

Temat: Udział prenatalnej aktywacji układu immunologicznego w zaburzeniach funkcji, dynamiki i biogenezy mitochondriów. Znaczenie w chorobach ze spektrum autyzmu

Proponowany promotor: dr hab. Agata Adamczyk

Proponowany promotor pomocniczy: dr Magdalena Cieślik

Finansowanie badań: NCN SONATA 12 2016/23/D/NZ4/03572 „Wpływ prenatalnej aktywacji układu immunologicznego na funkcje mitochondriów. Znaczenie w chorobach neurorozwojowych” – kierownik dr Magdalena Cieślik

Plan badań: Nadmierna aktywacja układu immunologicznego w czasie rozwoju płodowego jest istotnym zjawiskiem w powstawaniu zaburzeń neurorozwojowych obserwowanych w autyzmie i innych chorobach ze spektrum autyzmu (z ang. Autism Spectrum Disorders, ASDs), które dotyczą 1% populacji dziecięcej. W schorzeniach tych obserwuje się również zaburzenia metaboliczne prawdopodobnie związane z dysfunkcją mitochondriów. Do chwili obecnej brak jest danych charakteryzujących zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów w zaburzeniach neurorozwojowych, wywołanych infekcjami w życiu płodowym. Hipoteza niniejszego projektu zakłada, że aktywacja układu immunologicznego u matki w czasie ciąży prowadzi do zaburzeń metabolicznych i dysfunkcji mitochondriów u potomstwa, a konsekwencją tego jest uszkodzenie neuroprzeżywalności i zaburzenia neurorozwojowe typowe dla autyzmu. Aktywacja układu immunologicznego wywoływana będzie przez dootrzewnowe podanie ciężarnej samicy stada Wistar, w 9,5 dniu ciąży, endotoksyny bakteryjnej - lipopolisacharydu (LPS) w jednorazowej dawce 100 µg/kg masy ciała. Badania prowadzone będą na zwierzętach potomnych (z ang. Maternal Immune Activation, MIA).

W projekcie planowana jest realizacja następujących zadań badawczych:

A. Zbadanie metabolizmu, biogenezy i funkcji mitochondriów w mózgu zwierząt potomnych w odpowiedzi na stan zapalny wywołany MIA. Doświadczenia będą prowadzone na homogenatach z kory mózgu, hipokampa i mózdzku oraz na izolowanych mitochondriach.

Zbadana będzie:

- ekspresja kluczowych białek kompleksów łańcucha oddechowego: Sdha, Mt-Nd1, Mt-Cyb oraz Mt-Co1 (real-time PCR, Western blot)
- funkcja mitochondriów poprzez pomiar napływu Ca²⁺ (radioizotopowo), spektrofluorymetryczny pomiar stężenia ATP, a także aktywność enzymatyczna kompleksu I, kompleksu IV i kompleksu V (analiza spektrometryczna).
- potencjał błony mitochondrialnej z zastosowaniem cytometrii przepływowej (Rh-123, JC-1) oraz mitochondrialny potencjał oksydoredukcyjny
- ekspresja genów regulujących biogenezę mitochondriów: PGC-1α, Nrf-1 oraz mTFAM (real-time PCR)
- translokacja i poziom białek proapoptotycznych: AIF, cytC oraz HRK (Western blot, transmisyjny mikroskop elektronowy, mikroskop konfokalny).

B. Zbadanie dynamiki (fuzja i fragmentacja) i poziomu białek odpowiedzialnych za transport mitochondriów wewnątrz komórek neuronalnych w mózgu zwierząt w odpowiedzi na stan zapalny wywołany MIA.

Zbadana będzie:

- ekspresja (real-time PCR) i poziom białek (Western blot) odpowiedzialnych za procesy fragmentacji i fuzji mitochondriów: Opa1, Mfn1/Mfn2, Drp1, Fis1 w hipokampie, korze i mózdzku zwierząt MIA.
- dystrybucja mitochondriów wewnątrz komórek nerwowych, poprzez analizę zmian w poziomie mitochondrialnych białek adaptorowych (Miro1 i Miro2 oraz Trak1 i Trak2) - Western blot i real-time PCR, ilość mitochondriów i ich morfologia analizowane będą z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej i konfokalnej.

C. Zbadanie wpływu MIA na zaburzenia autofagii mitochondriów (mitofagii). Badania będą prowadzone na homogenatach kory, hipokampa i mózdzku zwierząt potomnych, badania będą obejmowały:

- analizę procesu mitofagii w elektronowym mikroskopie transmisyjnym oraz poprzez pomiar poziomu i fosforylacji zaangażowanych w modulację autofagii kinaz białkowych: ULK, Becliny oraz AMPK (real-time PCR, Western blot)
- analizę poziomu kinazy PINK1 oraz poziomu i translokacji do mitochondriów Parkiny regulującej proces degradacji tych organelli
- zbadanie markerów tworzenia autofagosomu: LC3-I i LC3-II (real-timePCR, Western blot) oraz aktywności białek regulowanych przez kinazę mTOR: S6K, czynnik transkrypcyjny 4EBP1.

D. Zbadanie wpływu MIA na zaburzenia zachowania związane z autyzmem (testy behawioralne stosowane dotychczas w Zakładzie – na zaburzenia socjalne, test USV – zaburzenia komunikacji, otwarte pole – poziom lęku, toaleta – zachowania powtarzające się)