utrzymania postawy siedzącej. Charakterystyczny w bezpośredniej obserwacji dla opisanego w pracy doktorskiej modelu myszy Spna2R1098Q jest chwiejny chód, zaburzenie równowagi, drżenie czynnościowe i spoczynkowe oraz trudność w utrzymaniu kontroli nad głową i utrzymaniu głowy w bezruchu. Występowanie wspomnianych nieprawidłowości ruchowych zostało potwierdzone testami sprawności motorycznej i siły mięśniowej, w wyniku których stwierdzono u myszy Spna2R1098Q progresję zaburzeń koordynacji ruchowej (ryc. 18, 19), osłabienie siły mięśniowej (ryc. 21), zmniejszenie długości stawianych kroków (ryc. 20),

skrócenie odległości między kolejnymi kontaktami tej samej łapy, poszerzenie rozstawu przednich łap oraz pogorszenie precyzji w dostawianiu łap. Zburzenie równowagi i koordynacji ruchowej jest kolejnym wspólnym elementem pomiędzy modelem myszy Spna2R1098Q a pacjentami. Zaprezentowany model spełnia zatem pierwszy z sześciu kryteriów dla modeli spazmów niemowlęcych jakim jest zaburzenie rozwoju, które może przybrać postać behawioralną, neurorozwojową, poznawczą, psychomotoryczną lub ruchową. Rozpatrując zaś pokrycie spektrum fenotypowego, model myszy Spna2R1098Q dość dobrze odzwierciedla dwa z sześciu zespołów objawów jakimi są zaburzenie motoryczne oraz rozwoju i funkcji poznawczych, występujące zarówno u pacjentów ze spazmami niemowlęcymi jak i opisywane u osób z dziedzicznymi neuropatiami ruchowymi.

Wiek występowania napadów w modelu myszy Spna2R1098Q.

Kolejnym ważnym kryterium w przypadku modelu spazmów niemowlęcych jest wiek pojawienia się napadów padaczkowych. Napady padaczkowe nie występują bezpośrednio u noworodków, lecz powinny rozwijać się w pierwszym roku życia, przy czym najczęściej pojawiają się między drugim a czwartym miesiącem oraz powinny trwać przez całe życie. Okres występowania spazmów niemowlęcych pokrywa się z wiekiem, w jakim występują napady padaczkowe i drgawki u osób z mutacjami w α -II spektrynie. W zaprezentowanym modelu drgawki spoczynkowe i czynnościowe widoczne są już około 2 tygodnia życia, co jest odpowiednikiem trzeciego miesiąca życia u ludzi, a zatem również rozwijają się w ciągu pierwszego roku życia. Jest to kolejny aspekt łączący model myszy Spna2R1098Q z osobami z mutacją w α -II spektrynie. Tym samym model myszy Spna2R1098Q spełnia drugi ważny warunek wieku wystąpienia napadów lub drgawek zarówno dla modelu spazmów niemowlęcych jak i spektrynopatii neuronalnych

Charakter spazmów, napadów i drgawek w modelu myszy Spna2R1098Q.

Trzecim ważnym kryterium jest charakter spazmów, napadów i drgawek. W idealnym modelu dla spazmów niemowlęcych powinny one naśladować te występujące u pacjentów, a więc posiadać charakter spontaniczny i przewlekły, być zgrupowane w fazach przejściowych snu (zasypianie, przebudzenie) oraz odznaczać się właściwą częstotliwością i czasem trwania. Dużą zaletą modelu myszy Spna2R1098Q podobnie jak niewielu dostępnych genetycznych modeli zaproponowanych dla IS są samorzutne drgawki i napady padaczkowe, dzięki czemu góruje nad modelami nabytymi, gdyż w odróżnieniu od nich nie wymagają wywołania innymi czynnikami. Drugą ważną cechą napadów w modelu myszy Spna2R1098Q jest to, iż utrzymują się przez całe życie myszy, mają charakter nawracający, występują w każdym przypadku oraz nie

odnotowano ich samoistnego zaniku. Podczas gdy 25% pacjentów nie rozwija żadnego typu napadów, zaś u osób z HSP i HA o podłożu *SPTANI* tylko w 1/3 przypadków odnotowano występowanie napadów lub drgawek. Ale różnica ta wynika z tego, iż model reprezentuje tylko jeden wariant mutacji. Drżenie u myszy Spna2R1098Q obserwowane jest nieustannie, zaś napady padaczkowe mają różny czas trwania od sekundowych przez kilkusekundowe (ryc. 34, tabela 15) do nawet trwających prawie minutę (Zalas i in. 2023). Cechy wspólne napadów dla modelu myszy Spna2R1098Q a pacjentów to: obustronny toniczno-kloniczny charakter napadów, uogólniona padaczka, wygięcie i odchylenie głowy do tyłu przypominające opistotonus. W ten sposób model spełnia kolejne ważne kryterium. Bardzo ważnym aspektem, o którym należy wspomnieć jest to, iż przedstawiony w niniejszej pracy model myszy Spna2R1098Q jest jedynym dostępnym zwierzęcym modelem przejawiającym spektrum ze strony napadów lub skurczów bez wpływu na długość życia, co sprawia, że model ten jest unikalny. Poza tym tylko modele z delecją α -II spektryny w centralnym układzie nerwowym lub obwodowych neuronach czuciowych wykazywały drgawki bądź napady padaczkowe, osłabienie siły mięśniowej w teście zawieszenia, ale przeżywały maksymalnie miesiąc (Huang i in. 2017a; Huang i in. 2017b). Dzięki czemu model myszy Spna2R1098Q zyskuje przewagę pod kątem badania i testowania nowych terapii z możliwością długofalowej oceny ich działania. Jednocześnie model ten może otworzyć drogę i dostarczyć ciekawych wyników do lepszego poznania wpływu i zaangażowania α -II spektryny, produktów jej rozpadu, kalpainy, kaspazy, sygnalizacji wapniowej, proteaz aktywowanych wapniem, amyloidu β , VASP i PGE2 na procesy neurodegeneracyjne towarzyszące m. in. Chorobie Parkinson'a i Alzheimer'a.

Atroficzne zmiany w OUN myszy Spna2R1098Q.

Na podstawie obrazu klinicznego pacjentów z mutacją w α -II spektrynie charakterystyczne cechy obserwowane w obrazie rezonansu magnetycznego można uznać za istotne kryterium, chociaż nie jest ono wymieniane jako warunek dla modelu IS. U pacjentów obserwuje się atrofię i/lub hipoplazję mózgu, kory mózgowej, pnia mózgu, części mostowo-mózdkowej, mózdku bądź robaka, obecność cienkiego ciała modzelowatego, hipomielinizację mózgu, redukcję objętości istoty białej oraz mikrocefalię. W model myszy Spna2R1098Q dochodzi do głębokiej i postępującej atrofii mózgu i mózdku, nieprawidłowego fałdowania mózdku i zwojów kory mózgowej, zakłócenia szerokości warstw molekularnych z 50% ich utratą i problemem określenia granic warstw, zaburzenia organizacji i utraty neuronów w korze nowej i hipokampie, a dodatkowo u homozygot widoczne są wady twarzoczaszki (Miazek i in. 2021). Widać zatem, iż model myszy Spna2R1098Q kopiuje obraz kliniczny pacjentów. Za cechy wspólne zaobserwowane na podstawie obserwacji i obrazu rezonansu magnetycznego dla pacjentów oraz na podstawie obserwacji i badań histologicznych dla modelu myszy Spna2R1098Q można uznać:

atrofię struktur mózgowych obejmującą zwłaszcza mózdzek oraz redukcję istoty białej i kory nowej. Dzięki temu myszy Spna2R1098Q spełniają kolejne ważne kryterium na drodze do zostania modelem zwierzęcym.

Ocena występowania zaburzeń w obrazie EEG u myszy Spna2R1098Q.

