

"Zmiany w mitochondriach ludzkich komórek niosących mutację w genie IT15"

Paulina Mozolewska

Choroba Huntingtona jest dziedzicznym schorzeniem neurodegeneracyjnym, wywołanym nadmierną ekspansją trójki nukleotydowej – CAG w pierwszym egzonie genu *IT15* (*HTT*) kodującym huntingtynę. Jest to choroba rzadka, występująca z częstością od 5 do 10 na 100 000 żywych urodzeń, ale jednocześnie jest najczęściej występującym dziedzicznym zaburzeniem neurodegeneracyjnym. W wyniku mutacji u chorych dochodzi do postępującej utraty komórek nerwowych w skorupie oraz jądrze ogoniastym mózgu, co w konsekwencji prowadzi do wystąpienia objawów choroby takich jak zaburzenia psychiczne, poznawcze i fizyczne. Długość ciągu powtórzeń CAG (kodującego łącznik poliglutaminowy) w zmutowanym genie stanowi czynnik diagnostyczny. U osób całkowicie zdrowych jego długość nie przekracza 26 powtórzeń, natomiast chorobę diagnozuje się powyżej 40 powtórzeń. Zakres pomiędzy 27 a 39 charakteryzuje grupy przejściowe, czyli osoby, u których choroba nie rozwinię się lub rozwinię się w bardzo późnym wieku. Liczba powtórzeń CAG negatywnie koreluje z momentem wystąpienia choroby. Czynnikiem ten stanowi obecnie podstawową metodę prognozowania postępu choroby, jednak posiada wiele ograniczeń wynikających z niestabilności ekspansji tej trójki nukleotydowej.

Huntingtyna jest dużym białkiem (348 kDa) obecnym w całym organizmie, a najwyższe jej stężenie notuje się w mózgu oraz jądrach. Jego funkcja wciąż nie jest dostatecznie poznana, jednak różni się w zależności od lokalizacji w komórce. W cytoplazmie bierze udział między innymi w transporcie komórkowym i endocytozie, zaś w jądrze komórkowym reguluje transkrypcję genów. Ponadto jest bezpośrednio związana z aparatem Golgiego, siateczką śródplazmatyczną czy zewnętrzną błoną mitochondrialną. Odgrywa ona ważną rolę w regulacji apoptozy i jest niezbędna w embriogenezie. Huntingtyna oddziałuje również z ponad 200 różnymi białkami. Wciąż nie wiadomo, czy mutacja w genie *IT15* prowadzi do utraty prawidłowych funkcji huntingtyny, czy nabycia dodatkowych, toksycznych aktywności w komórce. Zmieniona forma huntingtyny charakteryzuje się spowolnioną degradacją proteosomalną, co prowadzi do jej agregacji w cytoplazmie oraz w jądrze neuronów. Najprawdopodobniej to właśnie agregacja nieprawidłowego białka prowadzi do postępującej degeneracji tych komórek, jednak dokładny mechanizm wywołujący chorobę nie został jeszcze poznany.

Manifestacja choroby zaczyna się najczęściej między 35 a 50 rokiem życia, chociaż obserwuje się również młodocianą (objawy zaczynają pojawiać się poniżej 20 roku życia)

oraz późną (manifestacja choroby rozpoczyna się po 60 roku życia) odmianę tej choroby. Zazwyczaj jako pierwsze pojawiają się problemy emocjonalne, skłonności do spadku nastroju czy depresji, a kolejne są zaburzenia czynności poznawczych. Ostatnie, ale najbardziej charakterystyczne, ujawniają się problemy fizyczne, czyli wykonywanie nieskoordynowanych, mimowolnych ruchów zwanych pływawiczymi, które w zaawansowanym etapie choroby przekształcają się w ogólną sztywność mięśni. Po 25 latach od odkrycia genu odpowiedzialnego za wywołanie choroby wciąż nie istnieje żadna terapia stosowana w leczeniu tej choroby. W kuracji farmakologicznej stosuje się jedynie leki poprawiające komfort życia pacjenta, zmniejszając manifestację poszczególnych objawów. Od około 15 do 20 lat po wystąpieniu pierwszych objawów choroby pacjent umiera. Wśród obecnie prowadzonych badań nad nowymi podejściami terapeutycznymi najbardziej obiecującą wydaje się być terapia z zastosowaniem oligonukleotydów antysensownych oraz stymulacja procesu autofagii. Należy jednak pamiętać, że równie ważne co projektowanie nowych podejść terapeutycznych jest poszukiwanie biomarkerów choroby, które pozwolą ustalić najlepszy moment rozpoczęcia przyszłych terapii dla każdego pacjenta.

