

STRESZCZENIE

Stwardnienie guzowate to rzadka, wielonarządowa choroba genetyczna charakteryzująca się wysoce zmiennym obrazem klinicznym. W schorzeniu tym obserwuje się liczne dysplazje komórkowe i tkankowe obejmujące m.in. skórę, różne narządy wewnętrzne oraz ośrodkowy układ nerwowy. Co więcej, charakterystyczne zmiany neuropatologiczne rozwijają się już w życiu płodowym. Pacjenci ze stwardnieniem guzowatym wykazują również objawy neurologiczne, takie jak epilepsja. Równie ważnym, choć często pomijanym w diagnozie i leczeniu, aspektem stwardnienia guzowatego są zaburzenia o podłożu neuropsychiatrycznym (ang. *TSC associated neuropsychiatric disorders*; TANDs). Patogeneza tego schorzenia opiera się na nadmiernej aktywności szlaku kinazy mTOR, spowodowanej mutacją w genach *TSC1* lub *TSC2*. Celem przeprowadzonych w niniejszej rozprawie badań była charakterystyka zmian neuroanatomicznych, behawioralnych i molekularnych w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym (*tsc2^{vu242/vu242}*), a także zbadanie działania wybranych związków farmakologicznych na zaobserwowane fenotypy. W pierwszej części pracy udowodniono, że homozygotyczne mutanty *tsc2^{vu242/vu242}* wykazują zmiany w aktywności lokomotorycznej, co jest związane z nadmierną aktywnością szlaku mTORC1 oraz napadami padaczkowymi. Ponadto, na podstawie pogłębionej analizy behawioralnej, stwierdzono, że larwy *tsc2^{vu242/vu242}* wykazują fenotypy podobne do niektórych zaburzeń z grupy TANDs, takie jak nasilony lęk oraz zaburzenia funkcji poznawczych. Analiza ilościowa poziomu kortyzolu pozwoliła dodatkowo potwierdzić hipotezę o podwyższonym lęku w badanym przez mnie modelu doświadczalnym. W drugiej części pracy zbadano patologie związane z wybranymi obwodami neuronalnymi w mózgu mutantów *tsc2^{vu242/vu242}* i wykazano zaburzenia morfologii spoidła przedniego oraz problemy z ukierunkowanym wzrostem aksonów. Zaburzenia te współistniały ze zmienionym poziomem mRNA genów szlaku Dock-Elmo-Rac1, zaangażowanego m.in. w proces wydłużania aksonów, wskazując molekularne podłoże obserwowanych zmian neuroanatomicznych. Wskazano również na prawdopodobne zaburzenia równowagi neurotransmisji hamującej, która jest wymieniana, jako jedna z przyczyn inicjacji napadów padaczkowych oraz rozwoju niepełnosprawności intelektualnej u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym. Co więcej, zbadano wpływ powszechnie stosowanych w klinice leków, rapamycyny i wigabatryny, na wybrane zmiany neurologiczne oraz behawioralne. Rapamycyna była skuteczna zarówno przy fenotypach behawioralnych, jak i nieprawidłowościach neuroanatomicznych w spoidle przednim mózgu. Wigabatryna odwracała fenotypy odzwierciedlające napady padaczkowe, ale nie polepszyła parametrów związanych z nasilonym lękiem u mutantów *tsc2^{vu242/vu242}*. Oprócz tego zidentyfikowano nowy związek, ANA-12, jako potencjalny lek w stwardnieniu guzowatym. Wpływał on pozytywnie na niektóre aspekty zachowania związanego z lękiem, a także był skuteczny w poprawie morfologii spoidła przedniego.

Słowa kluczowe: stwardnienie guzowate, TSC2, danio pręgowany, TANDs, mTOR, farmakoterapia

SUMMARY

Tuberous sclerosis complex (TSC) is a rare genetic disease characterized by a highly variable clinical picture. Numerous cellular and tissue dysplasias are observed in this disease in multiple organs, including the central nervous system. Some of these characteristic neuropathological changes can already be detected during fetal development. Patients with TSC also exhibit neurological symptoms such as epilepsy which often develop during the first two years of life. Equally important but often overlooked manifestations of this disease are TSC-associated neuropsychiatric disorders (TANDs). The TSC pathogenesis results mainly from hyperactivity of the mTORC1 pathway caused by loss-of-function mutations in *TSC1* or *TSC2* genes. This work aims to characterize neuroanatomical, behavioral, and molecular changes in the zebrafish model of TSC *tsc2^{vu242/vu242}*, and investigate the effects of selected drugs on the observed phenotypes. In the first part of this thesis, I showed that homozygous mutants exhibit alterations in locomotor activity, associated with hyperactivity of the mTORC1 pathway and seizures. Furthermore, based on in-depth behavioral analysis, it was found that *tsc2^{vu242/vu242}* larvae exhibit phenotypes similar to TANDs, such as increased anxiety and cognitive impairment. The quantitative analysis of cortisol levels further supported the hypothesis of increased anxiety in this model. The second part of the study examined pathologies of the selected neuronal circuits in the brain of *tsc2^{vu242/vu242}* mutants identifying disturbances in the morphology of the anterior commissure and the directed axonal growth leading to impaired axon fasciculation. These abnormalities coexisted with altered mRNA levels of genes of the Dock-Elmo-Rac1 pathway, which is involved e.g., in axon elongation, indicating a molecular basis for the observed neuroanatomical changes. Molecular analysis also revealed the probable disturbance of inhibitory neurotransmission, which is one of the reasons for the initiation of epileptic seizures and the development of intellectual disability in the TSC patients. Furthermore, the effects of the TSC clinical drugs, rapamycin and vigabatrin, on selected neurological and behavioral changes were examined. Rapamycin was effective in rescuing both behavioral phenotypes and neuroanatomical abnormalities in the anterior commissure of the brain in the *tsc2^{vu242/vu242}* mutants. Vigabatrin reversed phenotypes reflecting seizures but did not improve the parameters associated with increased anxiety in the *tsc2^{vu242/vu242}* mutants. In addition, a novel compound, ANA-12, was identified as a potential treatment for TSC-related symptoms, as it had a positive effect on some aspects of anxiety-related behavior and improved anterior commissure morphology.

Keywords: tuberous sclerosis, TSC2, zebrafish, TANDs, mTOR, pharmacotherapy