Dalszym aspektem jaki należy rozważyć jest obraz EEG. Ze względu na różnice gatunkowe jak i różnice w budowie oraz rozwoju mózgu przeniesienie wszystkich cech ludzkich na modele zwierzęce jest trudne, a wręcz może być niemożliwe. Obecność charakterystycznego obrazu EEG nie jest jednak kryterium obowiązkowym, lecz uznawane za warunek dodatkowy. Dla części pacjentów z mutacją w α -II spektrynie można zaobserwować występowanie specyficznej hipsarytmii, która jednak nie zawsze występuje. Obraz EEG chorych ulega zmianom w zależności od rozwoju skurczów i napadów, dlatego może przyjmować postać zmniejszonej i spowolnionej aktywności tła bądź wieloogniskowych wyładowań zamiast hipsarytmii. Zdarzają się również pacjenci bez zmian w zapisie EEG. U myszy może nie występować hipsarytmia, którą obserwuje się u ludzi lub obraz EEG dla niej może się różnić. Stąd właśnie cechy zapisy EEG nie są kryterium obowiązkowym. W przypadku modelu myszy Spna2R1098Q ten aspekt pozostaje wciąż do zbadania.

Kryterium oporności napadów padaczkowych i drgawek na leczenie

Przedostatnim kryterium dla modeli IS jakie należy rozpatrzyć jest odpowiedź modelu na leczenie. W obecnym projekcie doktorskim, ze względu na ograniczenia metodologiczne i techniczne nie sprawdzono reakcji myszy Spna2R1098Q na działanie popularnych leków przeciwpadaczkowych stosowanych w IS

Etiologia spazmów niemowlęcych.

Aby lepiej zrozumieć mechanizmy odpowiedzialne za spektrum objawów chorobowych u pacjentów z mutacjami α -II spektryny, najkorzystniejszy byłby model zwierzęcy niosący identyczną mutację. Dzięki temu, w ramach medycyny spersonalizowanej, możliwe byłoby testowanie i opracowanie terapii „celowanych”. Model myszy Spna2R1098Q dobrze odtwarza etiologię dominujących (tj. ujawniających się u heterozygot) spektrynopatii neuronalnych, których podłożem molekularnym jest w zaburzenie stabilności powtórzeń spektrynowych..

Podsumowując model myszy Spna2R1098Q spełnia 4 z 6 kryteriów dla modeli IS, a pozostałe dwa wymagają dalszego zbadania Sprawdzenia wymaga zapis EEG u myszy oraz oporności

napadów na terapię popularnymi lekami przeciwpadaczkowymi (m. in. Hormon adrenokortykotropowy i wigabatryna). Z kolei biorąc pod uwagę spektrum objawów choroby u osób z mutacją w α -II spektrynie, w zaprezentowanym modelu myszy Spna2R1098Q do określenia pozostają zdolności komunikacyjne i interakcje społeczne, czyli kontakt wzrokowy, wspólne przebywanie w gnieździe, obwąchiwanie, wydawanie dźwięków oraz wrażliwość na bodźce dźwiękowe. Model ten jest bardzo interesujący ze względu na liczbę pozostałych kryteriów, które spełnia oraz ilość cech pokrywających się ze spektrum objawów opisanych u pacjentów cierpiących na neuropatii spektrynozależnej.

Poziom ekspresji α -II i β -III spektryny u heterozygotycznych myszy R1098Q.

Alfa spektryna jest niezbędna do wiązania beta spektryny oraz β spektryna ulega destabilizacji i degradacji, jeśli nie jest złożona z α spektryną (Morrow, Stankewich 2021; Wang i in. 2018). W liszaczach mózdkowych heterozygotycznych myszy Spna2R1098Q zaobserwowano niewielki 14% spadek poziomu białka α -II spektryny, natomiast różnica w poziomie białka β -III spektryny była 2-krotna (ryc. 15, 16). Tak znaczny ubytek β -III spektryny może świadczyć, iż mutacja prowadzi do osłabienia lub zaburzenia oddziaływań odpowiedzialnych za tworzenie stabilnych kompleksów α/β spektryny, które mogą prowadzić do powstawania cytotoksycznych agregatów bądź zmian konformacyjnych w podjednostce α -II spektryny, w wyniku czego β -III spektryna ulega degradacji na skutek większej dysocjacji lub mniejszej stabilności kompleksu (Wang i in. 2018; Morsy i in. 2023; Miazek i in. 2021; Skrzymowska i in. 2021). β -III spektryna jest obecna m. in. w komórkach Purkinje'go. Drugą przyczyną znacznego obniżenia zawartości β -III spektryny może być zaobserwowany w przypadku naszej mutacji 80% ubytek komórek Purkinjego, podczas gdy wzór ekspresji α -II i β -III spektryny zostaje zachowany (Miazek i in. 2021). W modelu myszy z nokautem β -III spektryny także zaobserwowano postępującą utratę komórek Purkinjego w mózdku (Lise i in. 2012). Stankewich i in. W mysim modelu nokautu α -II spektryny stwierdzili 80% obniżenie poziomu białek α -II, β -II i β -III spektryny (Stankewich i in. 2011). Huang i in. Zarówno w mysim modelu z delecją α -II spektryny w centralnym układzie nerwowym jak i w obwodowych neuronach czuciowych zaobserwowali zmniejszenie poziomu wszystkich β spektryn, poza tym ubytek komórek Purkinje'go (Huang i in. 2017a i b). Także Wang i in. Wykazali na embrionach szczura i myszy z delecją *SPTAN1* w neuronach obniżenie poziomu wszystkich β spektryn (Wang i in. 2018). Potwierdza to wcześniejsze doniesienia, iż utrata α -II spektryny prowadzi do wtórnej utraty większości β -II i β -III spektryn. Tym samym fenotyp myszy posiadających mutacje w α -II spektrynie może mieć znacznie szersze spektrum fenotypowe i prezentować objawy odnotowane u pacjentów lub w modelach zwierzęcych dla β -II i β -III spektryny.

Zmiany neurodegeneracyjne w obrębie OUN myszy R1098Q.

Białko kwaśne gleju (GFAP) jest markerem patologicznych stanów ośrodkowego układu nerwowego, zapalenia nerwów oraz reaktywnej astrogliozy (Sofroniew, Vinters 2010). Czterokrotna różnica poziomu białka GFAP u myszy Spna2R1098Q względem myszy dzikich (ryc. 15, 16) dodatkowo wskazuje na stany zapalne w obrębie mózgu myszy niosących mutację. W ciężkich przypadkach patobiologia może być związana z tworzącymi się cytotoksycznymi agregatami spektryny i zaburzonym procesem heterodimeryzacji spektryn α i β . Podczas gdy w łagodniejszych przypadkach za patofizjologię mogą odpowiadać zmiany w pobudliwości neuronalnej oraz mechanizmy inne niż agregacja, być może zwiększona podatność na cięcie (Syrbe i in. 2017).

Aktywność kalpajny w mózdkach, fibroblastach i surowicy myszy R1098Q.

W spektrynach występuje region CCC. Głównym celem ataku kalpajny jest α -II spektryna, która rozszczepia pojedyncze wiązanie peptydowe w α -II spektrynę między Tyr1176 i Gly1177 w obrębie 11. Powtórzenia spektrynowego, a więc w pobliżu miejsca mutacji R1098Q. Molekularne modelowania odkrytych do tej pory mutacji wśród pacjentów sugeruje, iż może dochodzić do zmian sterycznych ułatwiających lub utrudniających rozpad za pośrednictwem kalpajny lub kaspazy. W chorobach neurodegeneracyjnych oraz stanach neurotoksyczności i zapalnych, a także podczas przebudowy neuronów obserwuje się występowanie produktów rozpadu α -II spektryny na skutek aktywności kalpajny i kaspazy 3 (Syrbe i in. 2017; Morrow, Stankewich 2021; Schoch i in. 2012). W związku z tym produkty te są czułym wskaźnikiem wspomnianych procesów. Jak wykazaliśmy w innych badaniach, w przypadku mutacji R1098Q dochodzi do zmniejszenia powinowactwa (obniżenia stałej asocjacji oraz dysocjacji) do kalmoduliny i zwiększenia wrażliwości na proteolizę za pośrednictwem kalpajny (Miazek i in. 2021). Dodatkowo w lizatach mózdkowych pozyskanych z homozygotycznych zarodków R1098Q zaobserwowano występowanie zwiększonej ilości produktów rozpadu α -II spektryny o masie ~ 150 kDa, które są charakterystyczne dla trawienia przeprowadzanego przez kalpajnę (Miazek i in. 2021). Modelowanie molekularne spektryny z mutacją R1098Q przewidziało ekspozycję miejsca cięcia kalpajny. Zmiany te są prawdopodobnie spowodowane przez utratę mostka solnego, który modyfikuje miejsce wiązania kalmoduliny i odsłania naturalne miejsce ataku kalpajny, zwiększając wewnętrzną podatność spektryny na cięcie. Na podstawie badań z użyciem białek rekombinowanych stwierdziliśmy, iż zmutowany peptyd α -II spektryny R1098Q jest bardziej termolabilny oraz bardziej wrażliwy na działanie kalpajny niż peptyd α -II spektryny WT, a ponadto dodatek kalmoduliny promował w większym stopniu cięcie peptydu WT niż R1098Q (Skrzymowska i in. 2021).

