

ABSTRACT

Spinocerebellar Ataxia Type 1 (SCA1) and Huntington's Disease (HD) are two polyglutamine disorders caused by expansion of a CAG repeat within the coding regions of the Ataxin-1 and Huntingtin proteins respectively. While several lines of evidence point to the existence of common mechanisms of pathogenesis among the several polyglutamine disorders (such as protein folding and turnover), the fact that they display different clinical and pathological features suggests that there are also disease-specific mechanisms.

Taking advantage of a collection of genetic modifiers of expanded Ataxin-1-induced neurotoxicity, we performed a comparative analysis in *Drosophila* models of the two diseases, using the eye phenotype as the primary assay. To our knowledge, this study represents the largest study to date comparing genetic modifiers between two polyglutamine disorders using fly models.

We show that while some modifier genes function similarly in SCA1 and HD *Drosophila* models, others have model-specific effects. Surprisingly, some modifiers appear to modify the SCA1 but not the HD model whereas certain modifier genes modify SCA1 and HD models in opposite directions; i.e. they behave as suppressors in one case and enhancers in the other. We have also analyzed the effect of some of the genes included in this last group in the Central Nervous System (CNS), using both behavioral and cellular assays. For the genes tested, the modifications observed in the eye assay are reproduced using a motor performance assay. Furthermore, we find that modulation of toxicity does not correlate with alterations in the formation of neuronal intranuclear inclusions.

Our results emphasize that in addition to common mechanisms of pathogenesis, polyglutamine diseases (and maybe neurodegenerative disorders in general) have specific mechanisms leading to their characteristic pathology. Furthermore, each gene needs to be analyzed extensively in context of each disorder as its role in the pathogenesis may vary in many

aspects from one disease to the other. The results presented here show a number of genes that are involved specifically in our SCA1 fly model and genes involved in both SCA1 and HD fly models and, thus, help to build the overall map of genes that affect the pathogenesis of the two diseases. Consequently, we believe that our results will contribute to the comprehension of the network of interactions behind the pathology of these disorders.

In summary, our results point not only to potential common therapeutic targets in novel pathways, but also to genes and pathways responsible for differences between Ataxin-1 and Huntingtin-induced neurodegeneration. These results may contribute for the development new therapeutic approaches. Finally, the results obtained reinforce that, in order to achieve effective treatments, each disease needs to be carefully studied in its own context, and not as part of a group of disorders.

RESUMO

Ataxia Espinocerebral Tipo 1 (SCA1) e Doença de Huntington (HD) são duas doenças que fazem parte do grupo de doenças denominadas por Doenças de Poliglutaminas. Estas doenças são causadas por expansões de repetições CAG localizadas na região codificante das proteínas Ataxina-1 e Huntingtina, respectivamente.

Resultados da investigação desenvolvida por diversos grupos indicam a existência de mecanismos de patogénese comuns às várias Doenças de Poliglutaminas, tal como mecanismos implicados no *folding* e *turnover* da proteína causadora da doença. No entanto, o facto de todas estas doenças apresentarem características clínicas e patológicas distintas sugere também a existência de mecanismos específicos a cada uma destas doenças.

Utilizando uma colecção de modificadores genéticos da toxicidade induzida pela Ataxina-1 mutante, desenvolvemos uma análise comparativa utilizando modelos em *Drosophila* das duas doenças, utilizando a alteração de fenótipos no olho como o ensaio principal. O estudo aqui apresentado é a análise mais abrangente, realizada até à data, na qual são comparados modificadores genéticos entre duas Doenças de Poliglutaminas, utilizando a mosca como modelo de estudo.

Com este trabalho foi possível demonstrar que enquanto alguns modificadores genéticos funcionam de um modo semelhante nos modelos de *Drosophila* de SCA1 e HD, outros têm um efeito específico em cada um dos modelos por nós desenvolvidos. Surpreendentemente, alguns modificadores parecem alterar os fenótipos característicos do modelo de SCA1 mas não o fenótipo de HD, enquanto que um grupo específico de modificadores genéticos alteram os fenótipos dos modelos de SCA1 e HD em direcções opostas, ou seja, funcionam como supressores num caso e têm um efeito agravante no outro caso. Analisámos ainda o efeito de alguns dos genes incluídos neste último grupo de modificadores genéticos ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC), utilizando para isso ensaios comportamentais e ensaios celulares. Para os genes testados concluímos que as modificações observadas quando recorremos ao ensaio no olho são

reprodutíveis quando utilizamos um ensaio onde é testada a capacidade motora das moscas (ensaio comportamental). Verificamos ainda, recorrendo a um ensaio celular, que a modulação da toxicidade não está correlacionada com alterações na formação de agregados intra-nucleares das proteínas mutantes, a nível neuronal.

Os resultados assim obtidos dão ênfase à teoria que defende que para além de mecanismos comuns de patogénese, as Doenças de Poliglutaminas (e possivelmente as Doenças Neurodegenerativas em geral) têm também mecanismos específicos que induzem a formação de características patológicas especificadas de cada doença.

