

**„Molekularne mechanizmy regulacji ekspresji genów w komórkowych i  
zwierzęcych modelach choroby Huntingtona”  
mgr Aneta Szulc**

Choroby neurodegeneracyjne stanowią heterogenną grupę schorzeń charakteryzującą się postępującym uszkodzeniem i utratą neuronów w różnych obszarach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Towarzyszą im zmiany histologiczne i hematologiczne, przekładające się na kliniczne objawy patologiczne. Mechanizm neurodegeneracji obejmuje utratę neuronów oraz współwystępujące zaburzenia wynikające z defektów na poziomie molekularnym, takich jak patologiczna agregacja białek, dysfunkcja synaps i sieci neuronalnych, zaburzona proteostaza, nieprawidłowości cytoszkieletu, zmieniona homeostaza energetyczna, uszkodzenia DNA i RNA, stan zapalny oraz śmierć komórek nerwowych.

Flawonoidy stanowią dużą podgrupę polifenoli, obejmującą ponad 6000 związków występujących w produktach pochodzenia naturalnego. Ze względu na liczne właściwości, takie jak działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne oraz zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg, są one coraz częściej brane pod uwagę w poszukiwaniu terapii dla wielu chorób. Przykładowe mechanizmy chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera (AD), choroba Parkinsona (PD), stwardnienie zanikowe boczne (ALS) oraz choroba Huntingtona (HD), a także główne grupy flawonoidów, ich właściwości i najczęściej opisywane mechanizmy działania neuroprotektoryjnego, zostały omówione w następującym artykule przeglądowym, wchodzącym w skład tej rozprawy doktorskiej: Szulc, A., Wiśniewska, K., Żabińska, M., Gaffke, L., Szota, M., Olendzka, Z., Węgrzyn, G., & Pierzynowska, K. (2024). Effectiveness of flavonoid-rich diet in alleviating symptoms of neurodegenerative diseases. *Foods*, 13, 1931.

W niniejszej rozprawie doktorskiej położono nacisk na HD, jedną z najczęstszych chorób neurodegeneracyjnych związanych z agregacją białek. Należy ona do grupy monogenowych chorób poliglutaminowych (PolyQ), czyli dziedzicznych zaburzeń neurologicznych spowodowanych zwiększoną liczbą powtórzeń trinukleotydów CAG (cytozyna, adenina, guanina). W HD zwiększona liczba powtórzeń CAG występuje w genie *HTT*, kodującym białko huntingtynę (HTT). Patogeny wariant *HTT* prowadzi do powstania nieprawidłowo sfałdowanego białka z wydłużonym odcinkiem reszt glutaminowych, tworzącego toksyczne, trudne do usunięcia agregaty. Agregaty te, wraz z nieprawidłowymi strukturami drugorzędowymi zmutowanego mRNA *HTT*, wpływają na proces splicingu poprzez sekwestrowanie składników spliceosomu. Te dwa elementy są uznawane za kluczowe defekty inicjujące kaskadę zaburzeń funkcjonowania komórki, prowadzącą do rozwoju objawów patologicznych u pacjentów. Liczba powtórzeń CAG niższa niż 27 uznawana jest za prawidłową. Zakres 27–35 powtórzeń wiąże się z ryzykiem pojawienia się objawów choroby w kolejnych pokoleniach, natomiast ponad 36 powtórzeń prowadzi do manifestacji choroby. Pomimo obecności zwiększonej liczby powtórzeń CAG już na etapie zygoty, pierwsze objawy choroby obserwuje się w trzeciej lub czwartej dekadzie życia. Najnowsze doniesienia sugerują, że za patogenność oraz

opóźniony początek choroby może odpowiadać somatyczna ekspansja powtórzeń CAG do ponad 150 kopii w trakcie życia chorego. Niemniej jednak nadal nie jest jasne, dlaczego taka ekspansja występuje wyłącznie w komórkach posiadających allele *HTT*, w których pierwotna liczba powtórzeń CAG przekracza 36. Ponieważ HD jest obecnie chorobą nieuleczalną, oczywistym jest poszukiwanie strategii terapeutycznych umożliwiających skuteczne leczenie tej choroby. Opracowanie nowych leków wymaga jednak dogłębnego zrozumienia molekularnych mechanizmów choroby będącej celem terapii.

W moich badaniach zastosowałam komórkowe modele choroby Huntingtona (HD) oparte na linii HEK293. Linie te zostały wcześniej skonstruowane z zastosowaniem mutagenyzy CRISPR-Cas9 i obejmowały linię kontrolną zawierającą 16/17 powtórzeń CAG w eksonie 1 genu *HTT* (HEK) oraz linie HD zawierające 41, 53 lub 84 powtórzenia CAG (odpowiednio HEK 41, HEK 53 i HEK 84). W badaniach wykorzystywano również myszy, genetycznie modyfikowany model HD R6/1 (116 powtórzeń CAG) oraz myszy kontrolne C57BL/6J.

