

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
FARMAKOLOOGIA OSAKOND

**Primaarsete kortikaalsete neuronite elumust ja jätkete kasvu reguleerivad faktorid
Huntingtoni tõve mudelis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Laura Maria Mikenberg

Juhendajad:

Professor Allen Kaasik, dr. med

Tambet Tõnissoo, PhD

TARTU 2025

Primaarsete kortikaalsete neuronite elumust ja jätkete kasvu reguleerivad faktorid Huntingtoni tõve mudelis

Huntingtoni tõbi (HD) on pärilik neurodegeneratiivne haigus, mida põhjustab CAG-korduste arvu suurenemine *HTT* geenis. Haiguse keskseks molekulaarseks tunnuseks on mutantse huntingtiini (mHTT) valgu kuhjumine neuronites, mille tulemusel häiruvad mitmed rakusisesed protsessid, sealhulgas transkriptsiooni regulatsioon, mitokondrite talitlus ja aksonaalne transport. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida mHTT mõju primaarsete roti ajukoore neuronite elumusele ja jätkete kasvule, kasutades normaalse ja mutantse huntingtiini plasmiidkonstrukte (pHM6-Q23 ja pHM6-Q74). Lisaks hinnati DYNLRB1 (*roadblock 1*) rolli võimaliku kaitsva teguri ja ravivõimalusena.

Märksõnad: Huntingtoni tõbi, neuronite elumus, jätkete kasv, mutantne huntingtiin, DYNLRB1.

CERCS kood: B640 Neuroloogia, neuropsühholoogia, neurofüsioloogia.

Factors Affecting the Survival and Neurite Growth of Primary Cortical Neurons in a Huntington's Disease Model

Huntington's disease (HD) is a hereditary neurodegenerative disorder caused by an expanded CAG repeat in the *HTT* gene. The central molecular hallmark of HD is the accumulation of mutant huntingtin (mHTT) protein, which disrupts several intracellular processes, including transcriptional regulation, mitochondrial function, and axonal transport. The aim of this bachelor's thesis was to investigate the effects of mHTT on the survival and neurite growth of primary rat cortical neurons using plasmid constructs expressing either wild-type or mutant huntingtin (pHM6-Q23 and pHM6-Q74). Additionally, the role of DYNLRB1 (*roadblock 1*) was analyzed as a potential protective factor and therapeutic target.

Keywords: Huntington's disease, neuronal survival, neurite growth, mutant huntingtin, DYNLRB1.

CRECS code: B640 Neurology, neuropsychology, neurophysiology.

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	8
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1. Huntingtoni tõbi (HD)	10
1.1.1. HD kliinilised sümptomid ja kulg	10
1.1.2. HD molekulaarne geneetika	11
1.1.3. HD terapeutilised võimalused	12
1.2. HTT valk.....	12
1.2.1. HTT struktuur ja paiknemine	12
1.2.2. HTT rakusisesed rollid	14
1.2.3. Mutantne HTT	15
1.3. HD molekulaarsed mehhanismid.....	16
1.3.1. Transkriptsiooni düsregulatsioon ja signalisatsioonihäired.....	16
1.3.2. Mitokondriaalne vääraltitus ja oksüdatiivne stress.....	17
1.4. HTT ja aksonaalne transport.....	19
1.4.1. Retrograadne ja anterograadne transport neuronites	19
1.4.2. HAP1	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	22
2.1. Töö eesmärgid	22
2.2. Materjal ja meetodika	23
2.2.1. Primaarsete kortikaalsete neuronite isoleerimine ja kultiveerimine.....	23
2.2.2. Primaarsete kortikaalsete neuronite transfektsioon	25
2.2.3. Kortikaalsete neuronite elumuse analüüs	27
2.2.4. Neuronaaljätmete analüüs.....	29
2.2.5. Andmetöötlus ja statistiline analüüs	30
2.3. Tulemused	32

2.3.1. Neurnaalse elumuse analüüs.....	32
2.3.2. Neurnaaljätmete kasvu analüüs	34
2.4. Arutelu.....	37
KOKKUVÕTE	40
RESÜMEE.....	41
KIRJANDUSE LOETELU.....	43
LIHTLITSENTS.....	55

KASUTATUD LÜHENDID

APP	Amüloidprekursorvalk; ingl. <i>Amyloid Precursor Protein</i>
BDNF	Tserebraalne neurotroofne faktor; ingl. <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BSA	Veise seerumalbumiin; ingl. <i>Bovine Serum Albumin</i>
CBP	CREB-i siduv valk; ingl. <i>CREB-Binding Protein</i>
CREB	cAMP-reaktsioonielemendiga seonduv valk; ingl. <i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
CV%	Varieeruvuskoeffitsient; ingl. <i>Coefficient of Variation</i>
DYNLRB1	Inimese düneiini kerge ahel <i>roadblock</i> 1; ingl. <i>Dynein Light Chain Roadblock-Type 1</i>
FBS	Veise loote seerum; ingl. <i>Fetal Bovine Serum</i>
FIS1	Mitokondriaalse fissiooni valk 1; ingl. <i>Mitochondrial Fission 1 Protein</i>
HAP1	Huntingtiiniga seonduv valk 1; ingl. <i>Huntingtin-Associated Protein 1</i>
HD	Huntingtoni tõbi; ingl. <i>Huntington's Disease</i>
HDAC	Histooni deatsetülaas; ingl. <i>Histone Deacetylase</i>
HEAT	Huntingtiin, elongatsioonifaktor 3, proteiinfosfataas 2A, TOR1; ingl. <i>Huntingtin, Elongation Factor 3, Protein Phosphatase 2A, TOR1</i>
HIP1	Huntingtiiniga interakteeruv valk 1; ingl. <i>Huntingtin-Interacting Protein 1</i>
HIPPI	HIP1 valgu interaktor; ingl. <i>HIP1-Protein Interactor</i>
HTT	Huntingtiini valk; ingl. <i>Huntingtin Protein</i>
<i>HTT</i>	Inimese huntingtiini geen; ingl. <i>Human Huntingtin Gene</i>

IP3R1	Inositol-1,4,5-trifosfaadi retseptor 1; ingl. <i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1</i>
KLC	Kinesiini kerge ahel; ingl. <i>Kinesin Light Chain</i>
mHTT	Mutantne huntingtiini valk; ingl. <i>Mutant Huntingtin Protein</i>
mPTP	Mitokondriaalne läbilaskvuspoor; ingl. <i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
MSN	Keskmine ogaline neuron; ingl. <i>Medium Spiny Neuron</i>
mtDNA	Mitokondriaalne DNA; ingl. <i>Mitochondrial DNA</i>
NES	Tuuma ekspordi signaal; ingl. <i>Nuclear Export Signal</i>
NLS	Tuuma siirdumise signaaljärjestus; ingl. <i>Nuclear Localization Signal</i>
NMDA	N-metüül-D-aspartaat; ingl. <i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
NPC	Tuumapoorikompleks; ingl. <i>Nuclear Pore Complex</i>
NRSF	Neuronispetsiifilise vaigistamise faktor; ingl. <i>Neuron-Restrictive Silencer Factor</i>
NUP62	Nukleoporiin 62; ingl. <i>Nucleoporin 62</i>
PDE	Fosfodiesteraas; ingl. <i>Phosphodiesterase</i>
PDL	Polü-D-lüsiin; ingl. <i>poly-D-lysine</i>
PET	Positronemissioontomograafia; ingl. <i>Positron Emission Tomography</i>
PGC-1 α	Peroksümaalse proliferaator-aktiveeritud retseptor gamma koaktivaator 1- α ; ingl. <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Alpha</i>
PolyQ	Polüglutamiin; ingl. <i>Polyglutamine</i>
PRR	Proliinirikas ala; ingl. <i>Proline Rich Region</i>
PSD-95	Postsünaptiline tiheduse valk 95; ingl. <i>Post Synaptic Density Protein 95</i>

RanGAP1	Ran-GTPaasi aktiveeriv valk 1; ingl. <i>Ran GTPase-Activating Protein 1</i>
RE1/NRSE	Neuronispetsiiviline vaigistamise element; ingl. <i>Neuron-Restrictive Silencer Element</i>
REST	Repressor element 1-vaigistav transkriptsioonifaktor; ingl. <i>Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor</i>
ROS	Reaktiivne hapnikuühend; ingl. <i>Reactive Oxygen Species</i>
SAHA	Ingl. <i>Suberoylanilide Hydroxamic Acid</i>
SEM	Standardviga; ingl. <i>Standard Error of the Mean</i>
STB	Ingl. <i>Stigmold Body</i>

SISSEJUHATUS

Huntingtoni tõbi (HD) on autosoom-dominantselt päranduv neurodegeneratiivne haigus, mille esinemissagedus on ligikaudu 1:100 000 inimese kohta. HD sümptomid avalduvad tavaliselt keskeas ja progresseeruvad järk-järgult, põhjustades motoorsete, kognitiivsete ja psühhiaatriliste võimete langust. Kuigi HD geneetiline põhjus, CAG-korduste arvu suurenemine *HTT* geenis, on teada juba aastast 1993, ei ole haiguse kulgu mõjutavaid tõhusaid ravimeetodeid siiani olemas. See rõhutab vajadust parema arusaama järele HD patogeneesi molekulaarsetest ja rakulistest mehhanismidest.

HD keskseks molekulaarseks tunnuseks on mutantse huntingtiini (mHTT) valgu kuhjumine neuronites, mis põhjustab ulatuslikke rakusiseseid häireid, sealhulgas probleeme transkriptsiooni regulatsioonis, mitokondriaalses talitluses ja aksonaalses transpordis. Normaalne huntingtiin (HTT) toimib adaptervalguna rakusiseses transpordis, interakteerudes nii düneiini kui ka kinesiiniga ja reguleerides vesiikulite, rakuorganellide ja mRNA transporti. Muutused valgu struktuuris, nagu polüglutamiini (polyQ) ahela pikenedamine, kahjustavad eelistatult retrograadset ehk äraspidist transporti, kuid selle mõju ulatus ja spetsiifilisus vajavad täiendavat uurimist.

Aksonaalne transport on üks olulisemaid transportmehhanisme neuronites, tagades signaalmolekulide, organellide ja valkude liikumise rakukehast aksoni tipuni ja vastupidi. Selle häirumine võib olla varajane ja otsustav tegur neurodegeneratsiooni käivitumises. Seetõttu on HD patofüsioloogia mõistmisel oluline uurida, kuidas mHTT mõjutab aksonaalset transporti ja neuronite elumust, ning kas neid protsesse saab mõjutada potentsiaalselt kaitsvate tegurite kaudu.

Varasemad uuringud on näidanud, et teatud transpordikompleksi komponendid, nagu huntingtiiniga seonduv valk 1 (HAP1), võivad kaitsta rakke mHTT toksilisuse eest, soodustades retrograadset transporti ja stabiliseerides retseptorvalke. Käesoleva töö raames uuritakse, kas düneiini adaptervalgul *DYNLRB1* (düneiini kerge ahel *roadblock 1*) võiks olla sarnane protektiivne mõju. *DYNLRB1* kuulub *roadblock* domeeniga valkude hulka, mis on seotud mikrotorukestel põhineva transpordiga, kuid selle võimalikku rolli neurodegeneratsiooni kulgemisel on seni vähe uuritud.

Antud bakalaureusetöö üldeesmärk on uurida mHTT mõju roti primaarsete kortikaalsete neuronite elumusele ja aksonaalsele transpordile, võrreldes seda normaalse huntingtiiniga. Lisaks analüüsitakse, kas *DYNLRB1* üleekspressioon võiks leevendada mHTT kahjulikke

toimeid. Töö tulemused aitavad kaasa mHTT põhjustatud kahjustuste mehhanismide paremale mõistmisele ning hindavad düneiini valgukompleksi potentsiaali neurodegeneratiivsete haiguste ravis.

Töö eksperimentaalne osa viidi läbi Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini instituudi farmakoloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Huntingtoni tõbi (HD)

1.1.1. HD kliinilised sümptomid ja kulg

Huntingtoni tõbi (HD) on autosoom-dominantselt päranduv progresseeruv neurodegeneratiivne haigus, mida põhjustab CAG-korduste arvu suurenemine *HTT* geenis (MacDonald *et al.*, 1993). CAG-trinukleotiid kodeerib aminohapet glutamiin, mistõttu viib korduste laienemine ebanormaalselt pika polüglutamiiniahela sünteesini huntingtiini (HTT) valgu N-terminaalses otsas (Zheng ja Diamond, 2012). HD esinemissagedus Euroopas on hinnanguliselt 4–8 inimest 100 000 kohta (Harper, 1992; Morrisson *et al.*, 1995; Peterlin *et al.*, 2009).

HD kliiniline pilt hõlmab progresseeruvaid motoorseid häireid, kognitiivsete ehk tunnetuslike võimete langust ja psühhiaatrilisi sümptomeid (Kiebertz *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1997). Neurodegeneratiivsed muutused algavad tihti juba aastaid enne kliiniliste sümptomite ilmumist prodromaalses ehk eelnähulises faasis, mida iseloomustavad kerged motoorsed, kognitiivsed ja emotsionaalsed kõrvalekalded (Marder *et al.*, 2000). Prodromaalses staadiumis ilmnevad sageli ärrituvus, impulsiivsus, rahutus ja ärevus (Paulsen *et al.*, 2001; Walker, 2007). Haigusele on omased koreaatilised (tahtmatud, tõmblevad) liigutused, mis progresseerudes hakkavad mõjutama neelamis-, kõnni- ja kõnevõimet (Kim *et al.*, 2021). Haiguse hilisemates staadiumites võivad esineda ka muud motoorsed sümptomid, nagu bradükineesia (liigutuste aeglustumine), düstoonia (väärpinge) ja lihasjäikus (Walker, 2007; Rosenblatt *et al.*, 2003; Kiebertz *et al.*, 1996). Haigusele on iseloomulik ka motoorne impersistentsus ehk suutmatus säilitada püsivat lihaskontraktsiooni (Gordon *et al.*, 2000).

Kognitiivsel tasandil on mõjutatud peamiselt täidesaatvad funktsioonid, sealhulgas organiseerimine, planeerimine ja probleemide lahendamine, samas kui pikaajaline mälu on üldjuhul säilinud (Paulsen *et al.*, 1995; Craufurd *et al.*, 2002; Walker 2007). Psühhiaatrilisest sümptomitest esinevad kõige sagedamini düsfooria (ebaolek), agiteeritus, ärrituvus, apaatia (osavõtmatus) ja ärevus (Paulsen *et al.*, 2001; Craufurd *et al.*, 2002).

HD neurodegeneratsioon mõjutab kõige tugevamalt juttkeha (*corpus striatum*) keskmiseid ogalisi neuroneid (MSN – *medium spiny neurons*), mille kadu võib ulatuda kuni 95%-ni (Halliday *et al.*, 1998; Ross ja Tabrizi, 2011). Lisaks juttkehale on atroofiat ehk kõhetumist täheldatud ka neokorteksis, talamuses, *globus palliduses*, subkortikaalses must- ja valgeaines, subtalaamses tuumas ja väikeajus (Vonsattel, 2008). Juttkeha atrofeerumist on võimalik

tuvastada juba prodromaalses staadiumis, samas kui laiem neurodegeneratsioon ilmneb alles hilisemates staadiumites (Vonsattel, 2008; Tabrizi *et al.*, 2009).

1.1.2. HD molekulaarne geneetika

1993. aastal tuvastati kindel geenimutatsioon, mis HD-d põhjustab: laienenud CAG-kordused *HTT* geeni esimese eksoni kodeerivas alas, 4. kromosoomi lühikeses õlas (4p16.3) (MacDonald *et al.*, 1993).

HTT geenis olev CAG-korduste arv normaalsetel indiviididel on alla 36, kus kõige sagedamini jääb see 15–25 vahele (Zheng ja Diamond, 2012). Korduste hulk, mis jääb alla 27, ei ole haigustekitavad; 27–35 kordust loetakse vahepealseks alaks, mis iseseisvalt haigust ei põhjusta, kuid võivad olla meioosi ajal ebastabiilsed ja järgmistes põlvkondades laieneda (Myers, 2004). Korduste arvu vahemikus 36–39 seostatakse mittetäieliku penetratsuse ehk ekspressiivsusega, kus haigus avaldub vaid mõnedel juhtudel (Myers, 2004). Täielik penetrantsus ilmneb tavaliselt alates 40st CAG-kordusest (Langbehn *et al.*, 2004).

Uuringud on näidanud tugevat pöördkorrelatsiooni CAG-korduste arvu ja haiguse avaldumise vanuse vahel: mida rohkem kordusi, seda varasemas eas avalduvad sümptomid (Myers, 2004). CAG-korduste arvuga ≥ 40 seostatakse peaaegu täielikku penetrantsust 65. eluaastaks (Langbehn *et al.* 2004). Samas ei piisa üksi sellest, et täpselt ennustada, millal haigus konkreetsel indiviidil algab ning varieeruvus võib olla suur isegi samade korduste arvu korral (Myers, 2004). CAG-korduste hulk selgitab ligikaudu 50-70% haiguse avaldumise vanuse varieeruvusest, ülejäänud on tingitud täiendavatest geneetilistest ja keskkondlikest teguritest (Ross ja Tabrizi, 2011; Wexler, 2004).

