

Tytuł pracy:

„Ocena biochemiczna i czynnościowa efektów mutacji punktowej Arg1098Gln łańcucha alfa II spektryny w modelach *in vitro* i *in vivo*”

Streszczenie:

Spektryny, jako białka cyklicznego szkieletu przybłonowego, pełnią szereg funkcji. Przede wszystkim ze względu na swoje charakterystyczne właściwości elastyczne wynikające z budowy powtórzenia spektrynowego pełnią rolę amortyzatorów chroniąc błonę komórkową przed naprężeniami mechanicznymi. Są szczególnie ważne w kontekście wydłużonych aksonów, będąc niezbędne dla rozwoju i stabilności komórek nerwowych. Dodatkowo poprzez liczne oddziaływania z innymi białkami uczestniczą m. in. w organizacji kanałów błonowych, procesach adhezji, regulacji dynamiki aktyny i w przekaźnictwie nerwowym. Mutacje w obrębie spektryn powodują liczne objawy chorobowe: mioklonie, mikrocefalię, atrofię mózdkową, hipomielinację, neuropatię ruchową, paraplegię spastyczną i ataksję mózdkową. Objawy te są rozpoznawane u pacjentów i w modelach mysich w zróżnicowanym spektrum i ze zmiennym nasileniem. Spektryny są również substratem dla kalpain i kaspaz podczas przebudowy cytoszkieletu i apoptozy. Domeny SH3 i CCC znajdujące się w obrębie powtórzeń 9-10  $\alpha$ II-spektryny są ważnym miejscem, w którym krzyżują się szlaki regulacji oparte na stężeniu jonów wapniowych i kalmodulinie oraz na sygnalizacji opartej na fosforylacji stanowiąc rozdroże pomiędzy proteolizą opartą na kalpainach, a kaspazach. Liczne produkty proteolizy spektryn były identyfikowane po urazach neurologicznych oraz w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, czy Alzheimerera. W niniejszej pracy bazując na modelu mysim R1098Q z mutacją punktową w  $\alpha$ II-spektrynie i myszach transgenicznym hCAST z nadekspresją ludzkiej kalpastatyny (naturalnego inhibitora kalpain) oraz wykorzystując białka rekombinowane obejmujące dwa powtórzenia spektrynowe 9-10, na podstawie szeregu analiz instrumentalnych zaobserwowano obniżoną stabilność struktury 10 powtórzenia spektrynowego  $\alpha$ II-spektryny oraz obniżone jego powinowactwo wobec kalmoduliny. Wykorzystując metody immunochemiczne wykazano podwyższoną podatność  $\alpha$ II-spektryny niosącej mutację R1098Q na swoistą proteolizę przez kalpainę, co uwidoczniono również w barwieniu pierwotnych hodowli komórek z mózgu myszy R1098Q na obecność specyficznego produktu proteolizy  $\alpha$ II-spektryny przez kalpainę (SNTF). Ze względu na zwiększony poziom proteolizy  $\alpha$ II-spektryny u myszy R1098Q postanowiono wykorzystać myszy hCAST do stworzenia nowej linii myszy przydatnej do oceny efektu obniżenia aktywności kalpainy na fenotyp tych zwierząt. W testach motorycznych udokumentowano poprawę siły mięśniowej myszy R1098Q+hCAST oraz lepszą kontrolę stawiania kroków bez wyraźnej poprawy innych wyników testów niezborności ruchowej.