W pracy Szulc, A., Walter, B., Gaffke, L., Wiśniewska, K., Żabińska, M., Rintz, E., Cyske, Z., Grabski, M., Pankiv, O., Podlacha, M., Pierzynowska, K., & Węgrzyn, G. (2026). Extensive transcriptomic changes in cellular and animal models of Huntington's disease depending on the length of CAG repeats in the exon 1 of the *HTT* gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 816, 153711 z zastosowaniem AlphaFold 3 przewidziane zostały struktury białkowe ludzkich wariantów *HTT* z 16, 41, 53 i 84 powtórzeniami CAG. Ujawniły się istotne zmiany w formach patogennych w porównaniu z formą prawidłową. W dalszej części pracy analizowane były globalne zmiany w ekspresji genów w komórkowym i zwierzęcym modelu HD względem kontroli oraz w obrębie modelu komórkowego, w liniach zawierających różną liczbę powtórzeń CAG (41, 53, 84).

Zaobserwowałam, że patologiczne wydłużenie ciągu glutamin może prowadzić do przewidywanej reorientacji N-końcowego regionu polyQ. Wyniki te sugerują, że patomechanizm HD może wykraczać poza tradycyjny pogląd o agregacji białek indukowanej przez polyQ, wskazując na możliwość zmian konformacyjnych wynikających z konkretnej długości polyQ, wpływających na przebieg choroby, co jest zgodne z niedawnymi propozycjami dotyczącymi somatycznej ekspansji powtórzeń CAG i jej dalszych konsekwencji. Przedstawione modele AlphaFold 3, które opisują monomeryczną *HTT*, należy interpretować jednak jako hipotezy dotyczące stanu „apo”, który do tej pory nie został bezpośrednio stwierdzony w badaniach strukturalnych.

Analizy transkryptomyczne wykazały obecność tysięcy genów o zaburzonej ekspresji w komórkach HEK41 (2892 geny), HEK53 (4193 geny) oraz HEK84 (6091 genów) w porównaniu z linią kontrolną HEK. Ponadto w komórkach mózgowych myszy R6/1 zidentyfikowałam 4185 genów o zaburzonej ekspresji w porównaniu z komórkami myszy typu dzikiego. Zarówno w komórkowym, jak i zwierzęcym modelu choroby zmiany te dotyczyły funkcji mitochondriów, apoptozy, autofagii, odpowiedzi zapalnej, replikacji i naprawy DNA, ale także odpowiedzi na uszkodzenia DNA i stres. Ponadto zaburzenia dotyczyły ekspresji genów zaangażowanych w transport białek i neurotransmiterów na różnych etapach funkcjonowania komórek. Oczywiście zmiany transkryptomiczne

są konsekwencją obecności patogennych form HTT, a nie pierwotną przyczyną choroby, jednak podwyższony poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w połączeniu z zaburzeniami ekspresji dziesiątek genów odpowiedzialnych za odpowiedź na stres, odpowiedź na uszkodzenia DNA i zaburzenia odpowiadające specyficznym procesom mogą sprzyjać somatycznej ekspansji trójek CAG w komórkach zawierających patogenne allele *HTT*.

Spośród wspomnianych procesów, w obrębie których obserwowałam najliczniejsze zaburzenia globalnej regulacji ekspresji genów, kluczowa w kontekście degradacji toksycznych form mHTT jest autofagia. Proces ten jest ściśle regulowany w komórce a jego podstawową funkcją jest utrzymywanie homeostazy. Odpowiada on za usuwanie uszkodzonych organelli, długo żyjących białek, agregatów białkowych, kompleksów makrocząsteczkowych oraz innych nieprawidłowych struktur wewnątrzkomórkowych. Makroautofagia rozpoczyna się od utworzenia fagoforu czyli błony, która stopniowo wydłuża się i otacza elementy przeznaczone do degradacji. Tak powstały autofagosom dojrzewa i łączy się z lizosomem tworząc autofagolizosom, wewnątrz którego dzięki niskiemu pH i obecności enzymów hydrolitycznych dochodzi do degradacji jego zawartości. Powstałe produkty mogą ponownie zostać wykorzystane przez komórkę.

Wykorzystywanie modulatorów autofagii przynosi obiecujące rezultaty w komórkowych i zwierzęcych modelach HD. Jednak silne stymulatory autofagii, takie jak rapamycyna i inne związki, mimo że są bardzo użyteczne w badaniach laboratoryjnych, nie mogą być stosowane w praktyce klinicznej u pacjentów z chorobami wymagającymi leczenia przez całe życie, ze względu na działania niepożądane wywoływane podczas długotrwałego podawania. Dlatego w kontekście mojej pracy szczególnie obiecujące było wykorzystanie genisteiny (4',5,7-trihydroksyizoflawonu lub 5,7-dihydroksy-3-(4-hydroksyfenylo)-4H-1-benzopiran-4-onu). Związek ten może do pewnego stopnia stymulować autofagię przy jednoczesnym korzystnym profilu bezpieczeństwa.