Neste sentido, os nossos resultados salientam a importância de cada gene ser analisado no contexto de cada doença, pois a sua contribuição para os mecanismos que conduzem à patogénese pode variar em diversos aspectos de uma doença para outra. Os resultados aqui apresentados indicam diversos genes que estão envolvidos especificamente nos mecanismos de patogénese do modelo de SCA1 desenvolvido pelo nosso laboratório, mas identificam também genes envolvidos simultaneamente nos dois modelos em mosca de SCA1 e HD. Por este motivos, os nossos resultados contribuem para a construção do mapa de genes que afectam a toxicidade observada nas duas doenças. Deste modo, acreditamos que os nossos resultados irão contribuir de um modo claro para a compreensão da rede de interacções responsável por estas patologias.

Em conclusão, os nossos resultados sugerem a existência não só de potenciais alvos terapêuticos comuns às duas doenças aqui estudadas, mas indicam também a existência de genes e vias celulares responsáveis pelas diferenças entre a neuro-degeneração resultante das mutações na Ataxina-1 e na Huntingtina. Deste modo, este resultados poderão contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Finalmente, os resultados obtidos ao longo desta Tese de Doutoramento reforçam que para se poder desenvolver tratamentos eficazes para este tipo de doenças, cada doença deverá ser analisada e estudada no seu próprio contexto e não como fazendo parte de um grupo de doenças.

RESUME

L'Ataxie Cérébro-spinal du type I (SCA1) et la Maladie d'Huntington sont deux maladies du groupe dénommé de Maladies à Polyglutamines. Ces maladies sont provoquées par des répétitions CAG localisées sur la région codante des protéines Ataxine-1 et Huntingtine, respectivement.

Les résultats de la recherche menée par plusieurs groupes indiquent l'existence des mécanismes de pathogenèse communs à plusieurs maladies à polyglutamines, aussi bien que des mécanismes impliqués dans le *folding* et *turnover* de la protéine causant la maladie. Cependant, le fait que toutes ces maladies présentent des caractéristiques cliniques et pathologiques distinctes suggère aussi l'existence de mécanismes spécifiques à chacune de ces maladies.

Basés sur une collection de modificateurs génétiques de la neurotoxicité induite par l'Ataxine-1, nous avons développé une analyse comparative des deux maladies sur des modèles de *Drosophila*, en utilisant l'altération des phénotypes de l'œil comme essai principal. À notre avis, cette étude représente l'analyse la plus large, menée jusqu'à présent, où des modificateurs génétiques sont comparées entre deux maladies à polyglutamines, en utilisant la *Drosophila* comme modèle.

Ce travail nous a permis de démontrer que tandis que quelques modificateurs génétiques présentent un mode de fonctionnement semblable chez les modèles de *Drosophila* de SCA1 et HD, d'autres ont un effet spécifique sur chacun des modèles que nous avons développés. Quelques modificateurs semblent changer les phénotypes caractéristiques du modèle SCA1 mais non ceux de HD, tandis que un groupe spécifique de modificateurs génétiques changent les phénotypes des modèles SCA1 et HD dans des directions opposées, c'est-à-dire, ils fonctionnent comme des suppresseurs dans un cas et présentent un effet marquant dans l'autre. Nous avons aussi analysé l'effet sur le Système Nerveux Central de quelques gènes inclus dans ce dernier groupe de modificateurs génétiques, en utilisant des essais comportementaux et cellulaires. Nos résultats permettent de conclure que, pour les gènes testés, les modifications observées auparavant quand nous essayons l'œil sont transposables pour des essais où nous

testons la capacité motrice des mouches (essai comportemental). Nous vérifions aussi, par un essai cellulaire, que la modulation de la toxicité n'est pas associée à des altérations dans la formation d'agrégats intra-nucleaires des protéines mutantes, à niveau neuronal.

Nos résultats renforcent la théorie qui les Maladies à Polyglutamines (et peut-être la généralité des Maladies Neurodégénératives), en plus des caractéristiques communes de pathogenèse, présentent aussi des mécanismes spécifiques pour l'induction des pathologies caractéristiques. Dans ce sens, nos résultats placent en évidence l'importance de l'analyse de chaque gène dans le contexte de chacune des maladies, une fois que sa contribution pour les mécanismes conduisant à la pathogenèse peut varier de plusieurs façons d'une maladie à l'autre. Les résultats présentés identifient plusieurs gènes participant de façon spécifique dans les mécanismes de pathogenèse du modèle SCA-1 développé par notre équipe, mais identifient aussi des gènes présents en même temps dans les deux modèles SCA-1 et HD. Par ces raisons, nos résultats contribuent pour la construction de la carte des gènes qui affectent la toxicité observée dans les deux maladies. Ainsi, nous espérons que nos résultats peuvent aider d'une façon claire à la compréhension de la toile d'interactions responsable par ces pathologies.

En conclusion, nos résultats suggèrent en plus de l'existence de cibles thérapeutiques potentielles communes l'existence de gènes et des voies cellulaires responsables par les différences entre la neurodégénération résultante des mutations de l'Ataxine-1 et celle de la Huntingtine. Ainsi, ces résultats peuvent contribuer pour le développement de nouvelles thérapeutiques.

Les résultats obtenus par la recherche menée au cours de cette thèse de doctorat renforcent l'idée que pour développer des traitements efficaces dans ce genre de maladie, chaque maladie doit être analysé et étudiée dans son propre contexte et non comme une d'un groupe de maladies.