Do tej pory powstające heterodimery lub agregaty zmutowanej α -II spektryny z β -II lub β -III spektryną powiązane z takimi zdarzeniami jak: zakłócenie polaryzacji i pobudliwości neuronów, niestabilność białek błonowych, zmiany w wewnątrzkomórkowym transporcie pęcherzyków i białek, zaburzenie organizacji cytoszkieletu oraz utrata lub pokaźna redukcja liczby oraz długości dendrytów (Saitu i in. 2010). Biorąc pod uwagę zmiany opisane dla myszy Spna2R1098Q, (Miazek i in. 2021), należy rozważyć, czy można mówić o wspólnym, czy odmiennym patomechanizmie. Przeprowadzona w niniejszej pracy ocena aktywności kalpajny w lizatach mózdkowych zarodków, noworodków i dorosłych myszy, pierwotnych hodowlach mysich fibroblastów jak i surowicy (ryc. 17) nie wykazała różnic w aktywności kalpajny pomiędzy myszami dzikimi a Spna2R1098Q. Stwierdziliśmy równomierny wzrost aktywności kalpajny z wiekiem, co jest naturalnym procesem (Nixon 2003; Mahaman i in. 2019). Tym samym wykluczono tezę, iż za fenotyp myszy Spna2R1098Q odpowiada zwiększenie aktywności kalpajny

Oznaczenie migracji fibroblastów płodowych myszy R1098Q.

W przeprowadzonym badaniu pierwotnych hodowli fibroblastów płodowych z myszy R1098Q nie stwierdzono zmian migracji w teście zarastania rysy w stosunku do kontroli (ryc. 29). W innym modelu, fibroblasty embrionalne pozyskane od myszy z nokautem α -II spektryny (Spna2^{-/-}) wykazywały zaburzenie migracji i adhezji (Stankewich i in. 2011). Wśród neuronów pozbawionych lub ze zmutowaną spektryną nie wykazano wpływu delekcji lub mutacji na zdolności migracji (Wang i in. 2018; Huang i in. 2017). We wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że mutacja R1098Q prowadzi do błędnej lokalizacji komórek w warstwach ośrodkowego układu nerwowego (Miazek i in. 2021), co jest zgodne z obserwacjami dotyczącymi innych mutacji α -II spektryny (Wang i in. 2018; Saitu i in. 2010; Stankewich i in. 2011; Huang i in. 2017) i mogłoby świadczyć, że mutacja R1098Q może nie być wystarczająca do zaburzenia migracji fibroblastów, lecz w przypadku komórek nerwowych już tak. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę w rozważaniach, iż mutacja R1098Q jest zmianą punktową, podczas gdy wspomniane modele posiadały nokaut α -II spektryny.

Określenie wpływu mutacji R1098Q α -II spektryny na cykl komórkowy.

Wśród wielu funkcji, które pełnią spektryny, znajduje się modyfikowanie cyklu komórkowego. Spektryny zaangażowane są w kontrolę cyklu komórkowego poprzez regulację ekspresji receptorów błonowych i odpowiednią lokalizację białek jak SMAD3/4, biorących udział w sygnalizacji TGF- β (Machnicka i in. 2012). Wykazano, iż obniżenie ekspresji α -II spektryny doprowadziło do podwyższenia poziomu p21 i zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₁

(**Machnicka i in. 2012**). Z kolei w modelu myszy elf +/- błędna sygnalizacja TGF- β /SMAD i deregulacja cyklu komórkowego w fazie G₁/S zwiększała ryzyko rozwoju nowotworu (**Zhang i in. 2013**). Wyciszenie ekspresji α -II spektryny w ludzkiej linii komórkowej czerniaka (WM-266-4) przy użyciu siRNA doprowadziło do zwiększenia odsetka komórek obecnych w fazie G₁ cyklu komórkowego i obniżenia ilości komórek obecnych w fazie S i G₂/M (**Metral i in. 2009**), a różnice były podobne do uzyskanych przeze mnie w pracy doktorskiej. W niniejszej pracy postuluję, iż mutacja zmniejsza w sposób istotny odsetek komórek osiągających fazę G₂/M oraz promuje ich pozostawanie w fazie G₀/G₁ (ryc. 30).. Ponieważ w literaturze zaobserwowano, iż wyciszeniu ekspresji α -II spektryny towarzyszy ubytek hiperuforsforylowanego białka Rb i podwyższenie p21, poziom tych białek można byłoby w przyszłości również porównać w modelu myszy Spna2R1098Q, co pozwoliłoby lepiej udokumentować i potwierdzić dotychczasowe obserwacje.

Określenie wpływu mutacji R1098Q α -II spektryny na anomalie śledziony, odpowiedź komórkową i humoralną, zmiany w morfologii krwi, a także zdolność do fagocytozy leukocytów.

Heterozygotyczne myszy Spna2R1098Q mają mniejsze śledziony (ryc. 14) w porównaniu z myszami dzikimi, co mogłoby wskazywać na upośledzenie funkcji układu immunologicznego. Spektryna odgrywa ważną rolę w procesach odpornościowych (**Meissner i in. 2017**). Jako element cytoszkieletu odpowiada za kontakt pomiędzy limfocytom T i komórką prezentującą antygen oraz powstawanie TCR. Do uformowanej synapsy immunologicznej po aktywacji TCR zostaje skierowana α -II spektryna oraz CD45 i LFA1, które zaangażowane są w tworzenie i stabilizację synapsy immunologicznej. Spektryna kontroluje aktywność oraz powierzchnię ekspresję CD45, CD3 i LFA-1, adhezję oraz przestrzenne dopasowanie podczas interakcji komórka-komórka. Zaś CD45 reguluje proliferację limfocytów T, TCR, rozwój tymocytów, odpowiada za aktywację limfocytów T, oddziałuje z takimi cząsteczkami jak CD2, CD11a, CD45AP i CSK2 (**Cairo i in. 2010; Wolgast i in. 2011**), a zaburzenia ze strony CD45 prowadzą do ciężkich złożonych niedoborów odporności (**Pradhan, Morrow 2002; Machnicka i in. 2012**). Z kolei poprzez VASP i szkielet aktynowy spektryna rekrutuje talinę, ta zaś zaangażowana jest w grupowanie LFA-1 z ICAM-1/2 w trakcie kontaktu limfocyta T z komórką prezentującą antygen, podczas drugiego sygnału aktywacji. U myszy elf -/- zaobserwowano nieprawidłową budowę jelit i wątroby. Wśród pacjentów z mutacjami w α -II spektrynie odnotowano indywidualne przypadki nieprawidłowości ze strony pęcherza moczowego, nerki i tarczycy. Przyczyną zaburzeń rozwoju śledziony w przypadku myszy Spna2R1098Q oraz w przypadku pacjentów może być zaburzenie szlaku TGF- β /SMAD i wynikające z niego zaburzenie cyklu komórkowego, które to może hamować prawidłowy rozwój narządów. Ponieważ jednak częstość

występowania mniejszej śledziony u myszy Spna2R1098Q jest dość duża, może to świadczyć, iż mutacja R1098Q może kryć zmiany kluczowe dla rozwoju tego narządu i kształtowania się układu immunologicznego. Myszy Spna2R1098Q mają tendencję do mniejszej komórkowości śledziony (ryc. 31), ale ich układ odpornościowy zostaje prawidłowo pobudzony przez stymulację OVA równie dobrze jak myszy dzikich i różnica między nimi utrzymuje się na podobnym poziomie przed jak i po iniekcji OVA (podobny wzrost komórkowości śledzion). Wskazywałoby to, iż mutacja R1098Q nie zaburza odpowiedzi układu immunologicznego myszy Spna2R1098Q. Natomiast w obrazie morfologicznym krwi myszy Spna2R1098Q wykazano istotny spadek liczby leukocytów i limfocytów (ryc. 25), co pokrywa z tendencją obserwowaną w śledzionach. Dodatkowo przeprowadzona na potrzeby tej pracy ocena zdolności leukocytów krwi i makrofagów otrzewnowych do fagocytozy wykazała, iż mutacja Spna2R1098Q nie oddziałuje na proces fagocytozy przeprowadzany przez leukocyty obwodowe krwi (ryc. 28), co wskazywałoby na prawidłowe procesowanie i prezentowanie antygeny, a co za tym idzie właściwą przebudowę zaangażowanego w te procesy cytoszkieletu i grupowania receptorów w miejscach kontaktu z celem. Analiza rezultatów badań odpowiedzi swoistej humoralnej (ryc. 32) i komórkowej (ryc. 33) również nie wykazała różnic pomiędzy układem odpornościowym myszy Spna2R1098Q i dzikich. Zebrane wyniki pozwalają stwierdzić, że układ odpornościowy myszy Spna2R1098Q reaguje podobnie na symulację OVA jak myszy dzikich oraz że nie ma różnic pomiędzy nimi w odpowiedzi humoralnej i komórkowej na zbadanym do tej pory poziomie, pomimo zaobserwowanej i potwierdzonej różnicy w wadze śledzion. W przypadku odpowiedzi humoralnej istotny pod kątem α -II spektryny wydaje się TGF- β , który to prowadzi do rozpadu α -II spektryny w procesie niezależnym od kaspazy, jednocześnie pełni kluczową rolę działając jako inhibitor wzrostu i zapoczątkowując śmierć komórkową limfocytów B, np. podczas eliminacji niedojrzałych limfocytów B (**Brown i in. 1999; Williams i in. 2003**). Uzyskane wyniki wpływu mutacji R1098Q na cykl komórkowy sugerowałyby błędną sygnalizację ze strony TGF- β /SMAD, jednak nie zaobserwowano zmian w odpowiedzi humoralnej myszy Spna2R1098Q. Aspekt ten wymaga dalszego zbadania, jak również czy za zaburzenie cyklu komórkowego odpowiedzialna jest sygnalizacja TGF- β /SMAD. Właściwie przeprowadzana fagocytoza wskazywałaby na prawidłowe oddziaływania pomiędzy cytoszkieletem spektrynowym i aktynowym, ankiryną, Cdc42, WASP, motywem ITAM, CD45 i CD148, rodziną białek Ena/VASP, GTPazą Rho, Rac, Arp2/3, (**Mylvaganam, Freeman, Grinstein 2021; Mylvaganam, Grinstein, Freeman 2018; Qualmann, Kessels 2002**).

Określenie wpływu mutacji R1098Q α -II spektryny na proces angiogenezy.

W ramach badań nad spektrynami odkryto, iż jest ona również zaangażowana w procesy angiogenezy. Wśród wielu czynników i białek oddziałujących z α -II spektryną w tym procesie

można wymienić VEGF, integryny, EVL i VASP, PDE4D4 oraz TGF- β , dzięki którym α -II spektryną bierze udział w regulacji przepuszczalności komórek śródbłonna i mikronaczyń. Stankewich i in. Postulowali w swym modelu wpływ Rac1, RhoGTPazy i formin na rozwój procesów angiogenezy i wad układu sercowo-naczyniowego. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej oznaczenie poziomu białek proangiogennych w nadsączu z nad hodowli pierwotnych fibroblastów płodowych myszy Spna2R1098Q (ryc. 26, 27) wskazuje, iż mutacja może prowadzić do zwiększonej sekrecji amfireguliny, Cyr61, fraktaliny oraz obniżenia wydzielania takich czynników jak: proliferyna, osteopontyna, serpina E1 i czynnik płytkowy 4. Amfiregulina promuje produkcję VEGF oraz poprzez receptor naskórkowego czynnika wzrostu uruchamia szlak YAP/TAZ, z kolei spektryna hamuje aktywność szlaku YAP/TAZ na bodźce mechaniczne. Na bazie uzyskanych wyników można spekulować, że zmiana konformacji spektryny R1098Q może przekładać się na zaburzenie inhibicji szlaku YAP/TAZ, co w połączeniu z promowaniem ze strony amfireguliny, może skutkować zaburzeniem kontroli tego szlaku. Natomiast VEGF zwiększa aktywność kalpajny, np. w komórkach PMEC (Su i in. 2006). Spektryna R1098Q wykazuje zwiększoną wrażliwość na cięcie przez kalpajnę, dodatkowe podwyższenie aktywności kalpajny może skutkować jeszcze większą degradacją spektryny. Negatywny wpływ na zdolności naprawy ran i formowania naczyń śródbłonna odnotowano w PMEC traktowanych VEGF. Częsteczką Cyr61 oddziałuje na proces angiogenezy poprzez integryny (α V β 3, α IIb β 3, α v β 5), zwiększenie ekspresji VEGF oraz PAI-1 (Chen, Mo, Lau 2001; Chen, Du 2007), zaś sama ekspresja Cyr61 jest kontrolowana przez szlaki YAP/TAZ (Boopathy, Hong 2019) i RhoA GTPazy (Chen, Du 2007). Zwiększoną sekrecję do medium hodowlanego i ekspresję fraktalkiny zaobserwowano także w fibroblastach pochodzących z serca z niedoborem β -IV spektryny (Nassal i in. 2023). W przypadku fraktaliny również podejrzewa się udział w aktywacji ekspresji VEGF-A i szlaku PI3K/AKT/eNOS lub Raf-1/MEK/ERK, na skutek aktywacji ze strony szlaku Rho. Dla OPN i spektryny upatruje się wspólny udział w angiogenezie poprzez szlak α V β 3/PI3K/AKT/eNOS/NO (Wang i in. 2011) i VEGF (Chakrabort, Jain, Kundu 2008). Podobnie w przypadku czynnika płytkowego 4 zaangażowanie w proces angiogenezy odbywa się przez integryny i VEGF. Obniżenie ekspresji PAI-1 odnotowano w mysich komórkach śródbłonna z niedoborem EVL -/- (Zink i in. 2021), podobnie jak w fibroblastach myszy Spna2R1098Q. Powyższe dane sugerują, iż spektryna może być zaangażowana w proces angiogenezy poprzez takie szlaki jak YAP/TAZ, GTPazy RhoA lub PI3K/AKT/eNOS z udziałem głównie integryn oraz VEGF. Model myszy Spna2R1098Q może zatem dostarczyć ciekawych informacji odnośnie zaangażowania α -II spektryny w proces angiogenezy.

5. Wnioski.

1. Fenotyp myszy Spna2R1098Q dobrze odwzorowuje spektrum kliniczne zaburzeń motorycznych, pamięciowych i rozwojowych występujących u pacjentów z dominującymi mutacjami genu α -II spektryny (*SPTANI*).
2. Zidentyfikowana anomalia wielkości śledziony oraz ubytek liczby leukocytów i limfocytów we krwi obwodowej myszy Spna2R1098Q nie wpływa znacząco na funkcję układu odporności wrodzonej (mierzonej skutecznością fagocytozy bakterii) i nabytej (mierzonej swoistą odpowiedzią humoralną i komórkową wobec immunizacji owoalbuminą).
3. Wykazane zmiany w poziomie wydzielania niektórych czynników proangiogennych przez pierwotne fibroblasty płodowe myszy Spna2R1098Q oraz częściowy blok cyklu komórkowego w fazie G_0/G_1 i obniżenia odsetka komórek w fazie G_2/M stanowią ważne przesłanki dla interpretacji obserwowanych w rozwoju zarodkowym homozygot myszy Spna2R1098Q krwotoków śródczaszkowych.