Przy zastosowaniu specyficznych przeciwciał anti-HTT, we wszystkich trzech badanych liniach komórkowych zaobserwowałam zwiększoną intensywność fluorescencji pochodzącej od HTT w porównaniu z linią kontrolną. Po zastosowaniu genisteiny intensywność fluorescencji uległa istotnemu obniżeniu, co może wskazywać na zmniejszenie ilości zmutowanej huntingtyny (mHTT). Redukcja liczby agregatów może zachodzić za pośrednictwem modulacji autofagii.

W modelach HD stwierdziłam zaburzenia ekspresji licznych genów związanych z autofagią, obejmujące zarówno ich indukcję, jak i represję względem komórek kontrolnych. Liczba genów o zmienionej ekspresji zwiększała się wraz ze wzrostem liczby powtórzeń CAG w genie *HTT*. Szczególnie często podwyższoną ekspresję wykazywały geny kodujące negatywne regulatory autofagii, natomiast geny niezbędne do jej prawidłowego przebiegu charakteryzowały się zróżnicowanym profilem ekspresji. W obecności genisteiny nasiliły się obserwowane zmiany, przy czym dominowała indukcja genów zaangażowanych w pozytywną regulację autofagii. Podobne zależności obserwowałam również dla genów związanych z poszczególnymi typami autofagii.

W celu określenia interakcji pomiędzy białkami będącymi produktami genów o zmienionej ekspresji wykonałam modelowanie sieci interakcji białkowych w oparciu o bazę STRING. Określiłam białka kodowane przez geny, których ekspresja uległa zmianie, a wśród nich te, których ekspresja powróciła do poziomu kontrolnego po zastosowaniu genisteiny. Pozwoliło to wytypować potencjalne punkty działania terapeutów. W kolejnym etapie, metodą Western blot określiłam poziomy białek zaangażowanych w inicjację autofagii zależną od ULK1 oraz w elongację autofagosomu związaną z Atg12 i LC3-I/II. Wykazałam, że zaburzenie autofagii w HD zachodzi głównie na etapie inicjacji tego procesu i obejmuje obniżenie poziomów pULK1(Ser555) oraz Atg13. Genisteina może natomiast przywracać prawidłowy przebieg autofagii poprzez mechanizmy obejmujące zwiększenie wydajności fosforylacji ULK1(Ser555) oraz podwyższenie poziomu Atg13, jednak nie ograniczając się wyłącznie do nich. Jednoczesne zwiększenie poziomów pULK1(Ser757) i białka Rubicon, które są znanymi negatywnymi regulatorami autofagii, zapobiega nadmiernej stymulacji tego procesu przez badany izoflawon. Taka nadmierna aktywacja autofagii byłaby problematyczna w przypadku długotrwałego jego stosowania, natomiast łagodna lecz skuteczna stymulacja może z jednej strony pozwalać na efektywną degradację mHTT, a z drugiej być bezpieczna dla organizmu. Bardziej szczegółowa analiza zaburzeń procesów autofagii oraz wpływu genisteiny przedstawiona została w artykule Szulc, A., Wiśniewska, K., Szota, M., Żabińska, M., Pierzynowska, K., Gaffke, L., & Węgrzyn, G. (2026). Autophagy disorders and their improvement by 4',5,7-trihydroxyisoflavone in cellular models of Huntington's disease. [Manuskrypt złożony do czasopisma *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease* BBADIS-26-4684].

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania dotyczyły molekularnych mechanizmów HD, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu długości ekspansji powtórzeń CAG w genie *HTT* na zmiany strukturalne HTT, regulacje ekspresji genów i przebieg autofagii. Przewidywania strukturalne sugerują, że wydłużenie odcinka poliglutaminowego może zmieniać konformację huntingtyny. Analizy transkryptomiczne wykazały liczne zaburzenia ekspresji genów, nasilające się wraz ze wzrostem liczby powtórzeń CAG i obejmujące m.in. funkcje mitochondriów, odpowiedź na stres i uszkodzenia DNA oraz autofagię - proces kluczowy dla prawidłowego usuwania mHTT. Szczegółowe badania wskazały na zaburzenie inicjacji autofagii w modelach HD, związane z obniżeniem poziomów pULK1(Ser555) i Atg13. Genisteina zwiększała poziomy tych białek oraz zmniejszała intensywność fluorescencji sygnału HTT w badaniach immunocytochemicznych, co może wskazywać na redukcję ilości zmutowanej huntingtyny. Wyniki te sugerują, że genisteina może modulować autofagię na etapie inicjacji tego procesu, a przez to stanowić potencjalny kierunek dalszych badań nad terapią HD.