Üheks mõjutavaks faktoriks on geneetilised modifikaatorid, nagu *HAP1* (huntingtiiniga seonduv valk 1; ingl. *Huntingtin-Associated Protein 1*), *GRIK2* ja *TCERG1* (Li *et al.*, 2007; Metzger *et al.*, 2008; Taherzadeh-Fard *et al.*, 2009). Näiteks *HAP1*-geeni varianti M441, kus on toimunud aminohappeasendus treoniinilt (T441) metioniinile, on seostatud hilisema avaldumisvanusega (Metzger *et al.*, 2008). M441 suhtes homosügootsete Euroopa päritolu patsientide hulgas, kellel oli *HTT* geenis alla 60 CAG-korduse, lükkus haiguse avaldumise iga edasi keskmiselt 8 aastat (Metzger *et al.*, 2008). Samas uuringus näitasid laboratoorsed katsed, et M441-variant seondub mHTT-ga tugevamini, vähendades selle toksiliste fragmentide teket ja kaitstes neuroneid kahjuliku toime eest (Metzger *et al.*, 2008).

1.1.3. HD terapeutilised võimalused

Olenemata laiaulatuslikest uuringutest, ei ole siiani ühtegi efektiivset HD-d modifitseerivat ravimeetodit avastatud. Seetõttu on HD ravi valdavalt sümptomaatiline, keskendudes haigusnähtude leevendamisele ja patsiendi elukvaliteedi parandamisele (Kim *et al.*, 2021; Ross ja Tabrizi, 2011). Enamik kasutusel olevatest ravimitest põhinevad kliinilistel kogemustel ja tähelepanekutel, mitte ulatuslikel uuringutel (Adam ja Jankovic 2008; Bonelli ja Hofmann, 2007; Priller *et al.*, 2008).

Koreat ehk tahtmatuid tõmblevaid liigutusi, põhjustab GABA-ergiliste MSN-ide kadu, mille tulemuseks on hüperkineetiline seisund (Kim *et al.*, 2021). Koreaatiliste sümptomite leevendamiseks kasutatakse dopamiini taset langetavaid ravimeid, et vähendada dopamiini vahendatud basaalganglionide aktivatsiooni või disinhibitsiooni (Wyant *et al.*, 2017). Seni on heakskiidu saanud kaks ravimit (tetrabensaiin ja deutetrabensaiin), mis mõlemad vähendavad dopaminergilist neuroülekanget (Potkin ja Potkin, 2018; Frank, 2014). Vajadusel kasutatakse ka antipsühhootikume, nagu haloperidool ja kvetiapiin, ning muid dopamiini retseptorite antagoniste, kuigi nende tõhusus ja talutavus on patsientide lõikes varieeruvad (Adam ja Jankovic, 2008; Wyant *et al.*, 2017). Muude HD mootorsete sümptomite ravivõimalused on oluliselt piiratumad (Wyant *et al.*, 2017).

Kognitiivsete häirete vastu seni tõhus farmakoloogiline ravi puudub; dementsusevastaste ravimite, nagu atsetüülkoliinesteraasi inhibiitorite kasutamine ei ole andnud HD puhul veenvaid tulemusi (Adam ja Jankovic, 2008; Kim *et al.*, 2021). Psühhiaatriliste sümptomite käsitlemisel rakendatakse vastavalt vajadusele tavapäraseid psühhofarmakone, sealhulgas antidepressante, antipsühhootikume ja anksiolüütikume (Adam ja Jankovic, 2008).

Siiski ei peata sümptomaatiline ravi haiguse progresseerumist. Praegu puuduvad teraapiavõimalused, mis suudaksid pidurdada HD neurodegeneratsiooni või muuta oluliselt haiguse loomulikku kulgu (Carroll *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2021). Seetõttu on oluline jätkata HD ja selle patogeneesi põhimehhanismide uurimist.

1.2. HTT valk

1.2.1. HTT struktuur ja paiknemine

Huntingtiin (HTT) on 348 kDa suurune tsütoplasmaatiline valk, mida kodeerib *HTT* geen (MacDonald *et al.*, 1993; DiFiglia *et al.*, 1995). HTT koosneb 3144 aminohappest ning sisaldab N- ja C- terminaalsetid α -helikaalseid korduvaid HEAT-domeene (huntingtiin,

elongatsioonifaktor 3, proteiinfosfataas 2A ja TOR1; ingl. *Huntingtin*, *Elongation Factor 3*, *Protein Phosphatase 2A*, *TOR1*; joonis 1), mis on omavahel seotud α -helikaalse silla domeeniga (Ross ja Tabrizi, 2011; Guo *et al.*, 2018).

HTT N-terminaalsele alale järgneb polüglutamiini (polyQ) järjestus, mis algab 18. aminohappepositsioonist ning sisaldab 9–35 CAG-kordust (Saudou ja Humbert, 2016). Imetajatel järgneb polyQ-le proliinirikas ala (PRR – *proline-rich region*), mis on tõenäoliselt oluline valk-valk interaktsioonide vahendamiseks (Harjes ja Wanker, 2003; Saudou ja Humbert, 2016). Keskosas paiknevad korduvad HEAT-domeenid, mis on samuti olulised valk-valk interaktsioonideks, ning võivad moodustada superhelikaalse solenoidi-laadse struktuuri, mis vahendavad inter- ja intramolekulaarseid interaktsioone ja HTT toimimist rakusiseses adapterina (Li *et al.*, 2006; Saudou ja Humbert, 2016; Palidwor *et al.*, 2009).



Joonis 1. Huntingtiini valgu struktuurne ülevaade. N-terminaalne ala (1–17), millele järgnevad polüglutamiini järjestus (polyQ) ning proliini rikas ala (PRR). Keskosas paiknevad neli HEAT-korduste domeeni (H1–H4). C-terminaalse otsa lähedal asub leutsiinirikas tuuma ekspordi signaal (NES). Huntingtiin on modifitseeritav ja lõhustatav mitmes kohas, sealhulgas kaspaas-6 poolt lõikekohas D586. (Ananbeh *et al.*, 2021, kohandatud)

HTT C-terminaalses alas asub leutsiinirikas aktiivne tuuma ekspordi signaal (NES – ingl. *Nuclear Export Signal*; joonis 1) ja N-terminaalses alas tuuma siirdumise järjestus (NLS – ingl. *Nuclear Localization Signal*) (Schulte ja Littleton, 2011; Desmond *et al.*, 2012; Ananbeh *et al.*, 2022). Lisaks leidub valgu erinevates piirkondades mitmeid posttranslatsiooniliste modifikatsioonide saite, sealhulgas fosforüülimise, atsetüleerimise, sumoüleerimise, ubikvitinüleerimise ja palmitoüleerimise saidid, mis mõjutavad HTT aktiivsust, lokaliseerumist ja stabiilsust (Sadou ja Humbert, 2016; Ross ja Tabrizi, 2011; Yanai *et al.*, 2006).

HTT on evolutsiooniliselt konserveerunud ja ekspresseeritud kogu kehas, olles eriti rohkelt esindatud kesknärvisüsteemis ja testistes (Ferrante *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1993; DiFiglia *et al.*, 1995). Rakulisel tasandil paikneb HTT peamiselt tsütoplasmas, kuid teda leidub ka rakutuumas

ja erinevates organellides, sealhulgas endoplasmaatilises retiikulumis, Golgi kompleksis, mitokondrites, endosoomides ja sünaptilistes vesiikulites (DiFiglia *et al.*, 1995; Cattaneo *et al.*, 2005; Saudou ja Humbert, 2016). HTT lokaliseerumine on dünaamiline ning sõltub tema interaktsioonidest teiste valkudega ja rakulistest tingimustest (Schulte ja Littleton, 2011).

1.2.2. HTT rakusisesed rollid

HTT rakusisene roll on mitmekesine ja tihedalt seotud neuronite elumuse, arengu ja talitlusega. Tal on oluline roll mikrotorukeste vahendatud organellide ja valkude transpordis, kus ta toimib adaptervalguna mootorvalkude, nagu düneiin, kinesiin, ja nende koormate vahel (Schulte ja Littleton, 2011; Saudou ja Humbert, 2016). Neuronites osaleb HTT näiteks kasvufaktor BDNF-i (tserebraalne neurotroofne faktor; ingl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), autofagosoomide, lüsoosoomide ja endosoomide suunatud transpordis (Gauthier *et al.*, 2004, Wong ja Holzbaur, 2014; Caviston *et al.*, 2011; Liot *et al.*, 2013). Lisaks seondub HTT Rab8/optineuriin/müosiin VI kompleksiga ja reguleerib seeläbi transporti aktiinifilamentidel, võimaldades sellega sujuvat koordinatsiooni erinevate tsütoskeleti komponentide vahel (Farber *et al.*, 1998; Hattula ja Peränen *et al.*, 2000; Sahlender *et al.*, 2005; Prowse *et al.*, 2025).

HTT osaleb mRNA-de transpordis ja stabiliseerimises, seondudes nende kompleksidega ning interakteerudes RNA-ga seonduvate valkudega (Cattaneo *et al.*, 2005; Prowse *et al.*, 2025). HTT osaleb neuronispetsiifiliste NRSF-reguleeritud geenide, sealhulgas BDNF-i, transkriptsiooni regulatsioonis (Zuccato *et al.*, 2003, 2001; Saudou ja Humbert, 2016). Regulatsioon toimub seostudes REST/NRSF-iga (ingl. *Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor / Neuron-Restrictive Silencer Factor*), mis takistab selle seandumist RE1/NRSE-ga (RE1 – ingl. *Neuron-Restrictive Silencer Element*; NRSE) ja tuuma korepressorkompleksi moodustumist (Zuccato *et al.*, 2001; Saudou ja Humbert, 2016). Selle mehhanismiga toetab HTT lisaks BDNF-i sünteesile ka neuronite arengut, sünaptilist aktiivsust ja plastilisust, mistõttu on selle funktsiooni häirumine seotud mitmete HD patofüsioloogiliste tunnustega (Chao, 2003; Binder ja Scharfman, 2004; Zuccato ja Cattaneo, 2007).

Sünaptilisel tasemel osaleb HTT neuroüleandes, interakteerudes ekso- ja endotsütoosi jaoks vajalike tsütoskeleti ja vesiikulvalkudega (Smith *et al.*, 2005; Cattaneo *et al.*, 2005). Näiteks osaleb HTT NMDA (N-metüül-D-aspartaadi) retseptorite regulatsioonis seondudes PSD-95 (post sünaptiline tiheduse valk 95; ingl. *Post Synaptic Density Protein 95*) valguga, mis mõjutab neurotoksilisust, sünaptilist plastilisust ja signalisatsiooni (Sun *et al.*, 2001).

Lisaks sellele, et HTT toetab neuronaalset funktsiooni, on ta oluline ka nende elumuse tagamisel. HTT omab tugevat antiapoptoosilist toimet, kaitstes rakke erinevate apoptoosiliste stiimulite eest ja pärssides kaspas-9 aktivatsiooni, mis hoiab ära ka kaspas-3 aktivatsiooni ning DNA fragmenteerumist (Dragatsis *et al.*, 2000; Rigamonti *et al.*, 2000).

Katsetega on näidatud, et *Htt*^{-/-} hiire embrüod on eluvõimetud ning surevad pregastrulatsiooni staadiumis, mis viitab HTT olulisusele embrüonaalses arengus (Copp, 1995; Duyao *et al.*, 1995; Zeitlin *et al.*, 1995). Haplodefitsiitsetel *Htt*^{+/-} hiirtel esinevad ajustruktuuride arenguhäired, motoorika puudulikkus ja neurogeneesi häired, mis näitab, et HTT on vajalik nii aju struktuurseks väljakujunemiseks, kui ka hilisemaks funktsioneerimiseks (White *et al.*, 1997; Reiner *et al.*, 2003; Cattaneo *et al.*, 2005). Mitmetes mudelorganismides ja rakulistes katsetes on näidatud, et metsiktüüpi HTT üleekspressioon suurendab neuronite elumust ning kaitseb mHTT poolt põhjustatud neorotoksiliste toimete eest (Rigamonti *et al.*, 2000; Zuccato ja Cattaneo, 2007). See tõestab, et HD patogeneesis mängib lisaks mHTT toksilisele toimele olulist rolli ka normaalse HTT funktsiooni osaline või täielik kadu (Cattaneo *et al.*, 2005; Schulte ja Littleton, 2011).

1.2.3. Mutantne HTT

PolyQ laienemine *HTT* geenis põhjustab huntingtiini (HTT) valgus ulatuslikke struktuurseid ja konformatsioonilisi muutuseid, mis on võtmetähtsusega HD patogeneesis (Ross ja Tabrizi, 2011). PolyQ järjestuse ekspansiooni tõttu sünteesitud mutantne HTT säilitab küll mitmed normaalse HTT struktuursed tunnused, kuid kordustest tingitud muutused nii valgu primaarkui ka kõrgemajärgulistes struktuurides muudavad selle füüsikalisi-keemilisi omadusi ning rakulist käitumist (Taylor *et al.*, 2002; Schaffert *et al.*, 2020; Ananbeh *et al.*, 2021). Oluline roll on ka N17 domeenil (esimesed 17 aminohapet N-terminaalses alas; joonis 1), mille posttranslatsioonilised modifikatsioonid, nagu fosforüülimine ja atsetüülimine, mõjutavad mHTT lahustuvust, tuumasiirdumist ja agregatsioonipotentsiaali (Lontay *et al.*, 2020; Ananbeh *et al.*, 2021). PolyQ pikenemine suurendab mHTT kalduvust moodustada ebatavalisi konformatsioone, näiteks β -lehtstruktuure, mis soodustavad valgu agregatsiooni ja fibrillide teket (Taylor *et al.*, 2002; Grima *et al.*, 2017; Schaffert *et al.*, 2020). Kuigi mHTT-s on HEAT-kordused säilinud, võib polüQ ekspansioon muuta nende ruumilist asetust, mõjutada seeläbi tema interaktsioone mootorvalkude ja teiste rakukomponentide vahel (Jung *et al.*, 2020; Ananbeh *et al.*, 2021).

Struktuurimuutuste tõttu on mHTT vastuvõtlikum proteolüütilisele lõhestumisele, ehkki tal säilivad samad proteolüütiised saidid nagu normaalsel HTT-l (joonis 1), ning polyQ pikenemine destabiliseerib valku, soodustades patoloogiliste fragmentide teket ja agregeerumist (Saudou ja Humbert, 2016; Warby *et al.*, 2008; Ananbeh *et al.*, 2021). NLS-i sisaldavad fragmendid akumulerevad rakutuumadesse, samas kui normaalne HTT paigutub peamiselt tsütoplasmasse (DiFiglia *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1999; Ananbeh *et al.*, 2021).

Lisaks häirib mHTT tuuma ja tsütoplasma vahelise transpordi regulatsiooni, interakteerudes tuumapoorikompleksi (NPC) komponentidega, näiteks RanGAP1 (ran-GTPaasi aktiveeriv valk 1; ingl. *Ran GTPase-Activating Protein 1*) ja NUP62-ga (nukleoporiin 62; ingl. *Nucleoporin 62*), mis omakorda kahjustab tuumamembraani struktuuri ning põhjustab NPC komponentide agregatsiooni (Suhr *et al.*, 2001; Hosp *et al.*, 2015; Grima *et al.*, 2017). Need muutused soodustavad valgu akumulereumist tuuma ja mõjutavad seega raku funktsiooni mitmel tasandil (Ananbeh *et al.*, 2021; Grima *et al.*, 2017).

mHTT patogeneetilise mõju hulka kuulub ka vähenenud seondumine huntingtiiniga interakteeruva valgu 1-ga (HIP1 – ingl. *Huntingtin Interacting Protein 1*), mille tagajärjel saab vabanenud HIP1 moodustada komplekse HIPPI-ga (HIPPI – ingl. *HIP1-Protein Interactor*) (Gervais *et al.*, 2002). HIP1-HIPPI moodustab kompleksi prokaspaaas-8-ga ja käivitab apoptootilise rakusurma (Gervais *et al.*, 2002).

Seega ei muuda mutatsioonid *HTT* geenis ainult valgu struktuuri, vaid häirivad ka mitmeid olulisi rakusiseseid radu, homöostaasi ning käivitavad neurodegeneratiivseid protsesse.

1.3. HD molekulaarsed mehhanismid

1.3.1. Transkriptsiooni düsregulatsioon ja signalisatsioonihäired

Transkriptsiooni düsregulatsioon on HD patogeneesi varajane ja keskne tunnus. Muutusi geeniekspressioonimustrites, mis on seotud neuronaalsete talitlushäirete ja degeneratsiooniga, on täheldatud juba haiguse varajastes staadiumites, tihti enne sümptomite avaldumist (Lin *et al.*, 2000).

Üks põhjus nende muutuste tekkes on mHTT akumulereumine tuuma, mis häirib transkriptsioonifaktorite ja koaktivaatorite normaalset seondumist (Wellington *et al.*, 2000; Dunah *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2006). mHTT interakteerub CREB (cAMP-reaktsioonielemendiga seonduv valk; ingl. *cAMP Response Element-Binding Protein*) seonduva valguga CBP (CREB-i siduv valk; ingl. *CREB-Binding Protein*), põhjustades selle

agregatsiooni ja funktsiooni kaotust, mis viib histoonide hüpoatsetüülimise ja laiaulatuslikku transkriptsioonirepressioonini (Steffan *et al.*, 2001; Nucifora *et al.*, 2001).

Histoonide hüpoatsetüülimist on kirjeldatud HD mudelites ning see nähtus korreleerub progresseeruva neurodegeneratsiooni ja sümptomite süvenemisega (Steffan *et al.*, 2001). Histoonide deatsetülaasi (HDAC) inhibiitorid, nagu naatriumbutüraat ja SAHA (ingl. *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*), on olnud tõhusad transkriptsioonihäirete leevendamisel ja neurodegeneratsiooni aeglustamisel või pidurdamisel polüglutamiini haiguste mudelites (Steffan *et al.*, 2001; Ferrante *et al.*, 2003; Hockly *et al.*, 2003).

mHTT mõjutab otseselt ka CREB-signaalirada, vähendades CREB-i fosforüülimist ja aktiivsust, mis toob kaasa languse BDNF-i ekspresioonitasemes (Zuccato *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2009). CREB-i aktiivsuse taastamine, näiteks fosfodiesteraasi (PDE) inhibiitoritega on näidanud positiivset mõju neuronite ellujäämisele HD mudelites (Choi *et al.*, 2009; DeMarch *et al.*, 2008; Giampà *et al.*, 2009).

Tuumasisese transkriptsioonirepressiooni põhjuseks on ka REST/NRSF, mille aktiivsus kasvab mHTT olemasolul, põhjustades neuronispetsiifiliste geenide, sealhulgas *BDNF*-i, transkriptsiooni pärssimist (Zuccato *et al.*, 2003).

Samuti pärsib mHTT transkriptsioonifaktorit SP1 ning vähendab SP1 ja transkriptsiooni initsiatsioonifaktori TAFII130 poolt vahendatud dopamiini D2 retseptori geeniekspressiooni (Dunah *et al.*, 2002). Katsetega on näidatud, et SP1 ja TAFII130 üleekspressioon vähendab mHTT-st tulenevat D2 promootori aktiivsuse inhibitsiooni (Dunah *et al.*, 2002). Lisaks takistab mHTT SP1 seondumist DNA-ga, mis võib samuti põhjustada SP1-reguleeritavate geenide ekspresioonitaseme langust (Dunah *et al.*, 2002).

mHTT pärsib ka peroksümaalse proliferator-aktiveeritud retseptor gamma ko-aktivaator 1- α (PGC-1 α – ingl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Alpha*) ekspressiooni (Cui *et al.*, 2006). PGC-1 α kontsentratsiooni langus kahjustab mitokondriaalset biogeneesi ja respiratsiooni, muutes neuronid vastuvõtlikumaks metaboolsetele häiretele (Cui *et al.*, 2006).

1.3.2. Mitokondriaalne väärtalitus ja oksüdatiivne stress

Mitokondriaalne düsfunktsioon ehk väärtalitus ja sellest tulenev oksüdatiivne stress on HD patogeneesis keskse tähtsusega mehhanismid. Neuronid, eriti striataalsed MSN-id, sõltuvad

tugevalt mitokondriaalsest energiavarustusest, olles seega mitokondriaalsete kahjustuste suhtes eriti tundlikud (Gu *et al.*, 1996; Tabrizi *et al.*, 2000).

mHTT põhjustab mitokondriaalset väärtalitlust, häirides hingamisahela ensüümide aktiivsust ja vähendades sünteesitava ATP hulka (Gu *et al.*, 1996; Tabrizi *et al.*, 2000). Lisaks suurendab mHTT mitokondrite tundlikkust Ca²⁺ akumulatsioonile ning soodustab mitokondriaalsete PTP-de (mPTP – mitokondriaalne läbilaskvuspoor; ingl. *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) avanemist (Panov *et al.*, 2002). Striaalsed neuronid on eriti haavatavad kaltsiumi düsregulatsiooni suhtes, mis koos energiapuudusega suurendab võimalikku degeneratsiooniriski (Gu *et al.*, 1996; Browne *et al.*, 1997; Greene *et al.*, 1996; Bezprozvanny ja Hayden, 2004).

Energeetilised häired ilmnevad juba HD varajases staadiumis, nagu näitavad positronemissioontomograafia (PET) uuringud, mille abil on tuvastatud vähenenud glükoosi tarbimine ajukoos ja juttkehas ehk striatumis (Kuwert *et al.*, 1990). Lisaks on striitaalsetes kudedes täheldatud hingamisahela komplekside II, III ja IV aktiivsuse langust (Gu *et al.*, 1996; Browne *et al.*, 1997; Quintanilla ja Johnson, 2009).

HD-ga seotud mitokondriaalne kahjustus avaldub ka mtDNA (mitokondriaalne DNA) vähenemises ja kahjustustes ning struktuurilistes muutustes, sealhulgas kristade lagunemises ja väikeste ümarate mitokondrite akumulatsioonides (Acevedo-Torres *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Chaturvedi *et al.*, 2009).

Mitokondrid on peamised reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) tootjad rakus, ning mitokondriaalne väärtalitlus HD-s suurendab ROS-ide taset, põhjustades biomolekulide kahjustusi, nagu lipiidide peroksüdatsioon ja DNA oksüdatiivsed kahjustused (Beal *et al.*, 1993; Browne *et al.*, 1997; Sorolla *et al.*, 2008).

Spetsiifiline neuronite haavatavus HD-s, eriti striitaalsete MSN-ide puhul, võib olla seotud nende kõrgete metaboolsete vajaduste ja kaltsiumi düsregulatsiooni tundlikkusega (Vonsattel ja DiFiglia, 1998; Vonsattel *et al.*, 1985). Uuringud on näidanud, et kui mitokondriaalne Ca²⁺ puhverdamine on häiritud, kalduvad striataalsed neuronid mPTP avanemisele ja Ca²⁺ akumulatsioonile (Quintanilla ja Johnson, 2009).

Lisaks pärsib mHTT transkriptsioonifaktori PGC-1 α funktsiooni, mis on vajalik mitokondriaalse biogeneesi ja antioksidatiivse kaitse regulatsiooniks (Cui *et al.*, 2006). PGC-

1 α ekspressioonitaseme langus põhjustab vähenenud ATP-sünteesi ja neuronite vastupanuvõimet oksüdatiivsele stressile (Gines *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2006).

Varajased metaboolsed häired on tuvastatavad juba presümptomaatilistes HD geenikandjates, olles haiguse varajased biomarkerid ning viidates sellele, et mitokondriaalne väärtalitlus võib olla oluline mehhanism haiguse algatamises (Kuwert *et al.*, 1990; Jenkins *et al.*, 1998; Tabrizi *et al.*, 2009).

1.4. HTT ja aksonaalne transport

1.4.1. Retrograadne ja anterograadne transport neuronites

Neuronid on tugevalt polariseeritud rakud, mis sõltuvad eluspüsimiseks ja funktsioneerimiseks keerulistest rakusisestest transpordimehhanismidest, mis võimaldavad organelide, valkude ja RNA-de efektiivset liikumist rakukeha ja aksoni tipu vahel (Hirokawa ja Takemura, 2005; Guillaud *et al.*, 2020). Mikrotorukestel põhinev transport toimub kahes suunas: anterograadne transport viib koormad rakukehast aksonaalse terminali poole, retrograadne transport aga aksonaalsest terminalist rakukeha suunas (Colin *et al.*, 2008).

Anterograadse transpordi mootorvalkudeks on kinesiinid, mis liigitatakse vastavalt nende mehhanilistele omadustele kolme perekonda: kinesiin-1, -2 ja -3 (Vale *et al.*, 1985; Gicking *et al.*, 2022). Kinesiinid seonduvad koormaga kas otse või adaptervalgu vahendusel ning liiguvad mikrotorukese pluss-otsa suunas, kandes sünteesitud valke, lipiide ja organelle rakukehast eemale (Vale *et al.*, 1985; Gicking *et al.*, 2022).

Retrograadset transporti viib läbi tsütoplasmaatiline düneiin, mis tagab koormate liikumise mikrotorukeste miinus-otsa suunas (Paschal *et al.*, 1987). Düneiini valgukompleks koosneb kahest raskest ahelast ja mitmest abivalgust, sealhulgas vaheahelast, kergest vaheahelast ning kolmest kergest ahelast: LC8, Tctex1 ja *roadblock 1* (DYNLRB1 – düneiini kerge ahel *roadblock 1*) (Paschal *et al.*, 1987; Vallee *et al.*, 1988; King *et al.*, 1996a; King *et al.*, 1996b; Nikulina *et al.*, 2004). Mittekatalüütilised subühikud, kaasaarvatud DYNLRB1, on olulised düneiini valgukompleksi struktuuri ja stabiilsuse tagamisel, mis on vajalik, et düneiin saaks seonduda koormate ja adaptervalkudega (Trokter *et al.*, 2012).

Transpordikomplekside täpse funktsioneerimise tagavad mitmed adapter- ja *scaffolding*-valgud, nagu JIP1, JIP3, dünaktiin, HTT ja HAP1 (HAP1 – huntingtiiniga seonduv valk 1; ingl. *Huntingtin-Associated Protein 1*) (Fu ja Holzbaur, 2014; Prowse *et al.*, 2025). HTT vahendab interaktsioone erinevate mootor- ja adaptervalkude ning rakuorganellide vahel (Prowse *et al.*,

2025). HTT seondub düneiini vaheahelaga ning moodustab koos HAP1 ja teiste adaptervalkudega komplekse, tagades aksonaalse transpordi spetsiifilisuse ja koordineerituse (Engelender *et al.*, 1997; Gauthier *et al.*, 2004; Caviston *et al.*, 2007; Colin *et al.*, 2008). HTT-HAP1 kompleksi kaudu toimub nii retrograadse kui anterograadse transpordi regulatsioon, kaasates kas kinesiin- või düneiinmootoreid ning osaledes erinevate koormate, nagu amüloidprekursorvalgu (APP – ingl. *Amyloid Precursor Protein*), BDNF-i vesiikulite, mitokondrite, endosoomide ja autofagosoomide transpordis (Colin *et al.*, 2008; Prowse *et al.*, 2025). HTT on ainulaadne oma võime poolest vahetada koormat mikrotorukestelt aktiini filamentide peale, tegutsedes aksonaalses transpordis keskse regulaatorina (Prowse *et al.*, 2025).

1.4.2. HAP1

Huntingtiniga seonduv valk 1 (HAP1 – ingl. *Huntingtin-Associated Protein 1*) on üks olulisemaid adaptervalke neuronites, mis seondub HTT-ga ning osaleb vesikulaartranspordis, retseptorite ringluses ja signaaliülekandes (Li *et al.*, 1995; Wu ja Zhou, 2009; Zhao *et al.*, 2022). Oluline on märkida, et HAP1 seondumisafiinsus sõltub polüQ järjestuse pikkusest, seondudes tugevamini just mutantse HTT-ga (Li *et al.*, 1995; Metzger *et al.*, 2008). Lisaks HTT-le, seondub HAP1 ka paljude teiste valkudega, sealhulgas KLC (kinesiini kerge ahel; ingl. *Kinesin Light Chain*), dünaktiin p150^{Glued} ja inositol-1,4,5-trifosfaadi retseptor 1 (IP3R1) (Engelender *et al.*, 1997; McGuire *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2008).

Rakusiseselt paikneb HAP1 peamiselt neuronite tsütoplasmas, sealhulgas aksonites ja dendriitides, kus ta seondub mikrotorukeste, mikrofilamentide ja erinevate membraansete rakuorganellidega, nagu mitokondrid, tsütoplasmaõrgustik, lüsoosomid ja sünaptilised vesiikulid (Li *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2014; Gutekunst *et al.*, 1998). HAP1 ja HTT omavad sarnast rakusisest jaotust, mis viitab nende koostööle rakusiseses transpordis (Li *et al.*, 1998; Gauthier *et al.*, 2004).

HAP1 interakteerub HTT ning mootorvalkudega, nagu kinesiin-1 ja dünaktiini subühik p150^{Glued}, osaledes seeläbi anterograadses ja retrograadses transpordis mikrotorukestel (Deacon *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2004). Seda mehhanismi on kirjeldatud BDNF-i anterograadses transpordis, mis sõltub otseselt HTT-HAP1-p150^{Glued} kompleksist (Block-Galarza *et al.*, 1997; Engelender *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1995, 1998; Schroer, 1996; Gauthier *et al.*, 2004). HAP1 ja HTT osalevad kortikaalsetes neuronites ka BDNF-i mRNA transpordis ning häired selles

funktsioonis võivad oluliselt mõjutada BDNF-i kättesaadavust ja neuronite elumust (Yu *et al.*, 2018).

Kui HTT või HAP1 funktsioon on häiritud, siis aeglustub aksonaalne transport ja sageneb vesiikulite peatumine, nagu on näidatud nii HTT kui HAP1 puudulikkusega mudelites (Gauthier *et al.*, 2004; Twelvetrees *et al.*, 2010). Sarnast mehhanismi on näidatud HD *knock-in* hiiremutelites, mille tulemusel oli kortikaalsetes neuronites BDNF-i vesiikulite transport aeglustunud ja BDNF-i vabastamine häiritud, viidates sellele, et transportmehhanismide häired võivad olla üheks HD patogeneesi aluseks (Yu *et al.*, 2018).

Rakukultuurides on näidatud, et HAP1A isovormi üleekspressioon põhjustab STB-de (ingl. *Stigmoid Body*) teket, mis on tsütoplasmaatilised, mikrotorukestest moodustunud struktuurid (Fujinaga *et al.*, 2009; Gauthier *et al.*, 2004). STB-de moodustumine on omane just HAP1A isovormile, samas kui HAP1B jaotus tsütoplasmas on hajusam (Gauthier *et al.*, 2004). STB-del arvatakse olevat kaitsev funktsioon pikenenud polyQ järjestuse toksilisuse ja apoptoosi soodustavate omaduste vastu (Fujinaga *et al.*, 2011).

Arvestades, et HAP1 vahendab HTT-ga seotud transpordifunktsioone, vesikulaartransporti ja kaitseb rakke mHTT toksiliste mõjude eest võib järeldada, et ta on oluline komponent neuronite eluvõime ja neuriitide kasvu säilitamisel.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalne osa keskendub mutantse huntingtiini (mHTT) mõjudele primaarses kortikaalses neuronikultuuris, eesmärgiga paremini iseloomustada selle neurotoksilisust ning hinnata võimalikke kaitsemehhanisme. Kuigi mHTT-d on varasemates uuringutes seostatud neuronite elumust ja morfoloogiat kahjustavate protsessidega, ei ole nende mõjude ulatus ning nende seos rakusiseste transportmehhanismide häiretega täiesti selge. Samuti on ebaselge, kas teatud valkude, sealhulgas düneiini kergel ahelat kodeeriva *DYNLRB1* valgu *roadblock 1* (DYNLRB1) üleekspressioon võiks mHTT-st tulenevat toksilisust leevendada.

Eelnevates töödes on näidatud, et mHTT võib häirida aksonaalset transporti ja mõjutada neuronite morfoloogiat, kuid sellest tulenevate aksonite ja dendriitide kahjutuste ulatus ei ole täielikult selge. Käesolev töö seob varasemad teadmised mHTT toksilisusest, et uurida, kas mHTT mõjutab neuriitide kasvu ning kas DYNLRB1 üleekspressioonil on kaitsev toime mHTT põhjustatud kahjustuste vastu. Lisaks analüüsitakse, kas *DYNLRB1* suunamine mitokondrile FIS1 abil mõjutab selle toimet võrreldes tsütoplasmaatilise paiknemisega.

Töö raames käsitletakse järgmisi uurimisküsimusi:

1. Millist mõju avaldab mHTT neuronite elumusele ja jätkete kasvule primaarsetes kortikaalsetes neuronites?
2. Kas DYNLRB1 üleekspressioon mõjutab neuronite elumust ja kas sellel on kaitsev toime mHTT põhjustatud toksilisuse vastu?
3. Kas DYNLRB1 suunamine mitokondrile (liites FIS1-iga) mõjutab selle toimet neuronitele?

Bakalaureusetöö eesmärgid on:

- 1) Kirjeldada mHTT mõju neuronite elumusele ja jätkete kasvule roti primaarses kortikaalses neuronikultuuris.
- 2) Hinnata DYNLRB1 üleekspressiooni võimalikku kaitsvat toimet mHTT indutseeritud toksilisuse vastu.
- 3) Selgitada, kas mitokondrile suunatud *DYNLRB1* erineb oma mõjus tsütoplasmaatilisest *DYNLRB1*-st.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Primaarsete kortikaalsete neuronite isoleerimine ja kultiveerimine

Roti kortikaalsete neuronite primaarkultuurid valmistas kogenud laboritehnik. Neuronid isoleeriti Wistar rottide suurajukoorest, kasutades kuni P2 (48 tundi pärast sündi) vanuseid loomi. Kultuuri tegemisel kasutavate katseloomade arv varieerus sõltuvalt kättesaadavusest; orienteeruvalt kasutati viie looma ajusid 100 ml rakususpensiooni valmistamiseks tihedusega $0,5 \times 10^6$ rakku/ml kohta.

Enne dissektsiooni steriliseeriti katteklaasid eetri ja etanooli (1:1) segus leotamise ja leegis põletamisega. Seejärel kaeti need 0,01% polü-D-lüsiiniga (PDL) vähemalt tunniks ajaks ja loputati bidestillieritud veega. Petri tassid (35mm läbimõõdu ja Ø 15mm klaasist keskosaga konfokaaltassid) kaeti PDL-iga vähemalt 30 minutiks ja jäeti kuivama.