6. Spis rycin.

Rycina 1. Urządzenie zastosowane w teście obracającego się wałka.....	71
Rycina 2. Urządzenie wykorzystane do przeprowadzenia testu koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów.....	72
Rycina 3. Arena w teście rozpoznawania nowych obiektów w dniu sesji treningowej (zdjęcie po lewej) i testowym (zdjęcie po prawej stronie).....	75
Rycina 4. Arena w teście lokalizacji obiektu w trakcie sesji treningowej (zdjęcie po lewej) i testowej (zdjęcie po prawej stronie).....	76
Rycina 5. Przykładowe genotypowanie zarodków myszy Spna2R109Q.....	82
Rycina 6. Zdjęcia porównujące homozygotyczne zarodki myszy Spna2R1098Q z dzikimi embrionami myszy Spna2R1098Q.....	83
Rycina 7. Porównanie wielkości śledzion dzikich myszy Spna2R1098Q (zdjęcie po lewej stronie) z śledzionami heterozygotycznych myszy Spna2R1098Q (zdjęcie po prawej stronie).....	84
Rycina 8. Masa ciała myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	85
Rycina 9. Porównanie długości całkowitej myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	86
Rycina 10. Porównanie długości tułowia myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	88
Rycina 11. Zestawienie długości ogona myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	88
Rycina 12. Współczynnik stosunku masy ciała do długości ciała myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	90
Rycina 13. Współczynnik masy ciała i indeks Lee myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	91
Rycina 14. Porównanie masy śledziony oraz wartości współczynnika będącego stosunkiem masy śledziony do masy ciała myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	91
Rycina 15. Western blotting reaktywności przeciwciał przeciwko α -II spektrynie, β -III spektrynie i GFAP wobec lizatów mózdkowych myszy heterozygotycznych Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	93
Rycina 16. Ocena zawartości α -II spektryny, β -III spektryny i GFAP w zdenaturowanych lizatach mózdkowych myszy heterozygotycznych Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	94
Rycina 17. Aktywność kalpajny w lizatach mózdkowych, fibroblastach i surowicy krwi.....	95

Rycina 18. Analiza wpływu mutacji Spna2R1098Q (R1098Q) na zdolność utrzymania się myszy na obracającym się wałku.....	97
Rycina 19. Graficzna interpretacja danych testu koordynacji chodu na siatce z równoległych prętów.....	99
Rycina 20. Długości kroków, rozstawu i precyzji dostawiania łap przez myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz dzikie (WT).....	102
Rycina 21. Czas utrzymania się myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT) w wolnym zwisie na linie stalowej.....	104
Rycina 22. Czas eksploracji obiektów i procentowy rozkład czasu eksploracji w teście rozpoznawania nowych obiektów.....	106
Rycina 23. Liczba interakcji i procentowy rozkład liczby interakcji w teście rozpoznawania nowych obiektów.....	109
Rycina 24. Czas eksploracji, procentowy rozkład czasu eksploracji, liczba interakcji oraz procentowy rozkład liczby interakcji w teście lokalizacji obiektu.....	111
Rycina 25. Graficzna interpretacja parametrów morfologicznych krwi.....	113
Rycina 26. Western blotting reaktywności przeciwciał przeciwko czynnikom proangiogennym obecnym w medium znad hodowli fibroblastów myszy heterozygotycznych Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	115
Rycina 27. Względny stosunek poziomu proangiogennych białek obecnych w pohodowlanym medium znad hodowli fibroblastów homozygotycznych (HOMO) i dzikich (WT).....	116
Rycina 28. Zdolność do fagocytozy leukocytów krwi obwodowej myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz dzikich (WT).....	117
Rycina 29. Tempo migracji i zarastania powierzchni przez fibroblasty płodowe.....	118
Rycina 30. Analiza cyklu komórkowego fibroblastów płodowych pozyskanych z homozygotycznych (HOMO), heterozygotycznych (HET) i dzikich (WT) zarodków Spna2R1098Q.....	119
Rycina 31. Porównanie komórkowości śledzion oraz liczby komórek śledziony przypadających na jednostkę masy ciała pomiędzy myszami Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikimi (WT) w grupie niestymulowanej i stymulowanej owoalbuminą (OVA).....	121
Rycina 32. Reaktywność surowicy krwi myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz dzikich (WT) immunizowanych owoalbuminą (OVA) oraz kontrolnych (K) nieimmunizowanych.....	122
Rycina 33. Porównanie liczby reaktywnych limfocytów T produkujących INF- γ na powtórny stymulację owoalbuminą.....	123
Rycina 34. Czas trwania napadów padaczkowych u myszy Spna2R1098Q.....	124

7. Spis tabel.

Tabela 1. Wykaz odczynników chemicznych, enzymów oraz komercyjnych zestawów odczynników wykorzystanych do realizacji pracy.....	67
Tabela 2. Skład buforów wykorzystanych do realizacji pracy.....	68
Tabela 3. Zmodyfikowana skala Racin'a zastosowana w ocenie napadów padaczkowych u myszy.....	73
Tabela 4. Porównanie masy ciała myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	85
Tabela 5. Porównanie długości całkowitej myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	87
Tabela 6. Porównanie długości tułowia myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).....	87
Tabela 7. Porównanie długości ogona myszy Spna2R1098Q (R1098Q) i dzikich (WT).	89
Tabela 8. Test obracającego się wałka.....	98
Tabela 9. Progresja fenotypu Spna2R1098Q w teście obracającego się wałka.....	98
Tabela 10. Długości kroków, rozstawu i zbieżności dostawiania łap myszy Spna2R1098Q (R1098Q) oraz dzikich (WT).....	103
Tabela 11. Czas eksploracji obiektów w teście rozpoznawania nowych obiektów.....	108
Tabela 12. Procentowy rozkład czasu eksploracji w teście rozpoznawania nowych obiektów.....	108
Tabela 13. Liczba interakcji w teście rozpoznawania nowych obiektów.....	110
Tabela 14. Czas trwania i częstotliwość napadów padaczkowych u myszy Spna2R1098Q.....	125

8. Literatura.

1. Ackermann A, Brieger A. The Role of Nonerythroid Spectrin α II in Cancer. *J Oncol*. 2019;2019:7079604. Published 2019 May 2. doi:10.1155/2019/7079604
2. Ackermann A, Lafferton B, Plotz G, Zeuzem S, Brieger A. Expression and secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-8 is increased in colorectal cancer cells following the knockdown of non-erythroid spectrin α II. *Int J Oncol*. 2020;56(6):1551-1564. doi:10.3892/ijo.2020.5026
3. Ackermann A, Schrecker C, Bon D, et al. Downregulation of SPTAN1 is related to MLH1 deficiency and metastasis in colorectal cancer. *PLoS One*. 2019;14(3):e0213411. Published 2019 Mar 11. doi:10.1371/journal.pone.0213411
4. Aidoudi S, Bujakowska K, Kieffer N, Bikfalvi A. The CXC-chemokine CXCL4 interacts with integrins implicated in angiogenesis. *PLoS One*. 2008;3(7):e2657. Published 2008 Jul 16. doi:10.1371/journal.pone.0002657
5. Aravindhan A., Shah K., Pak J., Veerapandian A. Early-onset epileptic encephalopathy with myoclonic seizures related to 9q33.3-q34.11 deletion involving STXBP1 and SPTAN1 genes. *Epileptic Disord*. 2018;20(3):214-218. doi:10.1684/epd.2018.0969
6. Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, et al. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology*. 2001;142(3):1325-1332. doi:10.1210/endo.142.3.8006
7. Benz P. M., Feller S. M., Sickmann A., Walter U., Renné T. Prostaglandin-induced VASP phosphorylation controls alpha II-spectrin breakdown in apoptotic cells. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(2):319-324. doi:10.1016/j.intimp.2007.10.004
8. Benz PM, Blume C, Moebius J, et al. Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaII-spectrin-VASP complexes. *J Cell Biol*. 2008;180(1):205-219. doi:10.1083/jcb.200709181
9. Bikfalvi A. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(3):379-385. doi:10.1055/s-2004-831051
10. Boopathy GTK, Hong W. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:49. Published 2019 Apr 10. doi:10.3389/fcell.2019.00049
11. Brown TL, Patil S, Cianci CD, Morrow JS, Howe PH. Transforming growth factor beta induces caspase 3-independent cleavage of alphaII-spectrin (alpha-fodrin) coincident with apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274(33):23256-23262. doi:10.1074/jbc.274.33.23256
12. Cadwell CM, Jenkins PM, Bennett V, Kowalczyk AP. Ankyrin-G Inhibits Endocytosis of Cadherin Dimers. *J Biol Chem*. 2016;291(2):691-704. doi:10.1074/jbc.M115.648386
13. Cai X, Wang KC, Meng Z. Mechanoregulation of YAP and TAZ in Cellular Homeostasis and Disease Progression. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:673599. Published 2021 May 24. doi:10.3389/fcell.2021.673599
14. Cairo CW, Das R, Albohy A, et al. Dynamic regulation of CD45 lateral mobility by the spectrin-ankyrin cytoskeleton of T cells. *J Biol Chem*. 2010;285(15):11392-11401. doi:10.1074/jbc.M109.075648
15. Campbell I. M., Yatsenko S. A., Hixson P., et al. Novel 9q34.11 gene deletions encompassing combinations of four Mendelian disease genes: STXBP1, SPTAN1, ENG, and TOR1A. *Genet Med*. 2012;14(10):868-876. doi:10.1038/gim.2012.65

16. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci.* 2001;Chapter 8:. doi:10.1002/0471142301.ns0812s15
17. Cela E, McFarlan AR, Chung AJ, et al. An Optogenetic Kindling Model of Neocortical Epilepsy. *Sci Rep.* 2019;9(1):5236. 2
18. Chakraborty G, Jain S, Kundu GC. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Res.* 2008;68(1):152-161. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2126
19. Chen CC, Mo FE, Lau LF. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(50):47329-47337. doi:10.1074/jbc.M107666200
20. Chen J, Yao ZX, Chen JS, et al. TGF- β / β 2-spectrin/CTCF-regulated tumor suppression in human stem cell disorder Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Clin Invest.* 2016;126(2):527-542. doi:10.1172/JCI80937
21. Chen Y, Du XY. Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. *J Cell Biochem.* 2007;100(6):1337-1345. doi:10.1002/jcb.21194
22. Coppola A, Moshé SL. Animal models. *Handb Clin Neurol.* 2012;107:63-98. doi:10.1016/B978-0-444-52898-8.00004-5
23. Cortez MA, Shen L, Wu Y, et al. Infantile spasms and Down syndrome: a new animal model. *Pediatr Res.* 2009;65(5):499-503. doi:10.1203/PDR.0b013e31819d9076
24. Creighton J, Zhu B, Alexeyev M, Stevens T. Spectrin-anchored phosphodiesterase 4D4 restricts cAMP from disrupting microtubules and inducing endothelial cell gap formation. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 1):110-119. doi:10.1242/jcs.011692
25. Dai J, Peng L, Fan K, et al. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene.* 2009;28(38):3412-3422. doi:10.1038/onc.2009.189
26. Deacon RM. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp.* 2013;(75):e2609. doi:10.3791/2609
27. Dohrn MF, Saporta M. Hereditary motor neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2020;33(5):568-574. doi:10.1097/WCO.0000000000000848
28. Dubreuil RR. Functional links between membrane transport and the spectrin cytoskeleton. *J Membr Biol.* 2006;211(3):151-161. doi:10.1007/s00232-006-0863-y
29. Dulla CG. Utilizing Animal Models of Infantile Spasms. *Epilepsy Curr.* 2018;18(2):107-112. doi:10.5698/1535-7597.18.2.107
30. Fataccioli V, Abergel V, Wingertsmann L, et al. Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Hum Gene Ther.* 2002;13(12):1461-1470. doi:10.1089/10430340260185094
31. Galanopoulou AS, Moshé SL. Neonatal and Infantile Epilepsy: Acquired and Genetic Models. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015 Dec 4;6(1):a022707. doi:10.1101/cshperspect.a022707. PMID: 26637437; PMCID: PMC4691802.
32. Gartner V, Markello TC, Macnamara E, et al. Novel variants in SPTAN1 without epilepsy: An expansion of the phenotype. *Am J Med Genet A.* 2018;176(12):2768-2776. doi:10.1002/ajmg.a.40628
33. Ghisleni A, Galli C, Monzo P, et al. Complementary mesoscale dynamics of spectrin and acto-myosin shape membrane territories during mechanoresponse. *Nat Commun.* 2020;11(1):5108. Published 2020 Oct 9. doi:10.1038/s41467-020-18825-7

34. Gorman EB, Chen L, Albanese J, Ratech H. Patterns of spectrin expression in B-cell lymphomas: loss of spectrin isoforms is associated with nodule-forming and germinal center-related lymphomas. *Mod Pathol.* 2007;20(12):1245-1252. doi:10.1038/modpathol.3800962
35. Govindaraj V., Rao A. J. Proteomic identification of non-erythrocytic alpha-spectrin-1 down-regulation in the pre-optic area of neonatally estradiol-17 β treated female adult rats. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016;26(3):165-172. doi:10.1515/hmbci-2016-0008
36. Griemert EV, Schwarzmaier SM, Hummel R, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 augments damage by impairing fibrinolysis after traumatic brain injury. *Ann Neurol.* 2019;85(5):667-680. doi:10.1002/ana.25458
37. Gupta A, Zhou CQ, Chellaiah MA. Osteopontin and MMP9: Associations with VEGF Expression/Secretion and Angiogenesis in PC3 Prostate Cancer Cells. *Cancers (Basel).* 2013;5(2):617-638. Published 2013 May 27. doi:10.3390/cancers5020617
38. Hamdan F. F., Saitsu H., Nishiyama K., et al. Identification of a novel in-frame de novo mutation in SPTAN1 in intellectual disability and pontocerebellar atrophy. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(7):796-800. doi:10.1038/ejhg.2011.271
39. Huang C.Y, Zhang C., Ho T. S., et al. α II Spectrin Forms a Periodic Cytoskeleton at the Axon Initial Segment and Is Required for Nervous System Function. *J Neurosci.* 2017;37(47):11311-11322. doi:10.1523/JNEUROSCI.2112-17.2017
40. Huang CY, Zhang C, Zollinger DR, Leterrier C, Rasband MN. An α II Spectrin-Based Cytoskeleton Protects Large-Diameter Myelinated Axons from Degeneration. *J Neurosci.* 2017;37(47):11323-11334. doi:10.1523/JNEUROSCI.2113-17.2017
41. Ihara Y, Tomonoh Y, Deshimaru M, et al. Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations. *PLoS One.* 2016;11(2):e0150095.
42. Ishihara M, Araya N, Sato T, et al. Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia. *Blood.* 2013;121(21):4340-4347. doi:10.1182/blood-2012-08-446922
43. Jenkins PM, He M, Bennett V. Dynamic spectrin/ankyrin-G microdomains promote lateral membrane assembly by opposing endocytosis. *Sci Adv.* 2015;1(8):e1500301. doi:10.1126/sciadv.1500301
44. Kamens HM, Crabbe JC. The parallel rod floor test: a measure of ataxia in mice. *Nat Protoc.* 2007;2(2):277-281. doi:10.1038/nprot.2007.19
45. Kassa R, Monterroso V, Wentzell J, et al. Proximal giant neurofilamentous axonopathy in mice genetically engineered to resist calpain and caspase cleavage of α -II spectrin. *J Mol Neurosci.* 2012;47(3):631-638. doi:10.1007/s12031-011-9699-8
46. Kwak EA, Pan CC, Ramonett A, et al. β IV-spectrin as a stalk cell-intrinsic regulator of VEGF signaling. *Nat Commun.* 2022;13(1):1326. Published 2022 Mar 14. doi:10.1038/s41467-022-28933-1
47. Lee S, Ahad A, Luu M, et al. CCN1-Yes-Associated Protein Feedback Loop Regulates Physiological and Pathological Angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 2019;39(18):e00107-19. Published 2019 Aug 27. doi:10.1128/MCB.00107-19
48. Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, et al. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(6):H2836-H2846. doi:10.1152/ajpheart.00113.2006
49. Leveille E, Estiar MA, Krohn L, et al. SPTAN1 variants as a potential cause for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *J Hum Genet.* 2019;64(11):1145-1151. doi:10.1038/s10038-019-0669-2

