

**Temat:** Znaczenie sygnalizacji nukleotydu w regulacji struktury i funkcji synaps w zwierzęcym modelu autyzmu indukowanym prenatalnym podaniem kwasu walproinowego.

**Proponowany promotor:** dr hab. Agata Adamczyk

**Proponowany promotor pomocniczy:** dr Anna Wilkaniec

**Finansowanie badań:** Grant NCN OPUS 13 2017/25/B/NZ4/01969 „Znaczenie zaburzeń sygnalizacji zależnej od receptorów zewnątrzkomórkowych nukleozydów i nukleotydu w dysfunkcji synaps w autyzmie” – kierownik projektu – dr hab. Agata Adamczyk

**Plan badań:** Autyzm i zaburzenia ze spektrum autyzmu (ang. Autism Spectrum Disorders, ASD) to heterogenna grupa chorób neurorozwojowych określanych mianem synaptopatii, tj. zaburzeń będących wynikiem dysfunkcji synaps. Objawy autyzmu związane są z zaburzeniami mowy i komunikowania się, kontaktów społecznych oraz brakiem elastyczności w zachowaniu. Istotną rolę w regulacji struktury i funkcji synaps, a przede wszystkim w procesach plastyczności synaptycznej pełni przekąźnictwo zależne od receptorów adenozytowych P1 i purynergicznym P2. Dotychczas nie zbadano wpływu sygnalizacji nukleotydu na strukturę i funkcje synaps w autyzmie. Istnieją jednak przesłanki, w tym wstępne badania własne, iż zaburzenie przekąźnictwa nukleotydu może mieć istotne znaczenie w tworzeniu zachowań autystycznych. Wobec powyższego celem projektu jest weryfikacja hipotezy, iż dysfunkcja synaps oraz nieprawidłowości strukturalne połączeń neuronalnych w autyzmie wynikają z zaburzeń sygnalizacji nukleotydu. Badania będą prowadzone na szczurzym modelu autyzmu indukowanym czynnikami środowiskowymi – dotychczas stosowany przez nasz zespół, szeroko rozpowszechniony model autyzmu wywołanego prenatalnym podaniem kwasu walproinowego (VPA), rekapitulujący liczne strukturalne i biochemiczne cechy autyzmu. Samice szczurów Wistar otrzymają pojedynczą dootrzewnową iniekcję VPA (450 mg/kg) lub soli fizjologicznej w 12.5. dniu ciąży. Młode będą traktowane modulatorami receptorów P1/P2 około 25. dnia życia (*i.p.*). Wykorzystując zwierzęcy model autyzmu oraz metody biologii molekularnej, biochemiczne, mikroskopię konfokalną i elektronową planuje się zbadanie **1)** czy w zwierzęcym modelu autyzmu dochodzi do zaburzenia sygnalizacji zależnej od receptorów dla zewnątrzkomórkowych nukleozydów (adenozytowe P1) i nukleotydu (purynergiczne P2) oraz **2)** czy modulacja receptorów adenozytowych i/lub purynergicznym wpływa na zaburzenia behawioralne typowe dla autyzmu.

Harmonogram badań:

### **Zbadanie zmian sygnalizacji zależnej od pobudzenia receptorów adenozytowych P1 oraz nukleotydu P2: poziomu zewnątrzkomórkowych nukleotydu i nukleozydów, ekspresji i aktywności enzymów i receptorów w zwierzęcym modelu autyzmu indukowanym VPA**

Badana będzie:

- ekspresja receptorów P1 (A1, A2A, A2B, A3) oraz P2: jonotropowych (P2X4, P2X5, P2X7) i metabotropowych (P2Y1, P2Y2, P2Y4), a także wybranych innych podtypów, oraz ektonukleotydu i deaminazy adenozykowej – PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR)
- poziom białka wyselekcjonowanych receptorów – Western-blot, ELISA.
- aktywność deaminazy adenozykowej - spektrofotometrycznie
- aktywność ektonukleotydu - spektrofotometrycznie
- poziom nukleotydu i nukleozydu – oznaczanie metodą HPLC

Poziom zewnątrzkomórkowego ATP, ADP i adenozynu oraz analiza aktywności receptorów P1 i P2 zbadana będzie w modelu hodowli pierwotnej neuronów hipokampa i kory mózgu zwierząt VPA – w obecności farmakologicznych modulatorów specyficznych względem poszczególnych podtypów receptorów: agonistów i antagonistów.

### **Zbadanie udziału sygnalizacji zależnej od receptorów P1 i P2 w regulacji aktywności kinazy mTOR zaangażowanej w kształtowanie struktury synaps**

Potomstwu samic traktowanych VPA i kontrolnych podane zostaną związki – antagoniści receptorów P1 lub P2 Zbadana zostanie aktywność kinazy mTOR oraz substratów tego enzymu regulujących proces translacji białek w tym synaptycznych:

- fosforylacja mTOR i substratów (kinaza p70 S6K – na Ser371, 4E-BP1 – na Thr37/46) - Western blot.

Szczegółowa analiza wpływu podtypów receptorów P1 i P2 na sygnalizację mTOR zbadana będzie w modelu hodowli pierwotnej neuronów hipokampa i kory mózgu zwierząt VPA. Hodowle traktowane będą wyselekcjonowanymi w trakcie badań, specyficznymi względem podtypów receptorów P1/P2 agonistami i antagonistami.

### **Zbadanie wpływu modulacji receptorów P1 i P2 na zaburzenia zachowania związane z autyzmem.**

Biodostępne związki modulujące aktywność receptorów P1 i P2 zostaną wybrane podczas realizacji projektu. Szczegóły dawek i czasu podawania dostosowane zostaną do wybranych związków.

Młode samce poddane zostaną testom behawioralnym między 42. a 53. dniem życia:

- analiza interakcji społecznych z użyciem klatki trójkomorowej,
- badanie zachowania powtarzalnego (toaleta),
- analiza aktywności eksploracyjnej i lokomotorycznej oraz poziomu lęku – test otwartego pola.