Kortikaalsete neuronite isoleerimiseks suurajukoorest valmistati järgmised lahused:

1. Krebs'i lahus: 3,945 g NaCl (135 mM), 0,1865 g KCl (5 mM), 0,027 g KH_2PO_4 (0,5 mM), 0,1235 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mM), 2,38 g HEPES (20 mM), 1,3 g glükoosi 500 ml destilleeritud vees; pH viidi NaOH-d kasutades 7,4 juurde. Lahus steriliseeriti läbi 0,2 μm filtri ja säilitati 4 °C juures.
2. Magneesiumsulfaatlahus: 3,82 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 ml destilleeritud vees. Lahus steriliseeriti läbi 0,2 μm filtri ja säilitati 4 °C juures.
3. Kaltsiumkloriidlahus: 0,18 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 ml destilleeritud vees. Lahus steriliseeriti läbi 0,2 μm filtri ja säilitati 4 °C juures.

Nende baasil valmistati samal päeval viis töötluslahust (markeeritud A–E), mille komponendid on toodud Tabelis 1.

Eelnevalt eutaniseeritud (dekapitatsioon) rotipoegade ajude dissektsioon viidi läbi laminaarkapis (Jouan MSC.12 G3 2XE; II klassi bioloogiline ohutus) steriilsetes tingimustes. Pärast suurajude eemaldamist, asetati need esimesse dissektsiooninõusse koos jääkülma A-lahusega. Ajukoored eraldati A-lahusega niisutatud filtripaberi peal ja tõsteti teise A-lahusega dissektsiooninõusse. Ajukoored puhastati visuaalse kontrolli all, eemaldati õhuke veresoonterikas aju parenhüümi kattev pehme kelme (*pia mater*) ja siirdati kolmandasse A-lahusega dissektsiooninõusse. Seejärel tükeldati korteks koeviilutaja (McIlwain™) abil 400 μm suurusteks tükkideks ning viidi 50 ml steriilsesse Falcon-tuubi, täites see A-lahusega 10 milliliitri. Tuubi sisu loksutati õrnalt ja tsentrifuugiti 1–2 minuti vältel $167,7 \times g$.

Tabel 1. Kortikaalsete neuronite isoleerimiseks kasutatud lahused

Lahuse tähis	Lahusekomponendid	Kogus
A	Krebs'i lahus	100 ml
	BSA (veise seerumalbumiin)	0,3 g
	Magneesiumsulfaatlahus	0,3 ml
B	Lahus A	12,5 ml
	Trüpsiin	10 mg
C	Lahus A	15 ml
	Trüpsiini inhibiitor	7,8 mg
	DNaas	1,2 mg
	Magneesiumsulfaatlahus	0,15 ml
D	Lahus A	10,5 ml
	Lahus C	2 ml
E	Lahus A	12,5 ml
	Magneesiumsulfaatlahus	0,1 ml
	Kaltsiumkloriidlahus	0,1 ml

Pärast supernatandi eemaldamist lisati 10 ml B-lahust ja inkubeeriti 10 minutit 37 °C veevannis (Grant GD100). Seejärel lisati 10 ml lahust D, millele järgnes teine tsentrifuugimine 3,5 minuti jooksul 241,3 ×g juures. Supernatant eemaldati ning sade resuspendeeriti 5 ml-s C-lahuses. Rakumass homogeniseeriti klaaspipetiga ning suspensioon jäeti 5 minutiks toatemperatuuril seisma ning saadud supernatant koguti uude Falcon-tuubi. Tritureerimist korrati ülejäänud sademega, kasutades kuni 5 ml C-lahust. Saadud supernatant viidi eelmisega kokku.

Rakumass lahjendati E-lahusega (1:1), segati ettevaatlikult ning tsentrifuugiti 5 minutit 167,7–202,8 ×g juures. Rakud suspendeeriti 50 ml eelsoojendatud 1× Neurobasal-A Mediumis™ (Thermo Fisher Scientific), millele oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS – ingl. *Fetal Bovine Serum*), B-27™ (Thermo Fisher Scientific) lisand (optimeeritud seerumivaba lisand, mis toetab närvirakkude eluvõimet ja kasvu), 20 mM L-glutamiini (GlutaMAX™) ja 1 ml gentamütsiini.

Lõpliku raku suspensiooni tihedus määrati Bürkeri hemotsütomeetria loenduskambris, kus rakutiheduse määramiseks kasutati valemit $x \times 500 \times 1000$ (x – kambris loendatud rakkude arv), ning lahjendati seejärel kontsentratsioonini $0,5 \times 10^6$ rakku/ml kohta. Igale eelnevalt PDL-

iga töödeldud ja sügavkülmas säilitatud Petri tassile külvati 2 ml rakususpensiooni, et tagada rakkude adhesioon substraadile. Ligikaudu 2–3 tundi pärast külvamist, kui rakud olid substraadile kinnitunud, vahetati kasvukeskkonda.

Rakukultuure kasvatati 37 °C juures, 5,0% CO₂ ja 0% suhtelise õhuniiskusega inkubaatoris (New Brunswick Galaxy 170R). Kasvukeskkonnana kasutati 1× Neurobasal-A Mediumi, millele oli lisatud B-27 lisand, GlutaMAX ning 10% FBS-i. Lahus ei sisaldanud L-glutamiini ega fenoolpunast.

2.2.2. Primaarsete kortikaalsete neuronite transfektsioon

Primaarsete kortikaalsete neuronite transfektsioon viidi enamasti läbi kolmandal kultiveerimispäeval (DIV3), kasutades Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) vahendatud DNA viimist rakku. Kõik protseduurid teostati eelnevalt UV-steriliseeritud laminaarkapis (Thermo Scientific MSC-Advantage™ või Jouan, MSC.12 G3 2XE), kus kõik vajalikud vahendid ja reagensid olid desinfitseeritud, et tagada steriilsed tingimused.

Transfektsioonisegude ettevalmistamiseks kasutati Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific) Reduced Serum Mediumi, mille abil viidi läbi Lipofectamine'i ja DNA lahjendused. Lipofectamine 2000 segati lühidalt vorteksil enne kasutamist. Iga eksperimentaalse rühma jaoks valmistati individuaalsed 0,5 ml Eppendorfi tuubid, kuhu lisati katseskeemist tuleneva protokollil alusel eelnevalt määratud koguses Opti-MEM-i ja plasmiidset-DNA-d. Lisaks valmistati MasterMix, mis sisaldas katserühmade ühiseid komponente, sealhulgas neuronispetsiifilist fluorestsentsmarkerit, Lipofectamine'i ja Opti-MEM-i. Transfekteeritud neuronite tuvastamiseks kasutati fluorestseeruvaid reporterplasmide: pAAV-hSyn-RFP (RFP; ergastuslainepikkus ~555 nm, emissioon ~584 nm) ja pAAV-hSyn1-mNeonGreen (mNeonGreen; ergastuslainepikkus ~506 nm, emissioon ~517 nm).

Kasutatud plasmiidid on toodud Tabelis 2. Plasmiidide, markerite ja Lipofectamine'i proportsioonid varieerusid sõltuvalt katsegrupist ning põhinesid eelnevalt optimeeritud transfektsiooniskeemidel (Tabel 3).

Pärast komponentide segamist inkubeeriti Eppendorfi tuubides olevaid transfektsioonisegusid 15 minutit toatemperatuuril, et võimaldada Lipofectamine-DNA komplekside moodustumist. Seejärel lisati igasse tuubi võrdne kogus MasterMix'i ning inkubeeriti taas 10–25 minutit.

Tabel 2. Kortikaalsete neuronite transfektsioonil kasutatud plasmiidid

Plasmiid	Kirjeldus	Konstruktsioon	Kasutus	Päritolu, viide
pHM6-Q23	Huntingtiin 23 CAG-kordusega	HA-märgis, Q23	HTT ekspressioon neuronites	Addgene #40263
pHM6-Q74	Huntingtiin (mutantne) 74 CAG-kordusega	HA-märgis, Q74	mHTT ekspressioon neuronites	Addgene #40264
FIS1-DYNLRB1	FIS1-ga mitokondri membraanile suunatud <i>DYNLRB1</i>	FIS1-DYNLRB1	<i>Roadblock 1</i> protektiivse mõju testimine	Süntetiline geen (Thermo)
DYNLRB1	Inimese düneiini kerge ahel, (<i>roadblock 1</i>)	Myc-DDK märgis	<i>Roadblock 1</i> protektiivse mõju testimine	Origene RC200051
pcDNA3-VN	Kontrollplasmiid, mis kodeerib mitte-fluorestseeruvat Venus-konstrukti	pcDNA <i>backbone</i>	Tühi vektor DNA koguse tasakaalustamiseks	Kingitus Dr T.- F. Tsai'lt
pAAV-hSyn-RFP	Neuronispetsiifiline RFP marker	Inimese sünapsiini promootor (hSyn), DsRed-Express	Neuronite visualiseerimine	Addgene #22907 (Edward Callaway)
pAAV-hSyn1-mNeonGreen	Neuronispetsiifiline mNeonGreen marker	hSyn1 promootor, mNeonGreen	Neuronite visualiseerimine	Addgene #99135 (Viviana Gradinaru)

Transfektsiooni läbiviimiseks toodi rakukultuurid inkubaatorist laminaari, eemaldati ettevaatlikult söötme keskkond, vältides rakkude eemaldamist nõu keskelt, kuhu neuronid olid kinnitunud, ning lisati kiiresti eelvalmistatud transfektsioonisegud, vältimaks rakkude kuivamist. Koekultuuritassid asetati koheselt tagasi inkubaatorisse (37 °C, 5,0% CO₂), kus neid inkubeeriti 2,5 kuni 3 tundi.

Pärast inkubatsiooniperioodi lisati igale kultuurinõule 2 ml eelsoojendatud Neurobasal-A Mediumi, mis sisaldas B-27 lisandit ja GlutaMAX-i, et toetada neuronite edasist kasvamist ja elujõulisust. Kultuure kasvatati edasi standardsetes tingimustes (37 °C, 5,0% CO₂), kuni viidi läbi edasised analüüsid.

Tabel 3. Transfektsiooniskeemid

Grupp	HTT konstrukt	Koekspresseeritud vektor	Fluorestsentsmarker	Märkused
1	pHM6-Q23	pcDNA3-VN	pAAV-hSyn-RFP	HTT kontroll
2	pHM6-Q74	pcDNA3-VN	pAAV-hSyn-RFP	mHTT kontroll
3	pHM6-Q23	FIS1-DYNLRB1	pAAV-hSyn-RFP	HTT + <i>roadblock 1</i>
4	pHM6-Q74	FIS1-DYNLRB1	pAAV-hSyn-RFP	mHTT + <i>roadblock 1</i>
5	pHM6-Q23	DYNLRB1	pAAV-hSyn-RFP	HTT + <i>roadblock 1</i>
6	pHM6-Q74	DYNLRB1	pAAV-hSyn-RFP	mHTT + <i>roadblock 1</i>
7	pHM6-Q23	–	pAAV-hSyn1-mNeonGreen	HTT neuronaaljätkede analüüs
8	pHM6-Q74	–	pAAV-hSyn1-mNeonGreen	mHTT neuronaaljätkede analüüs
9	pHM6-Q23	–	pAAV-hSyn-RFP	HTT neuronaaljätkede analüüs
10	pHM6-Q74	–	pAAV-hSyn-RFP	mHTT neuronaaljätkede analüüs

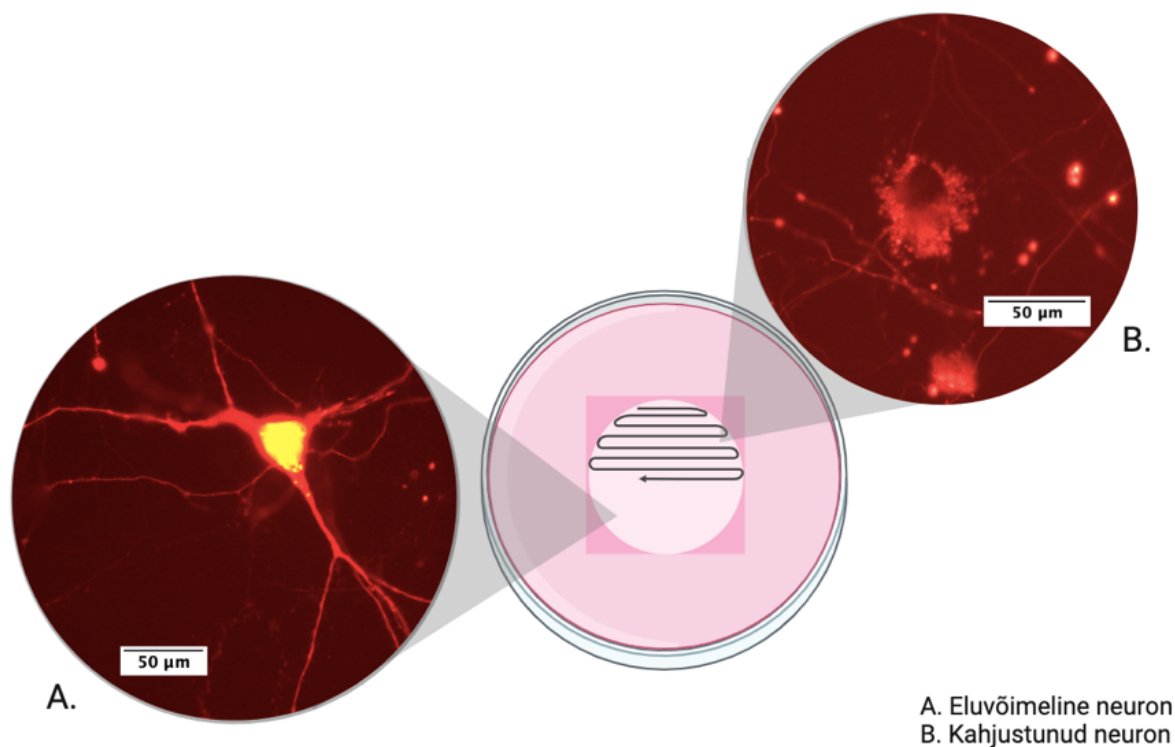
2.2.3. Kortikaalsete neuronite elumuse analüüs

Transfekteeritud primaarsete kortikaalsete neuronite elumust hinnati fluorestsentsmikroskoopia abil, lähtudes neuronite morfoloogilistest tunnustest ja fluorestsentsmarkeri ekspressioonist. Eluvõimelisteks loeti neuronid, millel oli ümar või ovaalne, ilma fragmentatiivsete tunnusteta rakukeha (joonis 2A), ning millel oli selgelt tuvastatav fluorestsentsmärgis (RFP või GFP). Elusrakkude hulka ei arvatud fragmenteerunud, kondenseerunud või muul viisil kahjustatud neuroneid (joonis 2B).

Mikroskoopiline hindamine viidi läbi fluorestsentsmikroskoobiga Olympus IX70. Objektiivi valik sõltus rakukultuuri tihedusest: kasutati kas 40× või 20× objektiivi, vajadusel koos 1,5× lisasuurendusega. RFP või GFP fluorestsentsfilter valiti vastavalt ekspresseeritud markerile.

Neuronite loendamisel kasutati järgmist skeemi (joonis 2): iga koekultuuritassi kohta loendati manuaalselt mikroskoobi all kokku kõik elujõulised neuronid 50-s vaateväljas. Loendust alustati koekultuuri tassi ülemisest servast ja liiguti horisontaalselt järjestikuste vaateväljade

kaupa teise servani, pöördudes seejärel allapoole järgmisesse ritta ja korrates liikumismustrit, kuni 50 vaatevälja kohta olid andmed kogutud. Selline trajektoor tagas pinna ühtlase katvuse ja minimeeris valikupõhist kallutatust.



Joonis 2. Transfekteeritud primaarsete kortikaalsete neuronite elumuse analüüs. (A) Fluorestsentsmikroskoopia pilt eluvõimelisest neuronist (fluorestsentsmarker RFP), millel on selgelt tuvastatav degeneratiivsete tunnusteta rakukeha ja jätked. (B) Kahjustunud neuron, mille rakukeha on fragmenteerunud ja fluorestsentssignaal nõrgenenud. Keskel: koekultuuri tassil loendati kokku 50-s vaateväljas olevad eluvõimelised neuronid, liikudes siksakilise mustri alusel ühest servast teise (nool), et vältida valikupõhist kallutatust ja tagada kultuuri üldine esindatus. Mõõtlõik: 50 μm.

Tulemused esitati iga katsegrupi kohta kui eluvõimeliste neuronite keskmine ühe tassi kohta \pm standardhälve (SEM). Elumuse analüüsi katsed viidi läbi kahes sõltumatus katseseerias, kus iga katsegrupp sisaldas nelja erinevat kultuuritassi. Analüüsid teostati igale katserühmale eraldi, ning statistiline võrdlus viidi läbi vastavalt alajaotuses 2.2.5 kirjeldatud statistilistele meetoditele.