50. Li D. Role of Spectrin in Endocytosis. *Cells*. 2022;11(15):2459. Published 2022 Aug 8. doi:10.3390/cells11152459
51. Lise S, Clarkson Y, Perkins E, et al. Recessive mutations in SPTBN2 implicate β -III spectrin in both cognitive and motor development. *PLoS Genet*. 2012;8(12):e1003074. doi:10.1371/journal.pgen.1003074
52. Lubbers ER, Murphy NP, Musa H, et al. Defining new mechanistic roles for α II spectrin in cardiac function [published correction appears in *J Biol Chem*. 2019 Oct 18;294(42):15557]. *J Biol Chem*. 2019;294(24):9576-9591. doi:10.1074/jbc.RA119.007714
53. Lux AL. Latest American and European updates on infantile spasms. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2013;13(3):334. doi:10.1007/s11910-012-0334-z
54. Machnicka B., Czogalla A., Hryniewicz-Jankowska A., et al. Spectrins: a structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(2):620-634. doi:10.1016/j.bbamem.2013.05.002
55. Machnicka B., Grochowalska R., Boguśławska D. M., Sikorski A. F. The role of spectrin in cell adhesion and cell-cell contact [published correction appears in *Exp Biol Med* (Maywood). 2019 Jul 17;:1535370219867051]. *Exp Biol Med* (Maywood). 2019;244(15):1303-1312. doi:10.1177/1535370219859003
56. Machnicka B., Grochowalska R., Boguśławska D. M., Sikorski A. F., Lecomte M. C. Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(2):191-201. doi:10.1007/s00018-011-0804-5
57. Machnicka B., Ponceau A., Picot J., Colin Y., Lecomte M.C. Deficiency of α II-spectrin affects endothelial cell-matrix contact and migration leading to impairment of angiogenesis in vitro. *Cell Mol Biol Lett*. 2020;25:3.
58. Mahaman YAR, Huang F, Kessete Afewerky H, Maibouge TMS, Ghose B, Wang X. Involvement of calpain in the neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Med Res Rev*. 2019;39(2):608-630. doi:10.1002/med.21534
59. Marchesi VT, Steers E Jr. Selective solubilization of a protein component of the red cell membrane. *Science*. 1968;159(3811):203-204. doi:10.1126/science.159.3811.203
60. Marco Hernández A. V., Caro A., Montoya Filardi A., et al. Extending the clinical phenotype of SPTAN1: From DEE5 to migraine, epilepsy, and subependymal heterotopias without intellectual disability. *Am J Med Genet A*. 2022;188(1):147-159. doi:10.1002/ajmg.a.62507
61. Marsh ED, Golden JA. Developing an animal model for infantile spasms: pathogenesis, problems and progress. *Dis Model Mech*. 2009;2(7-8):329-335. doi:10.1242/dmm.001883
62. Mastrangelo M., Leuzzi V. Genes of early-onset epileptic encephalopathies: from genotype to phenotype. *Pediatr Neurol*. 2012;46(1):24-31. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2011.11.003
63. Matsumoto H., Zaha K., Nakamura Y., Hayashi S., Inazawa J., Nonoyama S. Chromosome 9q33q34 microdeletion with early infantile epileptic encephalopathy, severe dystonia, abnormal eye movements, and nephroureteral malformations. *Pediatr Neurol*. 2014;51(1):170-175. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2014.03.013
64. McPherson PS. Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. *Cell Signal*. 1999;11(4):229-238. doi:10.1016/s0898-6568(98)00059-x

65. Meissner JM, Sikorski AF, Nawara T, et al. α II-spectrin in T cells is involved in the regulation of cell-cell contact leading to immunological synapse formation?. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189545. Published 2017 Dec 15. doi:10.1371/journal.pone.0189545
66. Metral S, Machnicka B, Bigot S, Colin Y, Dhermy D, Lecomte MC. AlphaII-spectrin is critical for cell adhesion and cell cycle. *J Biol Chem*. 2009;284(4):2409-2418. doi:10.1074/jbc.M801324200
67. Miazek A, Zalas M, Skrzymowska J, et al. Age-dependent ataxia and neurodegeneration caused by an α II spectrin mutation with impaired regulation of its calpain sensitivity. *Sci Rep*. 2021;11(1):18218.
68. Morrison-Levy N., Borlot F., Jain P., Whitney R. Early-Onset Developmental and Epileptic Encephalopathies of Infancy: An Overview of the Genetic Basis and Clinical Features. *Pediatr Neurol*. 2021;116:85-94. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2020.12.001
69. Morrow J. S., Stankewich M. C. The Spread of Spectrin in Ataxia and Neurodegenerative Disease. *J Exp Neurol*. 2021;2(3):131-139.
70. Morsy H., Benkirane M., Cali E., et al. Expanding SPTAN1 monoallelic variant associated disorders: From epileptic encephalopathy to pure spastic paraplegia and ataxia. *Genet Med*. 2023;25(1):76-89. doi:10.1016/j.gim.2022.09.013
71. Mylvaganam S, Freeman SA, Grinstein S. The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis. *Curr Biol*. 2021;31(10):R619-R632. doi:10.1016/j.cub.2021.01.036
72. Mylvaganam S, Plumb J, Yusuf B, et al. The spectrin cytoskeleton integrates endothelial mechanoresponses. *Nat Cell Biol*. 2022;24(8):1226-1238. doi:10.1038/s41556-022-00953-5
73. Mylvaganam S, Riedl M, Vega A, et al. Stabilization of Endothelial Receptor Arrays by a Polarized Spectrin Cytoskeleton Facilitates Rolling and Adhesion of Leukocytes. *Cell Rep*. 2020;31(12):107798. doi:10.1016/j.celrep.2020.107798
74. Mylvaganam SM, Grinstein S, Freeman SA. Picket-fences in the plasma membrane: functions in immune cells and phagocytosis. *Semin Immunopathol*. 2018;40(6):605-615. doi:10.1007/s00281-018-0705-x
75. Nassal DM, Shaheen R, Patel NJ, et al. Spectrin-Based Regulation of Cardiac Fibroblast Cell-Cell Communication. *Cells*. 2023;12(5):748. Published 2023 Feb 26. doi:10.3390/cells12050748
76. Nedrelow JH, Cianci CD, Morrow JS. c-Src binds alpha II spectrin's Src homology 3 (SH3) domain and blocks calpain susceptibility by phosphorylating Tyr1176. *J Biol Chem*. 2003;278(9):7735-7741. doi:10.1074/jbc.M210988200
77. Nicita F., Ulgiati F., Bernardini L., et al. Early myoclonic encephalopathy in 9q33-q34 deletion encompassing STXBP1 and SPTAN1. *Ann Hum Genet*. 2015;79(3):209-217. doi:10.1111/ahg.12106
78. Nixon RA. The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2003;2(4):407-418. doi:10.1016/s1568-1637(03)00029-1
79. Nonoda Y, Saito Y, Nagai S, et al. Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to SPTAN1 gene mutation. *Brain Dev*. 2013;35(3):280-283. doi:10.1016/j.braindev.2012.05.002
80. Pavone P, Polizzi A, Marino SD, et al. West syndrome: a comprehensive review. *Neurol Sci*. 2020;41(12):3547-3562. doi:10.1007/s10072-020-04600-5
81. Pradhan D, Morrow J. The spectrin-ankyrin skeleton controls CD45 surface display and interleukin-2 production. *Immunity*. 2002;17(3):303-315. doi:10.1016/s1074-7613(02)00396-5

