

mgr Anna Agata Przyborowska

Streszczenie pracy doktorskiej

**Wpływ galaniny na neurony motoryczne narażone na toksyczne działanie beta-N-metyloamino-L-alaniny w trakcie rozwoju danio pręgowanego (*Danio rerio*).**

Neurodegeneracja jest podstawową przyczyną wielu chorób, w tym choroby Alzheimera, stwardnienia zanikowego bocznego i choroby Parkinsona. Te z kolei stanowią poważny problem zdrowotny. Oprócz indywidualnych predyspozycji genetycznych, czynniki środowiskowe mogą sprzyjać rozwojowi choroby. Jednym z nich jest  $\beta$ -N-metyloamino-L-alanina (BMAA), niebiałkowy aminokwas wytwarzany przez sinice. Jednym z najpoważniejszych efektów działania BMAA jest degeneracja neuronów, a zwłaszcza neuronów motorycznych. Przy zaistnieniu odpowiednich warunków BMAA może być wytwarzana przez wszystkie znane grupy cyjanobakterii. Ze względu na ich powszechność występowania, a także możliwość bioakumulacji BMAA w poszczególnych ogniwach łańcucha troficznego, ryzyko narażenia ludzi i zwierząt na działanie toksyny jest bardzo duże. Głównym celem wielu grup badawczych jest określenie mechanizmów leżących u podstaw zaburzeń neurodegeneracyjnych, a także poszukiwanie czynników, które mogłyby zapobiec, zahamować lub zneutralizować negatywne skutki tych procesów. W tym przypadku odpowiednim kandydatem może być galanina. Neuropeptyd ten wykazuje wyraźną nadekspresję po patologicznych zaburzeniach w obrębie układu nerwowego. Sugeruje się również jego protekcyjne działanie w stosunku do neuronów.

Kierując się powyższymi motywami, podjęto próbę zbadania wpływu galaniny na toksyczność indukowaną  $\beta$ -N-metyloamino-L-alaniną (BMAA). W badaniach jako organizm modelowy zastosowano danio pręgowanego (*Danio rerio*), który zyskuje coraz większą popularność w modelowaniu chorób i opracowywaniu leków.

W ramach niniejszej dysertacji utworzono model do badań funkcji galaniny poprzez wyłączenie genu kodującego galaninę u danio pręgowanego. W tym celu zastosowano technologię CRISPR-Cas9. Po opracowaniu modelu, właściwości nowoutworzonej linii określono za pomocą analizy całego transkryptomu (RNASeq) i techniki barwienia immunofluorescencyjnego. Wpływ BMAA na larwy danio pręgowanego badano przy użyciu linii wykazujących naturalną, fizjologiczną ekspresję galaniny, a także nowoutworzonej linii  $galn^{-/-}$ . Do ustalenia toksyczności BMAA w testach wykorzystano różne stężenia toksyny i czasy ekspozycji. Analizy obejmowały określenie przeżywalności, zmian morfologicznych i zaburzeń lokomotorycznych. Bezpośrednio po ekspozycji na toksynę zmierzono także zmiany w ekspresji genów wybranych markerów stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego i apoptozy. Ponadto przy użyciu transgenicznej linii Tg(MNX1:tagRFP) z fluorescencyjnie znakowanymi neuronami motorycznymi określono bezpośredni wpływ BMAA na liczbę neuronów motorycznych nerwu trójdzielnego.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy mogą wzbogacić wiedzę na temat toksyczności BMAA *in vivo*, a także na temat troficzej i neuroprotektoryjnej funkcji galaniny podczas wystąpienia negatywnych bodźców wpływających na układ nerwowy. Ponadto nowoutworzoną linię  $galn^{-/-}$  danio pręgowanego będzie można wykorzystać w przyszłości do określania mechanizmów działania i właściwości galaniny w zupełnie innych aspektach badawczych.

## SUMMARY

Neurodegeneration is the primary cause of many diseases, including Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. These, in turn, are significant health problems. Apart from individual genetic predispositions, environmental factors may promote disease state development. One of them is  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA), a non-protein amino acid produced by cyanobacteria. One of the most serious BMAA effects is degeneration of neurons and especially motoneurons. Under suitable conditions, BMAA can be produced by all known groups of cyanobacteria. Due to their widespread occurrence as well as possibility of BMAA bioaccumulation in trophic chains, the risk of human and animal exposure to the toxin is very high. The main goal of many research groups is to determine the mechanisms underlying neurodegenerative disorders, as well as to look for factors that could prevent, inhibit or neutralize the negative effects of these processes. In this case galanin neuropeptide may be a suitable candidate. This neuropeptide is distinctly overexpressed after pathological disturbance within the nervous system. Its protective effect on neurons is also suggested.

Based on the above motives, an attempt was made to investigate the effect of galanin on  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine-induced toxicity (BMAA). In this study zebrafish (*Danio rerio*) was used as a model organism which gains increasing popularity for disease modeling and drug discovery.

In this project, a model for galanin functions studies was made by knocking out galanin coding gene in zebrafish. For this purpose, CRISPR-Cas9 technology was used. After model establishment, features of newly formed line were defined using whole transcriptome analysis (RNASeq) and immunofluorescence staining technique. The effect of BMAA on zebrafish larvae was studied using lines showing natural, physiological expression of galanin, as well as newly formed  $galn^{-/-}$  line. Different toxin concentrations and exposure times were used to determine BMAA toxicity. The survival rate, morphological and locomotor activity changes were determined during analyzes. Directly after toxin exposure, changes in gene expression of selected oxidative stress, inflammatory and apoptosis markers were also measured. In addition, the direct effect of BMAA on the number of trigeminal nerve motor neurons was determined using transgenic line Tg(MNX1:tagRFP) with fluorescently labeled motor neurons.

The results obtained as a part of this dissertation may enrich the knowledge about BMAA in vivo toxicity, as well as about trophic and neuroprotective effect of galanin during negative stimuli occurrence affecting the nervous system. In addition, the newly established galn-/- zebrafish line can be used in the future to determine the mechanisms of action and properties of galanin in completely different research aspects.