2.2.4. Neuronaaljätkede analüüs

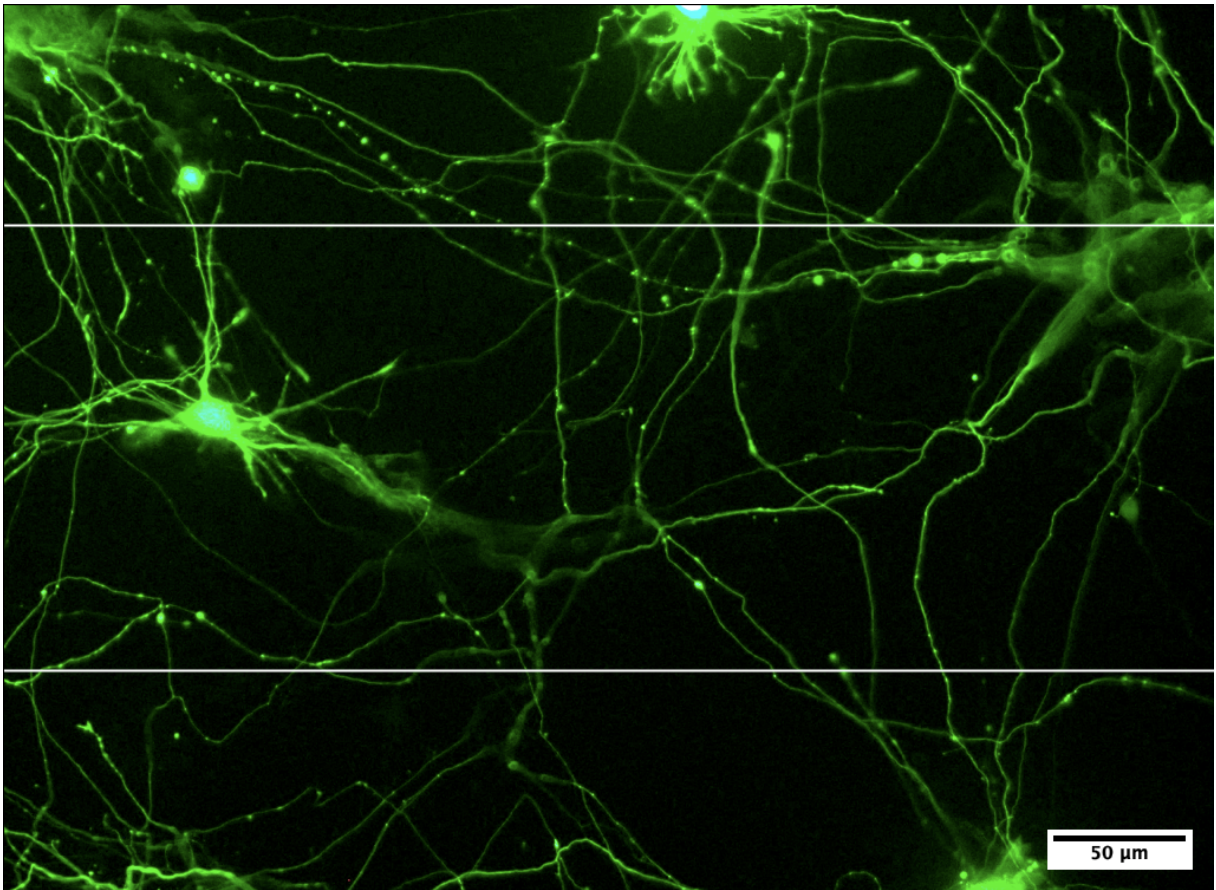
Neuronaaljätkede analüüsi eesmärgiks oli hinnata normaalse ja mutantse HTT mõju primaarsete kortikaalsete neuronite jätkede arengule. Selleks määrati kvantitatiivselt jätkede ja eluvõimeliste neuronite arvu suhe, mis kajastab keskmist jätkede hulka ühe neuroni kohta (*neurites per neuron*).

Analüüs tugines eelnevalt fluorestsentsmikroskoopia abil jäädvustatud piltidele, mis olid tehtud Olympus DP75 kaameraga varustatud mikroskoobiga Olympus IX70, kasutades olenevalt rakukultuuri tihedusele kas 20× või 40× objektiivi, vajadusel koos 1,5× lisasuurendusega. 40× objektiivi kasutati juhul, kui 30× suurendusega oli vaateväljades olevate neuronite hulk 10 või enam. Neuronite märgistamiseks kasutati neuronispetsiifilisi fluorestsentsmarkereid pAAV-hSyn-RFP või pAAV-hSyn1-mNeonGreen (Tabel 2).

Igast koekultuuritassist jäädvustati 10 vaatevälja, mida hiljem kasutati kvantitatiivsete andmete kogumiseks. Pildistamine algas horisontaalsuunas koekultuuri tassi vasakust servast, liikudes paremale. Vaateväljade vahel liigutati mikroskoobi preparaadilauda ebaregulaarse, juhuslikult valitud vahemaa võrra, kuni oli kokku pildistatud vaateväljadest 10 fotot. Juhul, kui mõned vaateväljad tuli analüüsist välja jätta, näiteks ebaühtlase või hõreda kultuuri korral, jätkati vajadusel andmete kogumist ka vertikaalsuunas ülevalt alla.

Pilditöötlus ja kvantitatiivne analüüs viidi läbi ImageJ tarkvara abil. Kõigepealt korrigeeriti kontrastsust ja heledust, et kõik struktuursed osad oleksid nähtavad. Seejärel lisati igale pildile kaks horisontaalset joont, mis jagasid vaatevälja kolmeks osaks (joonis 3). Kõik neuronid, mille rakukeha oli pildil selgelt jälgitav ja ilma degeneratiivsete tunnusteta, loendati manuaalselt. Jätkede kvantifitseerimiseks loendati kokku kõik punktid, kus oli toimunud jätkede lõikumine eelnevalt joonistatud horisontaalsete joontega. Selline lähenemine võimaldas tagada objektiivse ja korratava jätkede arvu hindamise.

Iga pildi kohta arvutati kahe väärtuse suhe: horisontaaljoontega lõikumised (mis kaudselt näitab jätkede hulka) jagatuna kõigi pildil olevate eluvõimeliste neuronite arvuga. Kuna andmeid ei kogutud üksikrakkude, vaid vaateväljade kaupa, käsitleti igat pilti ühe andmepunktina. Lõplikud tulemused arvutati koekultuuritassi tasemel, võttes 10 vaatevälja keskmise. See võimaldas igat tassi käsitleda ühe sõltumatu mõõtmisüksusena ($n = \text{tass}$), mis välistas samas tassis esinevate ruumiliste erinevuste mõju ning võimaldas tulemusi statistiliselt võrrelda sõltumatute replikatsioonidena.



Joonis 3. Neuronaaljätete analüüsiks kasutatud meetodika. Fluorestsentsmikroskoopia pilt primaarsetest kortikaalsetest neuronitest (markeriks mNeonGreen), millele on lisatud kaks valget horisontaalset joont, et jagada vaateväli kolmeks osaks. Horisontaaljooned paigutati pildi keskele nii, et ülemise joone kaugus (ühikuks 1 piksel) pildi ülemisest servast oleks võrdne alumise joone kaugusest pildi alumisest servast. Neuronite rakukehad loendati kogu vaatevälja ulatuses, samas kui jätkete puhul loendati punktid, kus toimus alumise või ülemise horisontaaljoonega lõikumine. Mõõtlõik: 50 μm .

Esmalt viidi läbi kolm sõltumatut katset, kus igas katsegrupis oli vähemalt 4 neuronaalset koekultuuritassi. Kogutud andmete põhjal teostati esmane statistiline analüüs, millest ilmselt, et saadud tulemused olid vastuolus samas laboris varem läbiviidud katsete, mistõttu otsustati katset korrata mitmes täiendavas korduses. Lõpuks teostati neuronaaljätete kasvu analüüs kuue erineva katsekorduse käigus kogutud andmete põhjal.

2.2.5. Andmetöötlus ja statistiline analüüs

Statistiline analüüs viidi läbi GraphPad Prism 10 tarkvaraga. Toorandmed koguti ja salvestati tabelarvutusprogrammi Microsoft Excel (16.89.1), kus teostati esmane arvutuslik kokkuvõte: keskvaartused, mediaanid, standardvead (SE), varieeruvuskoeffitsiendid (CV%) ning andmete esindatus koekultuuritassi tasemel. Tulemuste normaliseerimiseks jagati iga kultuuritassi

väärtus vastava eksperimendi Q23 kontrollgrupi keskmise väärtusega. Kõik andmed on esitatud kujul keskväärtus \pm SEM.

Andmete normaaljaotuse kontrollimiseks kasutati D'Agostino-Pearsoni *omnibus* testi. Kahe grupi dispersioonide võrdsust hinnati F-testiga ning rohkem kui kahe grupi korral Brown-Forsythe'i testiga. Võimalike erindväärtuste olemasolu kontrolliti ROUT-meetodiga ($Q = 1\%$); andmestikus ei esinenud ühtegi erindväärtust.

Elumuse analüüsi puhul viidi läbi kaks sõltumatut katseseeriat. Esimeses katsetüübis oli kuus eksperimentaalgruppi, millest igas neli koekultuuritassi (kokku 48 tassi); teises katsetüübis oli neli gruppi nelja tassiga (kokku 32 tassi). Iga koekultuuritassi kohta arvutati eluvõimeliste neuronite keskväärtus ning normaliseeriti see Q23 grupi kontrollväärtuse suhtes. Kuna eksperimentaalrühmi oli rohkem kui kaks, kasutati ühepoolset ANOVA-dispersioonianalüüsi. Juhul kui testist tulenev p-väärtus oli statistiliselt oluline, viidi läbi ka Šidaki *post-hoc* mitmese võrdluse testi. Olulisuse nivooks valiti $\alpha = 0,05$.

Jätkete kasvu analüüsis oli igas katses kaks gruppi (Q23 ja Q74), kummaski neli koekultuuritassi, välja arvatud esimesel katsekordusel, kus kummaski grupis oli kuus koekultuuritassi. Katsed viidi läbi kuues sõltumatus korduses (kokku 52 tassi). Iga koekultuuritassi kohta arvutati jätkete ja neuronite suhtarv "*neurites per neuron*" (neuriidid / neuronid) ning väärtused normaliseeriti Q23 grupi keskväärtuse suhtes. Kuna andmed olid normaaljaotusega, kasutati grupivõrdlusteks kahepoolseid sõltumatute valimite t-teste või Welch'i korrigeeritud t-teste, sõltuvalt sellest, kas dispersioonid olid võrdsed.

Et välistada koondanalüüsi tulemuste tundlikkust üksikute katsete suhtes ning hinnata tulemuste korratavust, viidi läbi täiendav võrdlus iga katse kohta eraldi. Igas katses kontrolliti rühmasiseste andmete normaaljaotuvust Shapiro–Wilki testiga. Kui mõlemas rühmas (HTT ja mHTT) oli $p > 0,05$, kasutati Welch'i t-testi, mis ei eelda variatsioonide võrdsust. Kui vähemalt ühe rühma puhul oli normaaljaotuse eeldus täitmata, kasutati kahepoolset Mann–Whitney U testi. Selline analüüsimeetod põhineb labori varasemal praktikal (Liiv *et al* 2024).

Peatükkides 2.3.1. ja 2.3.2. olevatel graafikutel on esitatud individuaalsed andmepunktid koos keskväärtuse ja SEM-iga. Statistiliselt olulised erinevused on välja toodud vastavate p-väärtustega. P-väärtused, mis ei osutunud statistiliselt oluliseks, jäeti graafikutel esitamata. Kõiki töö kontekstis ja tulemuste tõlgendamisel olulisi p-väärtusi mainitakse vastavas tekstiosas. Statistiliselt olulisena käsitleti p-väärtust $< 0,05$ ($\alpha = 0,05$).

2.3. Tulemused

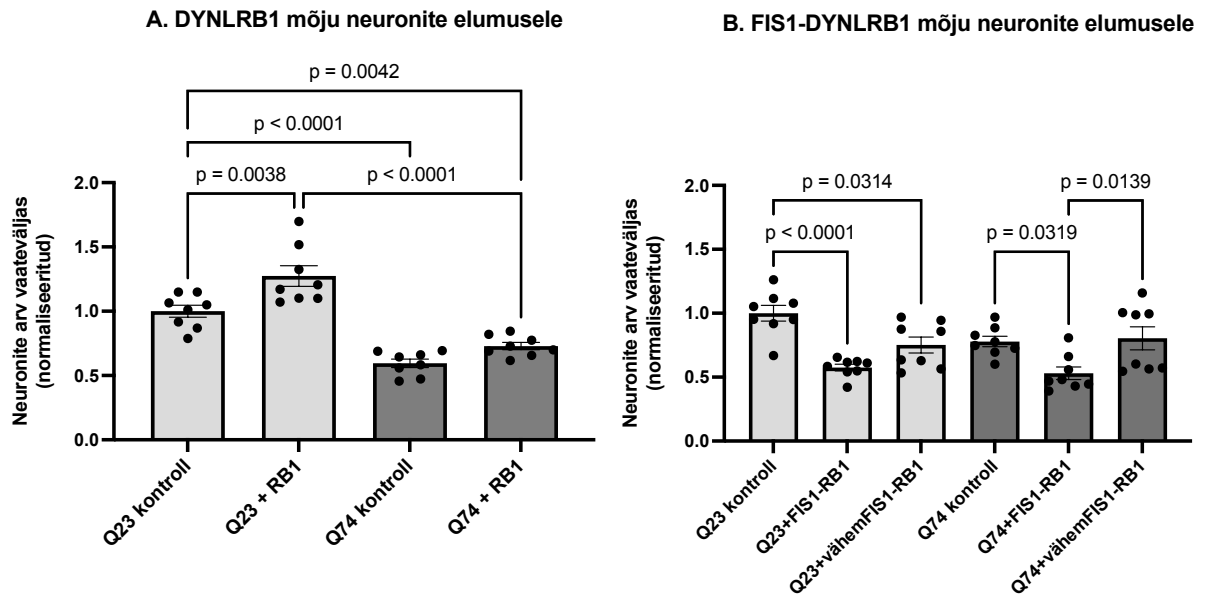
2.3.1. Neuronaalse elumuse analüüs

Neuronite elumust hinnati kahes eraldiseisvas katsetüübis, milles uuriti *roadblocki* (DYNLRB1 – düneiini kerge ahel *roadblock 1*) võimalikku kaitsvat toimet neuronitele ning selle mõju sõltumist DYNLRB1 rakusisesest paiknemisest. Mõlemal juhul kasutati normaalse (Q23) ja mutantse (Q74) huntingtiini plasmiidkonstrukte. Andmed koguti fluorestsentsmikroskoopia abil, loendades kokku eluvõimeliste neuronite hulk 50 vaatevälja kohta igas kultuuritassis. Kõik väärtused normaliseeriti vastava katseseeria Q23 kontrollrühma keskväärtuse suhtes (Q23 = 1,00), et võimaldada tulemuste võrreldavust sõltumatute katsete vahel.

Esimese katsetüübi (joonis 4A) eesmärgiks oli uurida DYNLRB1-plasmiidi rakendamise iseseisvat mõju neuronite elumusele, kus DYNLRB1 paiknes vabalt tsütoplasmas. Katses võrreldi nelja rühma: Q23 kontroll, Q74 kontroll, Q23 + DYNLRB1 ja Q74 + DYNLRB1. Kõik rühmad olid esindatud kahes sõltumatus katsekorduses, kus igas rühmas oli neli koekultuuritassi.

Kõigepealt võrreldi normaalset ja mutantset HTT-d ekspresseerivate neuronite elumust, ilma täiendava manipuleerimiseta. Analüüs näitas, et HTT Q74 ekspressioon põhjustas oluliselt madalama neuronite elumuse võrreldes Q23-ga, kus Q23 rühma keskväärtus oli $1,00 \pm 0,046$ ja Q74 keskväärtus oli $0,59 \pm 0,033$ ($p < 0,0001$). Sarnane tulemus ilmnis ka eelnevalt sooritatud eraldiseisvas katses, kus Q23 rühma neuronite elumus oli $1,00 \pm 0,089$ ja Q74 rühmas $0,51 \pm 0,062$ ($n = 3$). Need tulemused kinnitavad, et mutantse HTT ekspressioon neuronites avaldab rakkudele toksilist mõju ja vähendab sellega nende elumust.

Edasi hinnati DYNLRB1 plasmiidi koekspressiooni mõju Q23 ja Q74 HTT-d ekspresseerivatele neuronitele. Statistiline analüüs näitas rühmade vahel olulist erinevust (ühefaktoriline ANOVA, $p < 0,0001$). Edasine analüüs teostati Šidáki *post-hoc* mitmese võrdluse analüüsiga. Q23 + DYNLRB1 rühma neuronite elumus ($1,27 \pm 0,080$) oli oluliselt kõrgem võrreldes Q23 kontrolliga ($p = 0,0038$; joonis 4A). Q74 + DYNLRB1 rühma elumus oli $0,73 \pm 0,028$, võrreldes Q74 kontrolliga $0,59 \pm 0,033$, kuid erinevus ei osutunud statistiliselt oluliseks (joonis 4A).



Joonis 4. *Roadblock 1* mõju kaitsva tegurina mHTT põhjustatud toksilisuse eest. (A) Neuronite elumus neljas eksperimentaalarühmas: Q23 (HTT) kontroll, Q74 (mHTT) kontroll, Q23 + (DYNL)RB1 (DYNLRB1 – düneiini kerge ahel *roadblock 1*) ning Q74 + DYNLRB1. Selles katses ei olnud *roadblock 1* (DYNLRB1) mitokondrile suunatud, vaid paiknes vabalt tsütoplasmas. (B) Neuronite elumus kuues eksperimentaalarühmas: Q23 kontroll, Q74 kontroll, Q23 + FIS1-DYNLRB1, Q74 + FIS1-DYNLRB1, Q23 + *less* FIS1-DYNLRB1 (*less* – ingl. vähem; madalam ekspressioonitase) ning Q74 + FIS1-DYNLRB1. FIS1 (mitokondriaalse fissiooni valk 1) abil suunati DYNLRB1 mitokondri välismembraani külge. Elumust hinnati fluorestsentsmikroskoopia abil, loendades eluvõimeliste neuronite arv 50 vaatevälja kohta igas koekultuuritassis. Andmed on mõlema katsetüübi puhul normaliseeritud vastava katsekorduse ja -seeria Q23 kontrollrühma keskväärtuse suhtes (Q23 = 1,00). Tulemused on esitatud keskväärtuse ± standardhälvena (SEM) kahe sõltumatu katsekorduse põhjal. Statistiline analüüs viidi läbi ühefaktorilise ANOVA ja Šidáki *post-hoc* testiga. Täpne meetodika on kirjeldatud alapeatükis 2.2.5.

