

STRESZCZENIE

Ewelina Posyniak

Lokalizacja i funkcje małego białka szoku cieplnego HSPB8 w mięśniach szkieletowych

Danio rerio

Małe białko szoku cieplnego Hspb8 jest jednym z białek opiekuńczych, które odgrywają kluczową rolę w ochronie komórek przed stresem środowiskowym. U człowieka mutacje genów kodujących sHsps są związane z występowaniem wielu chorób, w tym miopatii oraz neuropatii. Mutacja w genie *hspb8* wywołuje ludzką chorobę m.in. chorobę Charcot-Marie-Tooth i dystalną dziedziczną neuropatię ruchową. W obu przypadkach molekularne mechanizmy leżące u podstaw tych chorób nie zostały dobrze poznane. Wysokie podobieństwo genetyczne pomiędzy człowiekiem a *Danio rerio*, jak również szereg cech osobniczych danio pręgowanego sprawiają, że organizm ten jest użytecznym modelem w badaniach chorób człowieka o podłożu genetycznym, w tym spowodowanych mutacjami w obrębie genu *hspb8*.

Danio pręgowany został włączony do moich badań z uwagi na szereg zalet m.in. podobieństwa budowy tkanek i narządów do człowieka, łatwość w prowadzeniu hodowli, krótki cykl życiowy, duża liczba potomstwa pozyskiwana z jednej samicy. Ważnym powodem decydującym o szerokim zainteresowaniu naukowców *D. rerio* jest wysokie podobieństwo genomu zwierzęcia do genomu ludzkiego. W przypadku genu *hspb8* podobieństwo z genem ludzkim wynosi ponad 90%. Tak wysoka homologia może sugerować pokrewieństwo funkcjonalne białek Hspb8 ryby i człowieka.

Dotychczas funkcja Hspb8 podczas rozwoju oraz u osobników dorosłych *D. rerio* była słabo poznana. W projekcie doktorskim przeprowadziłam analizę ekspresji oraz lokalizacji tkankowej i subkomórkowej małego białka soku cieplnego Hspb8 *D. rerio*. W badaniach wykorzystałam liczne techniki stosowane w biologii molekularnej (m.in. PCR, RT-qPCR, WB, immunofluorescencja, koimmunoprecypitacja, LC-MS). Badania wykazały, że ekspresja *hspb8* *D. rerio* podczas embriogenezy wzrasta i jest ściśle kontrolowana, co sugeruje ważną rolę rozwojową tego białka. Ze względu na wzrost poziomu transkryptu *hspb8* podczas rozwoju można sądzić, że Hspb8 pełni funkcję opiekuńczą a obecność w linii „Z” sarkomerów

świadczy o strukturalnej funkcji tego białka w mięśniach szkieletowych *D. rerio*. Wykazana obecność Hspb8 w organach *D. rerio* (serce, mózg, wątroba, nerki), świadczy o tym, że białko to jest niezbędne do utrzymania ich proteostazy. Wykazanie partnerów białkowych Hspb8 potwierdziło zaangażowanie Hspb8 w proces tworzenia kompleksu indukującego autofagię oraz udział w biogenezie autofagosomów (Bag3, Hsc70, 14-3-3, dyneina, LC3I/II). Wykazałam również funkcję Hspb8 w prawidłowym funkcjonowaniu neuronów (poprzez interakcje z białkiem Ddx20 i synaptogaminą). Przeprowadzone przez mnie badania przyczynią się lepszemu zrozumieniu molekularnych podstaw chorób powodowanych mutacjami w genie *hspb8*, takich jak choroba Charcot-Marie-Tooth i dystalna dziedziczna neuropatia ruchowa.

ABSTRACT

Ewelina Posyniak

Localization and functions of the small heat shock protein HSPB8 in *Danio rerio* skeletal muscles

The small heat shock protein Hspb8 is one of the chaperone proteins that play a key role in protecting cells from environmental stresses. In humans, mutations in the genes encoding sHsps are associated with the occurrence of many diseases, including myopathy and neuropathy. Mutations in the *hspb8* gene cause human diseases, including Charcot-Marie-Tooth and distal hereditary motor neuropathy. In both cases, the molecular mechanisms underlying these diseases are not well understood. The high genetic similarity between humans and *Danio rerio*, as well as a number of individual characteristics of zebrafish, make this organism a useful model for studying the genetic basis of human diseases, including those caused by mutations within the *hspb8* gene. The zebrafish has been used in my research because of a number of advantages, including similarities in tissue and organ structure to humans, ease of breeding, short life cycle, and large number of offspring from a single female. An important reason for the broad scientific interest in *D. rerio* is the high similarity of the animal's genome to the human genome. In the case of the *hspb8* gene, the similarity to the human gene is more than 90%. Such high homology may suggest a functional relationship between the Hspb8 proteins of fish and humans.

The function of Hspb8 during development and in *D. rerio* adults has, to date, remained poorly understood. In my PhD project I have conducted an analysis of the expression and tissue and subcellular localization of the small heat shock protein Hspb8 in *D. rerio*. In the conducted research, a range of techniques applied in molecular biology were employed, including RT-qPCR, WB, immunofluorescence, co-immunoprecipitation and LC-MS. It has been demonstrated that the expression of *hspb8* in *D. rerio* is increased and tightly controlled during embryogenesis, indicating that this protein plays a significant role in developmental processes. Given the observed increase in *hspb8* transcript levels during development, it can be postulated that Hspb8 plays chaperon function and that its presence in the Z-line of *D. rerio* skeletal muscle indicates a structural function. The demonstrated presence of Hspb8 in *D. rerio* organs (heart, brain, liver, kidney) indicates that this protein is essential for the maintenance of their

proteostasis. The demonstration of Hspb8 protein partners confirmed the involvement of Hspb8 in the formation of the autophagy-inducing complex and participation in autophagosome biogenesis (Bag3, Hsc70, 14-3-3, dynein, LC3I/II). Furthermore, I have demonstrated the function of Hspb8 in properly neuronal function (through interactions with Ddx20 protein and synaptotagmin). My research will contribute to a better understanding of the molecular basis of diseases caused by mutations in the *hspb8* gene, such as Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy.