

mgr Joanna Julia Chmielewska

**Regulacja ekspresji neuroligin w synapsie w warunkach
fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. Magdalena Dziembowska

Laboratorium Molekularnych Podstaw Plastyczności Synaptycznej, Centrum
Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

Joanna Chmielewska

Magdalena Dziembowska

Synapsy są wysoce wyspecjalizowanymi miejscami interakcji pomiędzy dwiema komórkami nerwowymi. Prawidłowe połączenie synaptyczne jest możliwe dzięki występowaniu po stronie pre- i postsynaptycznej białek adhezyjnych. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa interakcja postsynaptycznych neuroligin z presynaptycznymi neureksynami. Badania ostatnich lat wskazują na istotny udział neuroligin nie tylko w utrzymaniu fizycznego pomostu zapewniającego stabilność synapsy, ale przede wszystkim w regulacji prawidłowego przewodnictwa synaptycznego.

Zaburzenia w regulacji poziomu białek synaptycznych mogą prowadzić do dysfunkcji synaps. Wykazano, że mutacje w genach neuroligin korelują z występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu. Badania na poziomie molekularnym wykazały, że odkryte mutacje zaburzają synaptyczną lokalizację neuroligin oraz skutkują nieprawidłowościami w przekazywaniu sygnału. Niedawno zasugerowano, że proces cięcia proteolitycznego może być czynnikiem regulującym poziom neuroligin na synapsie. Wykazano, że NLGN1 ulega cięciu przez dwie proteazy synaptyczne: MMP-9 oraz ADAM-10. Ponadto, dowiedziono, że przecięty fragment NLGN3 jest mitogenem stymulującym wzrost nowotworów mózgu. Niemniej jednak dokładny mechanizm obróbki proteolitycznej neuroligin pozostawał nieznanym, tak samo jak proteazy uczestniczące w procesie cięcia innych izoform neuroligin.

Zespół łamliwego chromosomu X (FXS) jest chorobą monogenową zaliczaną do syndromicznych zaburzeń ze spektrum autyzmu oraz drugą po zespole Downa przyczyną niepełnosprawności intelektualnej na świecie. Bezpośrednią przyczyną choroby jest dynamiczna mutacja w genie *fmr1*, która powoduje brak ekspresji białka zespołu łamliwego chromosomu X (FMRP). FMRP jest białkiem wiążącym RNA ulegającym silnej ekspresji w neuronach, którego podstawową funkcją jest hamowanie synaptycznej translacji mRNA. Brak regulacji translacji przez białko FMRP prowadzi do nieprawidłowej ekspresji wielu ważnych synaptycznych białek kluczowych dla funkcjonowania neuronów, prawidłowego przekazywania synaptycznego i plastyczności synaptycznej. Pomimo wielu lat badań nad podłożem zespołu łamliwego chromosomu X wciąż nie został poznany mechanizm zmian zachodzących na poziomie komórkowym pozwalający na zaproponowanie odpowiedniej strategii terapeutycznej i efektywnego leczenia.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie molekularnych mechanizmów regulujących poziom neuroligin – genów związanych zarówno z autyzmem jak i nowotworami – w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X.

Pierwszym celem badań była ocena poziomu ekspresji neuroligin (mRNA oraz białka) w synaptoneurosomach myszy o genotypie dzikim i *Fmr1* KO. Ocena poziomu białka neuroligin przeprowadzono również w pierwotnych hodowlach komórek neuronalnych hipokampa. Udowodniono, że poziom białka NLGN1 i NLGN3 jest podwyższony w synapsie myszy *Fmr1* KO, podczas gdy poziom mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* nie różni się pomiędzy genotypami myszy WT i *Fmr1* KO. To zadanie było kluczowe, gdyż pozwoliło sformułować tezę, że podwyższony poziom neuroligin jest wynikiem zwiększonej translacji synaptycznej tych białek u myszy *Fmr1* KO. Kolejnym celem było zbadanie interakcji białka FMRP z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3*. Za pomocą metody współwytrącania RNA oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* wykazano, że białko FMRP oddziałuje z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3* w neuronach. Następnie, używając metody chemicznego sieciowania białek powierzchniowych przeprowadzono charakterystykę zależnej od aktywności synaptycznej dystrybucji neuroligin 1, 2 oraz 3 w części wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej synapsy. Te badania wykazały, że brak białka FMRP w zespole łamliwego chromosomu X prowadzi do zwiększonej inkorporacji neuroligin 1 oraz 3 do błony postsynaptycznej. Ponadto, dowiedziono, iż wszystkie izoformy neuroligin – NLGN1, NLGN2, NLGN3 ulegają cięciu proteolitycznemu na synapsie w warunkach fizjologicznych. Proces obróbki proteolitycznej neuroligin jest zależny od aktywacji synaptycznej i następuje już w ciągu 2,5 minut po pobudzeniu neuronalnym. Co więcej, wykazano, że cięcie proteolityczne białek neuroligin występuje też u myszy *Fmr1* KO, co sugeruje, że ten proces nie jest zaburzony w zespole łamliwego chromosomu X. W końcowym etapie badań podjęto próbę dokładniejszego wyjaśnienia tego mechanizmu regulującego poziom neuroligin w synapsie. W tym celu przeprowadzono wstępną identyfikację proteaz odpowiedzialnych za cięcie neuroligin w synaptoneurosomach. Wyniki tych eksperymentów wskazują na udział proteazy MMP-13 w obróbce proteolitycznej białek neuroligin.

Podsumowując, wyniki zgromadzone w tej pracy doktorskiej wskazują, że poziom ekspresji neuroligin na synapsie jest zależny od dwóch czynników: kontroli translacji mRNA neuroligin przez białko FMRP oraz regulacji przez proces cięcia proteolitycznego białek neuroligin. Powyższe wyniki poszerzają wiedzę na temat funkcji synapsy w warunkach fizjologicznych na poziomie molekularnym. Ponadto, prezentują mechanizm, za pomocą którego brak białka FMRP może przyczyniać się do nieprawidłowego poziomu białek związanych z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Co więcej, uzyskane dane mogą wskazać ścieżki do opracowania nowych strategii terapeutycznych w przyszłości.