Teises katseseerias (joonis 4B) testiti, kas DYNLRB1 protektiivset toimet saab mõjutada selle rakusisese paiknemise kaudu. Selleks kasutati FIS1-DYNLRB1 konstrukti, milles FIS1-mitokondriaalset paiknemist määrav järjestus suunab *roadblocki* mitokondri välimise membraani külge. Elumust hinnati kuues erinevas rühmas: Q23 kontroll, Q74 kontroll, Q23 + FIS1-DYNLRB1, Q74 + FIS1-DYNLRB1, Q23 + *less* FIS1-DYNLRB1 (*less* – ingl. vähem; madalam ekspressioonitase) ja Q74 + *less* FIS1-DYNLRB1. Sarnaselt eelmisele katsetüübile viidi see läbi kahes sõltumatus katseseerias, nelja koekultuuritassiga igas rühmas.

Statistiline analüüs näitas rühmade vahel statistiliselt olulist erinevust (ühefaktoriline ANOVA, $p < 0,0001$). Edasine analüüs Šidáki *post-hoc* testiga näitas, et FIS1-DYNLRB1 lisamisel langes neuronite elumus oluliselt nii Q23 kui ka Q74 rühmades (joonis 4B). Q23 + FIS1-DYNLRB1

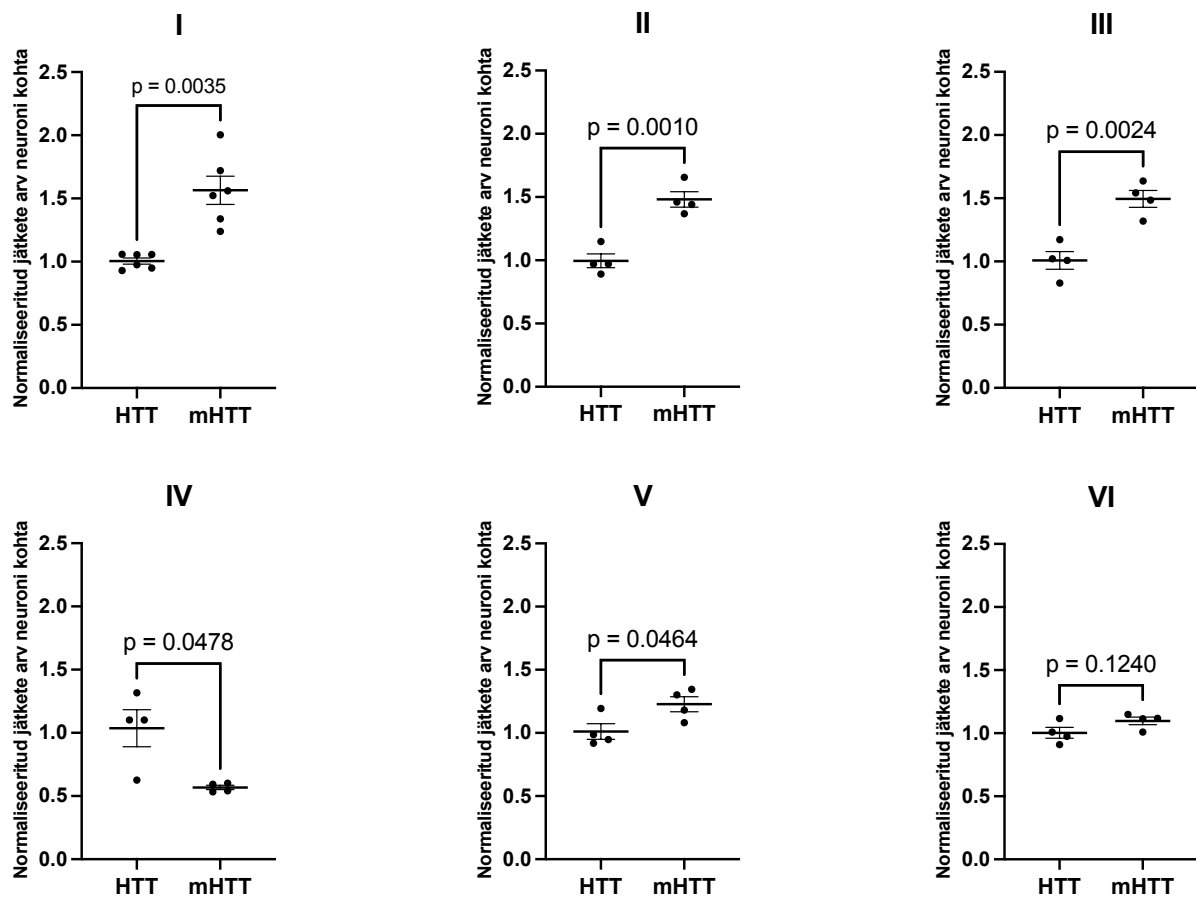
rühmas langes elumus 0,57-ni $\pm 0,026$ ($p < 0,0001$) ja Q74 + FIS1-DYNLRB1 rühmas 0,53-ni ($\pm 0,049$). Madalama FIS1-DYNLRB1 ekspressioonitaseme korral (Q23 + *less* FIS1-DYNLRB1) tõusis elumus 0,75 peale ($\pm 0,063$), kuid olles siiski statistiliselt olulises languses võrreldes kontrollrühmaga ($p = 0,0314$). Q74 rühmas tõusis madalama FIS1-DYNLRB1 ekspressioonitaseme korral elumus 0,80 peale ($\pm 0,090$), kuid võrdluses Q74 kontrollrühmaga ületas p-väärtus usaldusnivood (joonis 4B). Küll aga esines statistiliselt oluline erinevus Q74 + *less* FIS1-DYNLRB1 ja Q74 + FIS1-DYNLRB1 vahel ($p = 0,0295$), viidates sellele, et elumus on mõjutatud DYNLRB1 ekspressioonitasemest (joonis 4B).

Mõlemad katseseeriad näitavad, et DYNLRB1 mõjutab oluliselt neuronite elumust. Tsütoplasmaatiline DYNLRB1 suurendas elumust normaalset, kuid mitte mutantset HTT-d ekspresseerivates neuronites. Mitokondrile suunatud DYNLRB1 (FIS1-DYNLRB1) põhjustas vastupidiselt languse nii normaalset kui mutantset HTT-d ekspresseerivate neuronite elumuses. Madalama FIS1-DYNLRB1 ekspressioonitaseme puhul avaldus toksiline efekt väiksemal määral.

2.3.2. Neuronaaljätmete kasvu analüüs

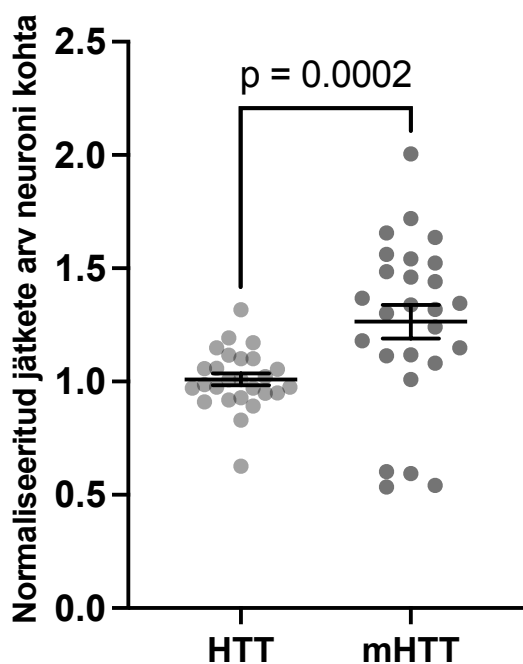
Neuronite jätmete kasvu analüüs viidi läbi kuues sõltumatus katsekorduses, et hinnata, kas mutantse huntingtiini (mHTT; Q74) ekspressioon põhjustab sagedasemat jätmete regressiooni võrreldes normaalset huntingtiini (HTT; Q23) ekspresseerivate neuronitega. Igas katsekorduses ($n = 6$) võrreldi Q23- ja Q74-huntingtiini ekspresseerivaid neuroneid, kasutades neuronite visualiseerimiseks fluorestsentsvalku RFP või mNeonGreen (Tabel 2.). Igas koekultuuritassis analüüsiti kümme vaatevälja ning arvutati jätmete ja neuronite suhe (*neurites per neuron*), mis seejärel normaliseeriti vastava eksperimendi Q23 rühma keskväärtuse suhtes ($Q23 = 1,00$), et võimaldada tulemuste võrreldavust katsekorduste vahel.

Alge plaani kohaselt viidi läbi kolm sõltumatut katset, milles igas katsegrupis oli vähemalt neli koekultuuritassi. Pärast esmast statistilist analüüsi ilmnes, et saadud tulemused olid vastuolus samas laboris varasemalt kogutud andmetega. Seetõttu otsustati eksperimente korrata mitmes täiendavas korduses, et hinnata tulemuste reprodutseeritavust ning välistada juhuslikud või meetodikast tingitud kõrvalekalded. Kokkuvõttes teostati neuronaaljätmete kasvu analüüs kuue erineva sõltumatu katsekorduse põhjal.



Joonis 5. Neuronite jätkete kasvu analüüs kuues sõltumatus katses. Iga paneel (I–VI) kujutab ühte jätkete kasvu analüüsi katse kordust, kus võrreldi normaalset huntingtiin (HTT; Q23) ja mutantset huntingtiini (mHTT; Q74) ekspresseerivaid neuroneid. Iga koekultuuritassi kohta arvutati kümne vaatevälja põhjal jätkete ja neuronite suhtarv "neurites per neuron" (neuriidid / neuronid). Tulemused on normaliseeritud Q23 rühma keskväärtuse suhtes ja esitatud kujul keskväärtus ± standardhälve (SEM). Statistilised erinevused rühmade vahel määrati t-testide abil (Welch'i korrektsiooniga, kui dispersioonid olid erinevad). Q23 – huntingtiin 23 CAG-kordusega; Q74 – huntingtiin 74 CAG-kordusega. Täpne analüüsimeetod on kirjeldatud alapeatükis 2.2.5.

Viis katset kuuest järgisid sama efektisuunda, kus jätkete hulk neuroni kohta oli Q74 rühmas kõrgem kui Q23 rühmas. Esimeses katses (joonis 5; I) oli Q74 rühma keskväärtus $1,56 \pm 0,112$, samas kui Q23 rühmas oli see $1,00 \pm 0,024$, mis osutus statistiliselt oluliseks ($p = 0,0035$). Teises katses (joonis 5; II) oli Q74 rühma elumus $1,48 \pm 0,061$ ($p = 0,0010$) ning kolmandas katses (joonis 5; III) $1,50 \pm 0,067$ ($p = 0,0024$), järgides taas sarnast trendi. Viendas katses (joonis 5; V) täheldati samuti suurenenud jätkete kasvu Q74 rühmas ($1,23 \pm 0,060$ vs. Q23 = $1,01 \pm 0,062$; $p = 0,0464$). Kuuendas katses jäi sama suund püsima (Q74 = $1,10 \pm 0,031$), kuid erinevus ei olnud statistiliselt oluline ($p = 0,1240$).



Joonis 6. Neuronaaljätete koondanalüüs kuue katsekorduse põhjal. Kombineeritud andmed kõigist kuuest jätkete kasvu eksperimentidest, kus võrreldi Q23 ja Q74 huntingtiini ekspresseerivaid neuroneid. Iga punkt graafikul tähistab individuaalse koekultuuritassi keskvaartust, mis on normaliseeritud vastava katsekorduse Q23 kontrolli suhtes ($Q23 = 1,00$). Tulemused on esitatud kujul keskvaartus \pm standardhälve (SEM). Tulemused näitavad statistiliselt olulist jätkete kasvu suurenemist Q74 rühmas ($p = 0,0020$). Q23 – huntingtiin 23 CAG-kordusega; Q74 – huntingtiin 74 CAG-kordusega. Kasutatud meetodid on kirjeldatud alapeatükis 2.2.6.

Erandiks oli neljas katse (joonis 4; IV), kus jätkete arv Q74 rühmas oli madalam ($0,57 \pm 0,017$) kui Q23 rühmas ($1,04 \pm 0,146$) ning erinevus osutus statistiliselt oluliseks ($p = 0,0478$).

Üldise efekti suuna hindamiseks kombineeriti kõigi kuue sõltumatu katse andmed ja analüüsiti neid koondandmestikuna (joonis 6). Koondanalüüs kinnitas statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel: Q74 rühmas oli jätkete arv neuroni kohta keskmiselt $1,26 \pm 0,074$ ning Q23 rühmas $1,01 \pm 0,026$ ($p = 0,0020$).

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli uurida mutantse huntingtiini (mHTT) rakusiseseid mõjusid primaarsetes kortikaalsetes neuronites, keskendudes seostele neuronite elumuse ja jätkete kasvu parameetrite muutustega. Täiendavalt hinnati inimese düneiini kerge ahela valgu *roadblock 1* (DYNLRB1 – düneiini kerge ahel *roadblock 1*) ja selle mitokondrile suunatud versiooni (FIS1-DYNLRB1) üleekspressiooni mõju neuronite elumusele mHTT poolt põhjustatud toksilisuse tingimustes.

Tulemused näitasid, et mHTT (Q74) ekspressioon põhjustab neuronite elumuses olulist langust võrreldes normaalse huntingtiiniga (Q23), mis on kooskõlas varasemate töödega, kus seostatakse mHTT-d mitokondriaalse väärtalitluse, oksüdatiivse stressi, transkriptsiooni düsregulatsiooni ja rakusurma mehhanismidega (Gu *et al.*, 1996; Beal *et al.*, 1993; Browne *et al.*, 1997). Kuna neuronid on tugevalt polariseeritud rakud, mille eluspüsimine sõltub energiahomöostaasist ja aksonaalsest transpordist, võivad isegi väikesemad muutused nendes protsessides mõjutada oluliselt nende elumust.

DYNLRB1 on oluline komponent tsütoplasmaatilise düneiini kompleksis, osaledes rakuorganellide, sealhulgas mitokondrite, mikrotorukestel põhinevas transpordis (Nikulina *et al.*, 2004; Trokter *et al.*, 2012). Varasemates töodes on näidatud, et DYNLRB1 on kriitiline retrograadse transpordi toimimiseks, ning selle deletsioon sensoorsetes neuronites põhjustab aksonaalse transpordi häireid ja rakusurma (Terenzio *et al.*, 2020). Nendele teadmistele tuginedes püstitati hüpotees, et DYNLRB1 ekspressioonitaseme tõstmine neuronites kaitseb neid mHTT poolt põhjustatud toksilisuse korral ning suurendab seeläbi elumust.

Käesoleva töö tulemused näitasid, et DYNLRB1 (düneiini kerge ahel *roadblock 1*) üleekspresseerimine avaldas statistiliselt olulist kaitsvat toimet kortikaalsetes neuronites, mis ekspresseerisid normaalset HTT-d, kuid ei pakkunud kaitset mHTT-st tingitud toksilisuse vastu (joonis 4A). Samas tuleb arvesse võtta, et analüüs viidi läbi vaid kahe sõltumatu katsekorduse andmete põhjal, mistõttu on katsevigadel, rakukultuurisestel variatsioonidel ja juhuslikel kõrvalekalletel tugev mõju. See tähendab, et statistilise olulise erinevuse puudumine ei näita, et bioloogiline efekt kindlasti puudub, vaid et andmehulk võis olla selle tuvastamiseks lihtsalt liiga väike. Edasised uuringud suuremate valimite ja rohkemate kordustega on vajalikud, et täpsustada DYNLRB1 rolli mHTT poolt põhjustatud neurotoksilisuse korral.

Huvitav on, et DYNLRB1 üleekspresseerimine HTT Q23 taustal põhjustas statistiliselt olulise elumuse tõusu (joonis 4A). Kuna normaalse HTT korral võiks eeldada transpordimehhanismide

normaalset funktsioneerimist, siis võiks oletada, et tõus *DYNLRB1* ekspressioonitasemes ei avalda elumusele märkimisväärset mõju. Tulemused viitavad sellele, et düneiini valgukompleksi töö jääb ka normaaltingimustes optimumist allapoole ning täiendav *DYNLRB1* toetab mikrotorukeste vahendatud transporti või aitab selle komplekse stabiliseerida viisil, mis toetab raku elujõulisust või suurendab ta vastupidavust erinevatele stressoritele.