82. Puchkov D, Leshchyns'ka I, Nikonenko AG, Schachner M, Sytnyk V. NCAM/spectrin complex disassembly results in PSD perforation and postsynaptic endocytic zone formation. *Cereb Cortex*. 2011;21(10):2217-2232. doi:10.1093/cercor/bhq283
83. Qualmann B, Kessels MM. Endocytosis and the cytoskeleton. *Int Rev Cytol*. 2002;220:93-144. doi:10.1016/s0074-7696(02)20004-2
84. Rapaccini V, Esposito S, Strinati F, et al. A Child with a c.6923_6928dup (p.Arg2308_Met2309dup) SPTAN1 Mutation Associated with a Severe Early Infantile Epileptic Encephalopathy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1976.
85. Ryu J, Lee CW, Hong KH, et al. Activation of fractalkine/CX3CR1 by vascular endothelial cells induces angiogenesis through VEGF-A/KDR and reverses hindlimb ischaemia. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):333-340. doi:10.1093/cvr/cvm067
86. Saitou H., Tohyama J., Kumada T., et al. Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet*. 2010;86(6):881-891. doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.013
87. Salcedo-Sicilia L, Granell S, Jovic M, et al. β III spectrin regulates the structural integrity and the secretory protein transport of the Golgi complex. *J Biol Chem*. 2013;288(4):2157-2166. doi:10.1074/jbc.M112.406462
88. Scantlebury MH, Galanopoulou AS, Chudomelova L, Raffo E, Betancourth D, Moshé SL. A model of symptomatic infantile spasms syndrome. *Neurobiol Dis*. 2010;37(3):604-612. doi:10.1016/j.nbd.2009.11.011
89. Schoch KM, Evans HN, Brelsfoard JM, et al. Calpastatin overexpression limits calpain-mediated proteolysis and behavioral deficits following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2012;236(2):371-382. doi:10.1016/j.expneurol.2012.04.022
90. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J Neurosci Methods*. 2010;189(2):180-185. doi:10.1016/j.jneumeth.2010.03.026
91. Shrivastava P, Bagchi T. Differential expression of alpha II spectrin in monocytes of tuberculosis patients. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(3):759-762. doi:10.1016/j.intimp.2013.09.005
92. Skrzymowska J, Zalas M, Goszczyński TM, Miazek A. An alpha II spectrin mutant peptide with unstable scaffold structure and increased sensitivity to calpain cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;581:68-73. doi:10.1016/j.bbrc.2021.10.021
93. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
94. Sreeja JS, John R, Dharmapal D, Nellikka RK, Sengupta S. A Fresh Look at the Structure, Regulation, and Functions of Fodrin. *Mol Cell Biol*. 2020;40(17):e00133-20. Published 2020 Aug 14. doi:10.1128/MCB.00133-20
95. Stabach PR, Cianci CD, Glantz SB, Zhang Z, Morrow JS. Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry*. 1997;36(1):57-65. doi:10.1021/bi962034i
96. Stafstrom CE, Holmes GL. Infantile spasms: criteria for an animal model. *Int Rev Neurobiol*. 2002;49:391-411. doi:10.1016/s0074-7742(02)49023-x
97. Stankewich M. C., Cianci C. D., Stabach P.R., Ji L., Nath A., Morrow J. S. Cell organization, growth, and neural and cardiac development require α II-spectrin. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 23):3956-3966. doi:10.1242/jcs.080374

98. Su Y, Cui Z, Li Z, Block ER. Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB J.* 2006;20(9):1443-1451. doi:10.1096/fj.05-5354com
99. Syrbe S., Harms F. L., Parrini E., et al. Delineating SPTAN1 associated phenotypes: from isolated epilepsy to encephalopathy with progressive brain atrophy. *Brain.* 2017;140(9):2322-2336. doi:10.1093/brain/awx195
100. Terzic B, Cui Y, Edmondson AC, et al. X-linked cellular mosaicism underlies age-dependent occurrence of seizure-like events in mouse models of CDKL5 deficiency disorder. *Neurobiol Dis.* 2021;148:105176. doi:10.1016/j.nbd.2020.105176
101. Tohyama J., Nakashima M., Nabatame S., et al. SPTAN1 encephalopathy: distinct phenotypes and genotypes. *J Hum Genet.* 2015;60(4):167-173. doi:10.1038/jhg.2015.5
102. Van de Vondel L., De Winter J., Beijer D., et al. De Novo and Dominantly Inherited SPTAN1 Mutations Cause Spastic Paraplegia and Cerebellar Ataxia. *Mov Disord.* 2022;37(6):1175-1186. doi:10.1002/mds.28959
103. Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy Behav.* 2019;95:51-55. doi:10.1016/j.yebeh.2019.02.029
104. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(1):1-18. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.011
105. Voas MG, Lyons DA, Naylor SG, Arana N, Rasband MN, Talbot WS. alphaII-spectrin is essential for assembly of the nodes of Ranvier in myelinated axons. *Curr Biol.* 2007;17(6):562-568. doi:10.1016/j.cub.2007.01.071
106. Wang CQ, Huang YW, Wang SW, et al. Amphiregulin enhances VEGF-A production in human chondrosarcoma cells and promotes angiogenesis by inhibiting miR-206 via FAK/c-Src/PKC δ pathway [published correction appears in *Cancer Lett.* 2017 Sep 28;404:94]. *Cancer Lett.* 2017;385:261-270. doi:10.1016/j.canlet.2016.10.010
107. Wang Y, Yan W, Lu X, et al. Overexpression of osteopontin induces angiogenesis of endothelial progenitor cells via the $\alpha v\beta 3$ /PI3K/AKT/eNOS/NO signaling pathway in glioma cells. *Eur J Cell Biol.* 2011;90(8):642-648. doi:10.1016/j.ejcb.2011.03.005
108. Wang Y., Ji T., Nelson A.D., et al. Critical roles of α II spectrin in brain development and epileptic encephalopathy. *J Clin Invest.* 2018;128(2):760-773. doi:10.1172/JCI95743
109. Weigand JE, Boeckel JN, Gellert P, Dimmeler S. Hypoxia-induced alternative splicing in endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(8):e42697. doi:10.1371/journal.pone.0042697
110. Williams ST, Smith AN, Cianci CD, Morrow JS, Brown TL. Identification of the primary caspase 3 cleavage site in alpha II-spectrin during apoptosis. *Apoptosis.* 2003;8(4):353-361. doi:10.1023/a:1024168901003
111. Wolgast LR, Cannizzarro LA, Ramesh KH, et al. Spectrin isoforms: differential expression in normal hematopoiesis and alterations in neoplastic bone marrow disorders. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(2):300-308. doi:10.1309/AJCPSA5RNM9IGFJF
112. Writzl K, Primec ZR, Stražišar BG, et al. Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with SPTAN1 mutation. *Epilepsia.* 2012;53(6):e106-e110. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03437.x
113. Yadunandan Nair N, Samuel V, Ramesh L, Marib A, David DT, Sundararaman A. Actin cytoskeleton in angiogenesis. *Biol Open.* 2022;11(12):bio058899. doi:10.1242/bio.058899

114. Yang P, Yang Y, Sun P, et al. β II spectrin (SPTBN1): biological function and clinical potential in cancer and other diseases. *Int J Biol Sci.* 2021;17(1):32-49. Published 2021 Jan 1. doi:10.7150/ijbs.52375
115. Yao Q, Wang H, Chen H, et al. Essential Role of Sptan1 in Cochlear Hair Cell Morphology and Function Via Focal Adhesion Signaling. *Mol Neurobiol.* 2022;59(1):386-404. doi:10.1007/s12035-021-02551-2
116. Zalas M, Skrzymowska J, Miązek A, Miązek A. Progressive Ataxia, Memory Impairments, and Seizure Episodes in *Spna2 R1098Q* Mouse Variant Affecting Alpha II Spectrin's Scaffold Stability. *Brain Sci.* 2023;13(2):261. Published 2023 Feb 3. doi:10.3390/brainsci13020261
117. Zhang J, Yang W, Luo B, Hu B, Maheshwari A, Fallon MB. The role of CX₃CL1/CX₃CR1 in pulmonary angiogenesis and intravascular monocyte accumulation in rat experimental hepatopulmonary syndrome. *J Hepatol.* 2012;57(4):752-758. doi:10.1016/j.jhep.2012.05.014
118. Zhang R, Zhang C, Zhao Q, Li D. Spectrin: structure, function and disease. *Sci China Life Sci.* 2013;56(12):1076-1085. doi:10.1007/s11427-013-4575-0
119. Zink J, Frye M, Frömel T, et al. EVL regulates VEGF receptor-2 internalization and signaling in developmental angiogenesis. *EMBO Rep.* 2021;22(2):e48961. doi:10.15252/embr.201948961