Selleks, et paremini mõista, kuidas *DYNLRB1* mõju sõltub tema rakusisesest paiknemisest, testiti FIS1-*DYNLRB1* konstrukti, kus FIS1 järjestuse eesmärk oli suunata *DYNLRB1* mitokondriaalsele välismembraanile, erinevalt tsütoplasmaatilisest *DYNLRB1*-st (joonis 4B). Kõrge ekspressioonitaseme korral mõjutas FIS1-*DYNLRB1* negatiivselt mõlema HTT grupi neuronite elumust. Ekspressioonitaseme langetamine (*less* FIS1-*DYNLRB1*) vähendas seevastu toksilisust ning saavutas mHTT-d ekspresseerivate neuronite hulgas elumuse taseme, mis oli võrreldav mHTT kontrollrühmaga. Need tulemused viitavad selgelt sellele, et *DYNLRB1* lokaalne kontsentratsioon ja rakusisene paiknemine mõjutavad tema toimet ja efekti ulatust neuronites ning liiga kõrge ekspressioonitaseme korral võib mitokondrile suunatud *DYNLRB1* akumulatsioon mõjuda rakule toksiliselt, samas kui madalamas koguses võib ta omada kaitsvat funktsiooni. Sarnast kontsentratsioonitundlikkust on täheldatud ka muude mitokondri välismembraani valkude puhul, kus ebatavaliselt kõrge valgukontsentratsioon võib põhjustada stressi (Pfanner *et al.*, 2019). Üks võimalik selgitus sellele mehhanismile seisneb selles, et kõrgel kontsentratsioonil mitokondritele kuhjunud *DYNLRB1* võib häirida mitokondriaalseid protsesse, näiteks membraanipotentsiaali säilitamist, kaltsiumpuhvrit või organellide liikumist mööda mikrotorukesi. On teada, et mitokondrid on sellistele muutustele tundlikud, ning juba väikesed häired tasakaalus võivad põhjustada langust nende funktsioonis või apoptoosi soodustavate signaalide aktiveerimist (Giorgi *et al.*, 2018).

Lisaks neuronite elumusele hinnati käesolevas bakalaureusetöös ka mHTT mõju neuronite morfoloogiale, keskendudes jätkete arvule ühe neuroni kohta. Algse hüpoteesi kohaselt eeldati, et mHTT ekspressioon põhjustab jätkete degeneratsiooni isegi rohkem kui elumuse langust. Ootamatult ilmnis aga enamikus katsekordustes hoopis jätkete kasvu suurenemine mHTT-d ekspresseerivates neuronites ning viies katses kuuest oli jätkete arv Q74 rühmas kõrgem kui Q23 rühmas. Ka andmete koondanalüüs näitas statistiliselt olulist erinevust rühmade vahel. Need tulemused seavad kahtluse alla hüpoteesi, et mHTT põhjustab eelistatult jätkete degeneratsiooni. Võimalik, et teatud rakusiseses tingimustes võivad käivituda

kompensatoorsed mehhanismid, mille eesmärk on säilitada sünaptiline ühenduvus või reageerida stressile.

Antud tulemustele ei ole võimalik anda ühest seletust. Üks võimalik selgitus on seotud häiretega aktiini regulatsioonis. Varasematest töödest on teada, et mHTT interakteerub tsütoskeleti komponentidega, sealhulgas aktiiniga (Michael *et al.*, 1997; Gauthier *et al.*, 2004). Kui mHTT agregaadid moodustuvad jätkete distaalsetesse piirkondadesse, võib see muuta tsütoskeleti dünaamikat ja signaliseerida kasvu, mille tulemusena hakkab neuron jätkete võrgustikku laiendama. See ei pruugi peegeldada tegelikke funktsionaalseid vajadusi, vaid olla vastus lokaalsetele muutustele, mida tõlgendatakse ekslikult kasvustiimulina. Lisaks võib mHTT muuta kasvukoonuse tundlikkust juhusignaalidele või keemilistele gradientidele, mille tulemuseks on juhuslik hargnemine ja võimalik funktsionaalne väärtalitus. Arvestada tuleb ka sellega, et kotransfektsiooni puhul ei saa eeldada, et markerplasmidi (RFP või mNeonGreen) olemasolu tagab mHTT-ga samaaegse ekspressiooni, ehk osa analüüsi kaasatud neuronitest võib esindada alampopulatsiooni, kus mHTT mõju ei ole täielikult kajastatud. Edasi oleks oluline uurida, kas muutused on ainult kvantitatiivsed või on mõjutatud ka muud jätkete morfoloogilised tunnused.

Käesoleva bakalaureusetöö tulemused näitavad, et mHTT ja DYNLRB1 avaldavad keerulist ja mitmetasandilist mõju neuronite elumusele ja morfoloogilistele parameetritele. Tsütoplasmaatilise DYNLRB1 valgu üleekspressioon parandas elumust kontrollneuronites, kuid selle suunamine mitokondrile avaldas elumusele negatiivset mõju. Nii tsütoplasmaatiline kui mitokondrile suunatud DYNLRB1 ei olnud protektiivsed mHTT korral. mHTT-d ekspresseerivate neuronite seas oli jätkete kasv neuroni kohta suurenenud. Samas ei toeta need leiud algset hüpoteesi, et DYNLRB1 aktivatsioon parandab elumust Huntingtoni tõve neuronaalses mudelis.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida mutantse huntingtiini (mHTT) mõju neuronite elumusele ja jätkete kasvule primaarsete kortikaalsete neuronite mudelis ning hinnata, kas *roadblock 1* valgu (DYNLRB1) üleekspressioon võiks pakkuda kaitset mHTT indutseeritud toksilisuse vastu. Lisaks uuriti, kuidas DYNLRB1 toime sõltub tema rakusisesest paiknemisest, suunates see FIS1-DYNLRB1 (FIS1 – mitokondriaalse fissiooni valk 1) konstrukti abil mitokondri välismembraanile.

Neuronite elumuse analüüs näitas, et DYNLRB1 üleekspressioon tõstis oluliselt normaalset HTT-d üleekspressioneerivate neuronite elumust, kuid ei avaldanud kaitsvat toimet mutantset HTT-d ekspresseerivates neuronites. FIS1-fusiooni abil mitokondrile suunatud DYNLRB1 (FIS1-DYNLRB1) avaldas kõrgel ekspressioonitasemel toksilist toimet mõlema rühma neuronitele, kuid madalama ekspressioonitaseme korral vähenes toksilisus märgatavalt. Jätkete kasvu analüüsis täheldati kuuest sõltumatust katsekordusest viies mHTT rühmas suurenenud jätkete arvu neuroni kohta võrreldes HTT rühmaga. Andmete koondanalüüs näitas rühmade vahel statistiliselt olulist erinevust, mis viitab, et mHTT võib stimuleerida jätkete kasvu või pidurdada nende degeneratsiooni.

Töö tulemused näitasid, et mHTT mõjutab neuronite elumust ja morfoloogiat keerukamalt, kui seni arvatud on. Samas ei toeta need leiud hüpoteesi, et DYNLRB1 aktivatsioon parandab neuronite elumust mHTT indutseeritud toksilisuse korral. Leiud rõhutavad vajadust täiendavateks uuringuteks, et täpsemalt selgitada DYNLRB1 valgu lokaliseerumise, ekspressioonitaseme ja funktsionaalse rolli seoseid HD patogeneesis.

Tulemustest lähtuvalt tehti järgmised järeldused:

1. mHTT ekspressioon vähendab neuronite elumust, võrreldes normaalset HTT-d ekspresseerivate neuronitega.
2. mHTT võib suurendada jätkete arvu neuroni kohta.
3. DYNLRB1 üleekspressioon parandab normaalset, kuid mitte mHTT-d ekspresseerivate neuronite elumust.
4. DYNLRB1 toime sõltub ekspressioonitasemest ja rakusisesest paiknemisest.

Factors Affecting the Survival and Neurite Growth of Primary Cortical Neurons in a Huntington's Disease Model

Laura Maria Mikenberg

Summary

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by the expansion of CAG repeats in the *HTT* gene. Aggregation of mutant huntingtin (mHTT) in neurons leads to various cellular disturbances, including disruption of homeostasis and normal cellular function. The aim of this bachelor's thesis was to investigate the effects of mHTT on neuronal viability and neurite growth in a primary cortical neuron model. Additionally, the potential protective role of the roadblock 1 protein (DYNLRB1) against mHTT-induced toxicity was assessed, and it was evaluated whether the magnitude and direction of DYNLRB1's effects depend on its subcellular localization by targeting it to the mitochondrial outer membrane using a FIS1-DYNLRB1 construct (FIS1 – mitochondrial fission protein 1).

Neurons were transfected with either wild-type HTT (pHM6-Q23) or mHTT (pHM6-Q74) plasmid constructs, and their viability and neurite growth were analyzed using fluorescence microscopy.

Analysis of neuronal viability showed that DYNLRB1 overexpression significantly increased survival in neurons expressing wild-type HTT but did not confer protection in mHTT expressing neurons. When DYNLRB1 was targeted to mitochondria via FIS1 fusion (FIS1-DYNLRB1), high expression levels led to toxicity in both groups, whereas reduced expression lessened this toxic effect.

In neurite growth analysis, five out of six independent experiments revealed that neurons expressing mHTT exhibited a greater number of neurites per cell compared to those expressing normal HTT. Pooled data analysis demonstrated a statistically significant difference, suggesting that mHTT may promote neurite growth or cause less neurite degeneration than previously assumed.

The main conclusions of this thesis were as follows:

1. mHTT expression decreases neuronal viability compared to normal HTT.
2. mHTT may increase the number of neurites per neuron.
3. DYNLRB1 overexpression improves the viability of normal HTT-expressing neurons but not those expressing mHTT.

4. The effects of DYNLRB1 depend on its expression level and subcellular localization.

Overall, these findings indicate that mHTT affects neuronal viability and morphology in a more complex manner than previously assumed. The results do not support the initial hypothesis that DYNLRB1 overexpression improves neuronal survival in the context of mHTT induced toxicity. These findings highlight the need for further studies to clarify the relationships between DYNLRB1 localization, expression level, and its functional roles in HD pathogenesis.

KIRJANDUSE LOETELU

- Acevedo-Torres, K., Berríos, L., Rosario, N., Dufault, V., Skatchkov, S., Eaton, M. J., & Ayala-Torres, S. (2009). Mitochondrial DNA damage is a hallmark of chemically induced and the R6/2 transgenic model of Huntington's disease. *DNA Repair*, 8(1), 126–136. [10.1016/j.dnarep.2008.09.004](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.09.004)
- Adam, O. R., & Jankovic, J. (2008). Symptomatic Treatment of Huntington Disease. *Neurotherapeutics*, 5(2), 181–197. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.01.009>
- Ananbeh, H., Vodicka, P., & Kupcova Skalnikova, H. (2021). Emerging Roles of Exosomes in Huntington's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4085. <https://doi.org/10.3390/ijms22084085>
- Beal, M. F., Matson, W. R., Storey, E., Milbury, P., Ryan, E. A., Ogawa, T., & Bird, E. D. (1993). Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 56(9), 1033–1037. [10.1016/0022-510x\(92\)90191-m](https://doi.org/10.1016/0022-510x(92)90191-m)
- Bezprozvanny, I., & Hayden, M. R. (2004). Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(4), 1310–1317. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.035>
- Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 22(3), 123–131. <https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>
- Block-Galarza, J., Chase, K. O., Sapp, E., Vaughn, K. T., Vallee, R. B., DiFiglia, M., & Aronin, N. (1997). Fast transport and retrograde movement of huntingtin and HAP 1 in axons. *Neuroreport*, 8(9-10), 2247–2251. <https://doi.org/10.1097/00001756-199707070-00031>
- Bonelli, R. M., & Hofmann, P. (2007). A systematic review of the treatment studies in Huntington's disease since 1990. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 8(2), 141–153. <https://doi.org/10.1517/14656566.8.2.141>
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M. K., Bird, E. D., & Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of Neurology*, 41(5), 646–653. <https://doi.org/10.1002/ana.410410514>
- Carroll, J. B., Bates, G. P., Steffan, J., Saft, C., & Tabrizi, S. J. (2015). Treating the Whole Body in Huntington's Disease. *The Lancet Neurology*, 14(11), 1135–1142. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00177-5)
- Cattaneo, E., Zuccato, C., & Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: An alternative approach to Huntington's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(12), 919–930. <https://doi.org/10.1038/nrn1806>

- Caviston, J. P., Ross, J. L., Antony, S. M., Tokito, M., & Holzbaur, E. L. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*, 10045–10050.
- Cha, J. H. J. (2000). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends in Neurosciences*, *23*(9), 387–392. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01609-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01609-X)
- Chao M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews. Neuroscience*, *4*(4), 299–309. <https://doi.org/10.1038/nrn1078>
- Chaturvedi, R. K., Adihetty, P., Shukla, S., Hennessy, T., Calingasan, N., Yang, L., Starkov, A., & Beal, M. F. (2009). Impaired PGC-1 α function in muscle in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *18*(16), 3048–3065. [10.1093/hmg/ddp243](https://doi.org/10.1093/hmg/ddp243)
- Choi, Y. B., Kadakkuzha, B. M., & Bredesen, D. E. (2009). Loss of CREB function in Huntington's disease models. *Neurobiology of Disease*, *36*(2), 330–338. [10.1016/j.nbd.2009.07.014](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.014)
- Colin, E., Zala, D., Liot, G., ... Saudou, F. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO Journal*, *27*(15), 2124–2134. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.133>
- Copp A. J. (1995). Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends in genetics: TIG*, *11*(3), 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)89008-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)89008-3)
- Craufurd, D., Snowden, J. S., Thompson, J., & Neary, D. (2002). Psychomotor, executive, and memory function in preclinical Huntington's disease. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, *24*(2), 133–145. <https://doi.org/10.1076/jcen.24.2.133.998>
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C. N., Tanese, N., & Krainc, D. (2006). Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, *127*(1), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.015>
- Deacon, S. W., Serpinskaya, A. S., Vaughan, P. S., Lopez Fanarraga, M., Vernos, I., Vaughan, K. T., & Gelfand, V. I. (2003). Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *Journal of Cell Biology*, *160*(3), 297–301. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210066>
- DeMarch, Z., Giampà, C., Patassini, S., Bernardi, G., & Fusco, F. R. (2008). Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, *30*(3), 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.02.010>
- Desmond, C. R., Atwal, R. S., Xia, J., & Truant, R. (2012). Identification of a Karyopherin $\beta 1/\beta 2$ Proline-Tyrosine Nuclear Localization Signal in Huntingtin Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(47), 39626–39633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.412379>

- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., ... Aronin, N. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*, 14(5), 1075–1081. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90346-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90346-1)
- Dragatsis, I., Levine, M. S., & Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature genetics*, 26(3), 300–306. <https://doi.org/10.1038/81593>
- Dunah, A. W., Jeong, H., Griffin, A., ... Krainc, D. (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science*, 296(5576), 2238–2243. <https://doi.org/10.1126/science.1072613>
- Engelender, S., Sharp, A. H., Colomer, V., Tokito, M. K., Lanahan, A., Worley, P., Holzbaur, E. L., & Ross, C. A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Human Molecular Genetics*, 6(13), 2205–2212. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.13.2205>
- Ferrante, R. J., Gutekunst, C. A., Persichetti, F., McNeil, S. M., Kowall, N. W., Gusella, J. F., MacDonald, M. E., Beal, M. F. & Hersch, S. M. (1997). Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *Journal of Neuroscience*, 17(8), 3052–3063. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-08-03052.1997>
- Ferrante, R. J., Kubilus, J. K., Lee, J., ... Hersch, S. M. (2003). Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *Journal of Neuroscience*, 23(28), 9418–9427. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-28-09418.2003>
- Ferrante, R. J., Ryu, H., Kubilus, ... Ratan, R. R. (2004). Chemotherapy for the brain: The antitumor antibiotic mithramycin prolongs survival in a mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 24(46), 10335–10342. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2599-04.2004>
- Frank S. (2014). Treatment of Huntington's disease. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 11(1), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0244-z>
- Fujinaga, R., Takeshita, Y., Uozumi, K., Yanai, A., Yoshioka, K., Kokubu, K., & Shinoda, K. (2009). Microtubule-dependent formation of the stigmoid body as a cytoplasmic inclusion distinct from pathological aggregates. *Histochemistry and cell biology*, 132(3), 305–318. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0618-9>
- Fujinaga, R., Takeshita, Y., Yoshioka, K., ... Shinoda, K. (2011). Intracellular colocalization of HAP1/STBs with steroid hormone receptors and its enhancement by a proteasome inhibitor. *Experimental cell research*, 317(12), 1689–1700. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.004>

- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., ... Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, *118*(1), 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.018>
- Gervais, F. G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., ... Nicholson, D. W. (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein HIP1 and a novel partner Hipp1. *Nature Cell Biology*, *4*(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/ncb735>
- Giampà, C., Patassini, S., Borreca, A., Laurenti, D., Marullo, F., Bernardi, G., & Fusco, F. R. (2009). Phosphodiesterase type 10 inhibition reduces striatal excitotoxicity in the quinolinic acid model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, *34*(3), 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.02.014>
- Gines, S., Seong, I. S., Fossale, E., Ivanova, E., Trettel, F., Gusella, J. F., Wheeler, V. C., Persichetti, F., & MacDonald, M. E. (2003). Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Human molecular genetics*, *12*(5), 497–508. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg046>
- Giorgi, C., Marchi, S., & Pinton, P. (2018). The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(11), 713–730. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>
- Gordon, A. M., Quinn, L., Reilmann, R., & Marder, K. (2000). Coordination of prehensile forces during precision grip in Huntington's disease. *Experimental neurology*, *163*(1), 136–148. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7348>
- Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J., ... Hayden, M. R. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell*, *125*(6), 1179–1191. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.026>
- Greene, J. G., & Greenamyre, J. T. (1996). Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Progress in Neurobiology*, *48*(6), 613–634. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(96\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00003-5)
- Grima, J. C., Daigle, J. G., Arbez, N., ... Rothstein, J. D. (2017). Mutant Huntingtin Disrupts the Nuclear Pore Complex. *Neuron*, *94*(1), 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.023>
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. V. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of Neurology*, *39*(3), 385–389. <https://doi.org/10.1002/ana.410390317>
- Guillaud, L., El-Agamy, S. E., Otsuki, M., & Terenzio, M. (2020). Anterograde axonal transport in neuronal homeostasis and disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*, 556175. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.556175>
- Guo, Q., Bin Huang, Cheng, J., Seefelder, M., ... Kochanek, S. (2018). The cryo-electron microscopy structure of huntingtin. *Nature*, *555*(7694), 117–120. <https://doi.org/10.1038/nature25502>

- Gutekunst, C.A., Li, S.H., Yi, H., Ferrante, R. J., Li, X.J., ja Hersch, S. M. (1998). The cellular and subcellular localization of huntingtin-associated protein 1 (HAP1): Comparison with huntingtin in rat and human. *Journal of Neuroscience*, *18*(19), 7674–7686. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-19-07674.1998>
- Halliday, G. M., McRitchie, D. A., Macdonald, V., Double, K. L., Trent, R. J., & McCusker, E. (1998). Regional specificity of brain atrophy in Huntington's disease. *Experimental Neurology*, *154*(2), 663–672. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6919>
- Harjes, P., & Wanker, E. E. (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends in biochemical sciences*, *28*(8), 425–433. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00168-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00168-3)
- Harper P. S. (1992). The epidemiology of Huntington's disease. *Human genetics*, *89*(4), 365–376. <https://doi.org/10.1007/BF00194305>
- Hirokawa, N., & Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*, 201–214. <https://doi.org/10.1038/nrn1624>
- Hockly, E., Richon, V. M., Woodman, B., ... Bates, G. P. (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(4), 2041–2046. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437870100>
- Hosp, F., Vossfeldt, H., Heinig, M., ... Selbach, M. (2015). Quantitative interaction proteomics of neurodegenerative disease proteins. *Cell Reports*, *11*(7), 1134–1146. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.030>
- Jenkins, B. G., Koroshetz, W. J., Beal, M. F., & Rosen, B. R. (1998). Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy. *Neurology*, *50*(5), 1357–1363. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.12.2689>
- Jung, T., Shin, B., Tamo, G., ... Song, J. J. (2020). The polyglutamine expansion at the N-terminal of huntingtin protein modulates the dynamic configuration and phosphorylation of the C-terminal HEAT domain. *Structure*, *28*(9), 1035–1050.e8. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.008>
- Kiebertz, K., Pennery, J. B., Como, P., ... Huntington Study Group. (1996). Unified Huntington's disease rating scale: Reliability and consistency. *Movement Disorders*, *11*(2), 136–142. <https://doi.org/10.1002/mds.870110204>
- Kim, A., Lalonde, K., Truesdell, A., Gomes Welter, P., Brocardo, P. S., Rosenstock, T. R., & Gil-Mohapel, J. (2021). New avenues for the treatment of Huntington's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8363. <https://doi.org/10.3390/ijms22168363>
- Kim, J., Moody, J. P., Edgerly, C. K., Bordiuk, O. L., Cormier, K., Smith, K., Beal, M. F., & Ferrante, R. J. (2010). Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in

- Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 19(20), 3919–3935. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq306>.
- King, S. M., Barbarese, E., Dillman, J. F., 3rd, Patel-King, R. S., Carson, J. H., & Pfister, K. K. (1996). Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *The Journal of biological chemistry*, 271(32), 19358–19366. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19358>
- King, S. M., Dillman, J. F., 3rd, Benashski, S. E., Lye, R. J., Patel-King, R. S., & Pfister, K. K. (1996). The mouse t-complex-encoded protein Tctex-1 is a light chain of brain cytoplasmic dynein. *The Journal of biological chemistry*, 271(50), 32281–32287. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.32281>
- Kuwert, T., Lange, H. W., Langen, K. J., Herzog, H., Aulich, A., & Feinendegen, L. E. (1990). Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain*, 113(5), 1405–1423. <https://doi.org/10.1093/brain/113.5.1405>
- Langbehn, D. R., Brinkman, R. R., Falush, D., Paulsen, J. S., & Hayden, M. R. (2004). A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clinical Genetics*, 65(4), 267–277. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00241.x>
- Li, S. H., Gutekunst, C. A., Hersch, S. M., & Li, X. J. (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *Journal of Neuroscience*, 18(4), 1261–1269. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-04-01261.1998>
- Li, S. H., Li, H., Torre, E. R., & Li, X. J. (2000). Expression of huntingtin-associated protein-1 in neuronal cells implicates a role in neuritic growth. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 16(2), 168–183. <https://doi.org/10.1006/mcne.2000.0858>
- Li, S. H., Schilling, G., Young, W. S., ... Ranen, N. G. (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, 11(5), 985–993. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90127-d](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90127-d)
- Li, W., Serpell, L. C., Carter, W. J., Rubinsztein, D. C., & Huntington, J. A. (2006). Expression and characterization of full-length human huntingtin, an elongated HEAT repeat protein. *The Journal of biological chemistry*, 281(23), 15916–15922. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511007200>
- Li, X. J., Friedman, M., & Li, S. (2007). Interacting proteins as genetic modifiers of Huntington disease. *Trends in genetics: TIG*, 23(11), 531–533. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.07.007>
- Li, X. J., Li, S. H., Sharp, A. H., Nucifora, F. C., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S. H., & Ross, C. A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*, 378(6555), 398–402. <https://doi.org/10.1038/378398a0>

- Liiv, M., Vaarmann, A., Safiulina, D., ... Kaasik, A. (2024). ER calcium depletion as a key driver for impaired ER-to-mitochondria calcium transfer and mitochondrial dysfunction in Wolfram syndrome. *Nature Communications*, 15, 6143. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50502-x>
- Lin, X., Antalffy, B., Kang, D., Orr, H. T., & Zoghbi, H. Y. (2000). Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nature neuroscience*, 3(2), 157–163. <https://doi.org/10.1038/72101>
- Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., & Saudou, F. (2013). Mutant huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal neurons. *Neuroscience*, 258, 272–290. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2033-12.2013>
- Lontay, B., Kiss, A., Virág, L., & Tar, K. (2020). How do post-translational modifications influence the pathomechanistic landscape of Huntington's disease? A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4282. <https://doi.org/10.3390/ijms21124282>
- MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., ... Gusella, J. F. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971–983. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-E)
- Marder, K., Zhao, H., Myers, R. H., ... Shoulson, I. (2000). Rate of functional decline in Huntington's disease. Huntington Study Group. *Neurology*, 54(2), 452–458. <https://doi.org/10.1212/wnl.54.2.452>
- McGuire, J. R., Rong, J., Li, S.-H., & Li, X.-J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated Protein-1 with Kinesin Light Chain: Implications in intracellular trafficking in neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3552–3559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509806200>
- Metzger, S., Rong, J., Nguyen, H.-P., ... Riess, O. (2008). Huntingtin-associated protein-1 is a modifier of the age-at-onset of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, 17(8), 1137–1146. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn003>
- Morrison, P. J., Johnston, W. P., & Nevin, N. C. (1995). The epidemiology of Huntington's disease in Northern Ireland. *Journal of medical genetics*, 32(7), 524–530. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.7.524>
- Myers, R. H. (2004). Huntington's disease genetics. *NeuroRx*, 1(2), 255–262. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.255>
- Nikulina, K., Patel-King, R. S., Takebe, S., Pfister, K. K., & King, S. M. (2004). The Roadblock light chains are ubiquitous components of cytoplasmic dynein that form homo- and heterodimers. *Cell motility and the cytoskeleton*, 57(4), 233–245. <https://doi.org/10.1002/cm.10172>

- Nucifora, F. C., Sasaki, M., Peters, M. F., ... Ross, C. A. (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with CBP-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, *291*(5512), 2423–2428. <https://doi.org/10.1126/science.1056784>
- Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., & Greenamyre, J. T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature Neuroscience*, *5*(8), 731–736. <https://doi.org/10.1038/nn884>
- Paschal, B. M., Shpetner, H. S., & Vallee, R. B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *The Journal of Cell Biology*, *105*(3), 1273–1282. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.3.1273>
- Paulsen, J. S., Butters, N., Sadek, J. R., Johnson, S. A., Salmon, D. P., Swerdlow, N. R., & Swenson, M. R. (1995). Distinct cognitive profiles of cortical and subcortical dementia in advanced illness. *Neurology*, *45*(5), 951–956. <https://doi.org/10.1212/wnl.45.5.951>
- Paulsen, J. S., Ready, R. E., Hamilton, J. M., Mega, M. S., & Cummings, J. L. (2001). Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *71*(3), 310–314. <https://doi.org/10.1136/jnnp.71.3.310>
- Peterlin, B., Kobal, J., Teran, N., Flisar, D., & Lovrecić, L. (2009). Epidemiology of Huntington's disease in Slovenia. *Acta neurologica Scandinavica*, *119*(6), 371–375. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01110.x>
- Peters, M. F., Nucifora, F. C. Jr., Kushi, J., Seaman, H. C., Cooper, J. K., Herring, W. J., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Ross, C. A. (1999). Nuclear targeting of mutant huntingtin increases toxicity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *14*(2), 121–128. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0773>
- Pfanner, N., Warscheid, B., & Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *20*(5), 267–284. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0092-0>
- Potkin, K. T., & Potkin, S. G. (2018). New directions in therapeutics for Huntington disease. *Future neurology*, *13*(2), 101–121. <https://doi.org/10.2217/fnl-2017-0035>
- Priller, J., Ecker, D., Landwehrmeyer, B., & Craufurd, D. (2008). A Europe-wide assessment of current medication choices in Huntington's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, *23*(12), 1788. <https://doi.org/10.1002/mds.22188>
- Prowse, E. N. P., Turkalj, B. A., Gursu, L., & Hendricks, A. G. (2025). The huntingtin transport complex. *Biochemistry*, *64*(4), 760–769. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.4c00811>
- Quintanilla, R. A., & Johnson, G. V. W. (2009). Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin*, *80*(4–5), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.07.010>

- Reiner, A., Dragatsis, I., Zeitlin, S., & Goldowitz, D. (2003). Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Molecular Neurobiology*, 28(3), 259–276. <https://doi.org/10.1385/MN:28:3:259>
- Rigamonti, D., Bauer, J. H., De-Fraja, C., ... Cattaneo, E. (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3705–3713. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-10-03705.2000>
- Rosenblatt, A., Liang, K. Y., Zhou, H., Abbott, M. H., Gourley, L. M., Margolis, R. L., Brandt, J., & Ross, C. A. (2006). The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. *Neurology*, 66(7), 1016–1020. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000204230.16619.d9>
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*, 10(1), 83–98. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)
- Ross, C. A., Margolis, R. L., Rosenblatt, A., Ranen, N. G., Becher, M. W., & Aylward, E. (1997). Huntington disease and the related disorder, dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Medicine*, 76(5), 305–338. <https://doi.org/10.1097/00005792-199709000-00001>
- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The biology of huntingtin. *Neuron*, 89(5), 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>
- Schaffert, L.-N., & Carter, W. G. (2020). Do post-translational modifications influence protein aggregation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Brain Sciences*, 10(4), 232. <https://doi.org/10.3390/brainsci10040232>
- Schroer, T. A., Bingham, J. B., & Gill, S. R. (1996). Actin-related protein 1 and cytoplasmic dynein-based motility - what's the connection? *Trends in cell biology*, 6(6), 212–215. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)20014-5](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)20014-5)
- Schulte, J., & Littleton, J. T. (2011). The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Current trends in neurology*, 5, 65–78.
- Sheng, G., Xu, X., Lin, Y. F., Wang, C. E., ... Li, X. J. (2008). Huntingtin-associated protein 1 interacts with Ahil to regulate cerebellar and brainstem development in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(8), 2785–2795. <https://doi.org/10.1172/JCI35339>
- Smith, R., Brundin, P., & Li, J. Y. (2005). Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 62(17), 1901–1912. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5084-5>
- Sorolla, M. A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., & Cabiscol, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(5), 667–678. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.014>

- Steffan, J. S., Bodai, L., Pallos, J., ... Marsh, J. L. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*, *413*(6857), 739–743. <https://doi.org/10.1038/35099568>
- Suhr, S. T., Senut, M. C., Whitelegge, J. P., Faull, K. F., Cuizon, D. B., & Gage, F. H. (2001). Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression. *Journal of Cell Biology*, *153*(2), 283–294. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.2.283>
- Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P. H., & Liu, Y. F. (2001). Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *The Journal of biological chemistry*, *276*(27), 24713–24718. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103501200>
- Tabrizi, S. J., Langebehn, D. R., Leavitt, B. R., ... The TRACK-HD Investigators. (2009). Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *The Lancet Neurology*, *8*(9), 791–801. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70170-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70170-X)
- Tabrizi, S. J., Workman, J., Hart, P. E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., & Cooper, J. M. (2000). Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Annals of Neurology*, *47*(1), 80–86. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200001\)47:1%3C80::aid-ana13%3E3.3.co;2-b](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200001)47:1%3C80::aid-ana13%3E3.3.co;2-b)
- Taherzadeh-Fard, E., Saft, C., Andrich, J., Wieczorek, S., & Arning, L. (2009). PGC-1alpha as modifier of onset age in Huntington disease. *Molecular neurodegeneration*, *4*, 10. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-10>
- Taylor, J. P. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, *296*(5575), 1991–1995. <https://doi.org/10.1126/science.1067122>
- Terenzio, M., Di Pizio, A., Rishal, I., ... Fainzilber, M. (2020). DYNLRB1 is essential for dynein mediated transport and neuronal survival. *Neurobiology of Disease*, *140*, 104816. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104816>
- Twelvetrees, A. E., Yuen, E. Y., Arancibia-Carcamo, I. L., ... Kittler, J. T. (2010). Delivery of GABA_ARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron*, *65*(1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.007>
- Vale, R. D., Reese, T. S., & Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, *42*(1), 39–50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(85\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80099-4)
- Vallee, R. B., Wall, J. S., Paschal, B. M., & Shpetner, H. S. (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature*, *332*(6164), 561–563. <https://doi.org/10.1038/332561a0>

- Vonsattel, J. P. G. (2008). Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*, 115(1), 55–69. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0306-6>
- Vonsattel, J. P., & DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(5), 369–384. <https://doi.org/10.1097/00005072-199805000-00001>
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 44(6), 559–577. <https://doi.org/10.1097/00005072-198511000-00003>
- Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *The Lancet*, 369(9557), 218–228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60111-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60111-1)
- Warby, S. C., Doty, C. N., Graham, R. K., Carroll, J. B., Yang, Y.-Z., Singaraja, R. R., Overall, C. M., & Hayden, M. R. (2008). Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus. *Human Molecular Genetics*, 17(15), 2390–2404. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn139>
- Wellington, C. L., Stack, E. C., Hersch, S. M., & Hayden, M. R. (2000). Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 20(22), 7862–7872. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-07862.2002>
- Wexler, N. S. & The U.S.-Venezuela Collaborative Research Project. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3498–3503. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308679101>
- White, J. K., Auerbach, W., Duyao, M. P., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Joyner, A. L., & MacDonald, M. E. (1997). Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nature genetics*, 17(4), 404–410. <https://doi.org/10.1038/ng1297-404>
- Wu, L. L., & Zhou, X. F. (2009). Huntingtin-associated protein 1 and its functions. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1), 71–76. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.7511>
- Wu, Y., Wang, Y., Lu, Y., Yan, J., Zhao, H., Yang, R., & Pan, J. (2024). Research advances in huntingtin-associated protein 1 and its application prospects in diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 18, 1402996. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1402996>
- Wyant, K. J., Ridder, A. J., & Dayalu, P. (2017). Huntington's Disease—Update on Treatments. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(3), 33. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0739-9>
- Xiang, J., Yang, H., Zhao, T., Sun, M., Xu, X., Zhou, X. F., Li, S. H. & Li, X. J. (2014). Huntingtin-associated protein 1 regulates postnatal neurogenesis and neurotrophin

- receptor sorting. *Journal of Clinical Investigation*, 124(1), 85–98. <https://doi.org/10.1172/JCI69206>
- Yu, Z. X., Li, S. H., Evans, J., Pillarisetti, A., Li, H., & Li, X. J. (2003). Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience*, 23(6), 2193–2202. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-06-02193.2003>
- Zala, D., Hinckelmann, M. V., Yu, H., Lyra da Cunha, M. M., Liot, G., Cordelières, F. P., & Saudou, F. (2008). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell*, 152(3), 479–491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.029>
- Zeitlin, S., Liu, J. P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E. & Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature Genetics*, 11(2), 155–163. <https://doi.org/10.1038/ng1095-155>
- Zhao, X., Chen, A., Wang, Z., Xu, X. H., & Tao, Y. (2022). Biological functions and potential therapeutic applications of huntingtin-associated protein 1: Progress and prospects. *Clinical & Translational Oncology*, 24, 203–214. <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02702-w>
- Zheng, Z., & Diamond, M. I. (2012). Huntington disease and the huntingtin protein. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 107, 189–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00010-2>
- Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(5–6), 294–330. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.003>
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., ... Cattaneo, E. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, 293(5529), 493–498. <https://doi.org/10.1126/science.1059581>
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., ... Cattaneo, E. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature Genetics*, 35(1), 76–83. <https://doi.org/10.1038/ng1219>

LIHTLITSENTS

Mina, Laura Maria Mikenberg,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Primaarsete kortikaalsete neuronite elumust ja jätkete kasvu mõjutavad faktorid“, mille juhendajad on Allen Kaasik ja Tambet Tõnissoo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Laura Maria Mikenberg

24.04.2025