Pierwsze hipotezy dotyczące roli mitochondriów w przebiegu choroby Huntingtona pojawiły się po obserwacji defektów mitochondrialnych i stresu oksydacyjnego w materiale biologicznym pozyskanym od pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi. Do dziś w tej jednostce chorobowej wykazano obecność wielu zaburzeń mitochondrialnych, które różnią się swoim charakterem i natężeniem w zależności od użytego modelu lub badanej tkanki. Wciąż jednak nieznany pozostaje mechanizm odpowiedzialny za zaburzenie pracy mitochondriów. Niektóre obserwacje mogą sugerować, że zaburzenia metaboliczne (np. spadek masy ciała przy niezmienionej kaloryczności diety, obniżony poziom metabolizmu glukozy, czy zwiększony poziom mleczanów w mózgu pacjentów) wiążą się z najwcześniejszymi etapami choroby. Do tej pory nie wyjaśniono, czy defekty mitochondrialne przyczyniają się do utraty neuronów, czy są efektem ich postępującej degeneracji. Warto podkreślić, że najlepiej scharakteryzowane są zaburzenia mitochondrialne w neuronach, natomiast ich charakter w tkankach peryferycznych jest wciąż słabo poznany. Poszerzenie wiedzy na temat profilu dysfunkcji mitochondriów poza ośrodkowym układem nerwowym wydaje się być obecnie niezwykle ważne. Coraz częściej choroba Huntingtona postrzegana jest jako zaburzenie systemowe, obejmujące peryferyczne nieprawidłowości. U chorych obserwuje się większą zachorowalność na choroby sercowe, osteoporozę, zanik mięśni szkieletowych czy obniżony poziom testosteronu u mężczyzn.

Celem przedstawianej przeze mnie rozprawy doktorskiej było zbadanie potencjalnych dysfunkcji mitochondrialnych w tkankach peryferycznych (komórkach krwi oraz fibroblastach skóry) pozyskanych od pacjentów na różnych etapach choroby Huntingtona oraz korelacja otrzymanych wyników ze stopniem zaawansowania choroby. Badania zostały wykonane z użyciem krwi oraz fibroblastów skóry pochodzących od osób chorych, zarejestrowanych w polskim rejestrze Europejskiego Stowarzyszenia Choroby Huntingtona (EHDN). Osoby zarejestrowane w tej bazie mają dobrze opisaną historię choroby, co umożliwiło przeprowadzenie kompleksowej analizy statystycznej pod kątem korelacji wyników ze stopniem zaawansowania choroby. W analizie wykorzystano również materiał pozyskany od odpowiednio wyselekcjonowanej grupy kontrolnej, w której nie zanotowano przypadków choroby w wywiadzie rodzinnym i dobranej pod kątem płci oraz wieku pacjentów.

Pierwszym realizowanym celem prac badawczych było zbadanie poziomu mitochondrialnego DNA (mtDNA) w krwi oraz fibroblastach u pacjentów na różnych etapach choroby oraz korelacja wyników ze stopniem jej zaawansowania. Poziom mtDNA jest oznaczany jako stosunek mtDNA do DNA jądrowego (nDNA) z zastosowaniem reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time quantitative PCR*, *real-time qPCR*). Po zapoznaniu się z danymi literaturowymi dotyczącymi metodyki okazało się, że pomimo używania tej samej metody (qPCR), wiele wyników nie może zostać porównywanych, z uwagi na użycie innych protokołów eksperymentalnych w różnych ośrodkach badawczych. Postanowiłam przeprowadzić eksperymenty umożliwiające dobór optymalnych warunków doświadczalnych do dalszych badań. Po wykonaniu eksperymentów polegających na wykorzystaniu różnych warunków przechowywania próbek krwi, przeprowadzenia izolacji DNA zarówno z krwi pełnej, jak i samych leukocytów oraz izolacji DNA z fibroblastów na różnych pasażach, opracowano odpowiedni protokół. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność natychmiastowej (maksymalnie do 3 godzin od momentu pobrania materiału) izolacji całkowitego DNA z próbek krwi. Analiza rezultatów wykazała również, że wyniki otrzymane w wyniku doświadczeń prowadzonych na DNA wyizolowanym z pełnej krwi oraz leukocytów nie powinny być ze sobą bezpośrednio porównywane, przez wzgląd na różną zawartość składników krwi, takich jak płytki krwi, jak również możliwe uwalnianie pozakomórkowego nDNA i mtDNA do surowicy i osocza. Dodatkowo zaobserwowałam znaczący wpływ liczby pasażu linii komórkowej na wyniki analizy poziomu mtDNA. Z uwagi na możliwą utratę fenotypu chorobowego w fibroblastach na wyższych pasażach

komórkowych, zasugerowałam konieczność przeprowadzania pomiaru poziomu mtDNA w komórkach podczas maksymalnie piątego pasażu (publikacja nr 1 w cyklu).

Następnym etapem pracy było zbadanie poziomu mtDNA w komórkach krwi oraz fibroblastach pacjentów na różnych etapach choroby z zastosowaniem wytycznych opisanych w pierwszej publikacji. Analizie poddano próbki krwi pozyskane od 62 objawowych pacjentów oraz 22 przed-objawowych, kontrolę zaś stanowiło 79 zdrowych osób. Ocena wybranych parametrów przy zastosowaniu fibroblastów skórnych została przeprowadzona na materiale uzyskanym od 10 objawowych pacjentów i 9 osób stanowiących kontrolę. Uzyskane w tej części pracy wyniki wskazują, że w leukocytach krwi pacjentów przed-objawowych i objawowych dochodzi do zwiększenia relatywnego poziomu mtDNA w stosunku do kontroli. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych przy zastosowaniu fibroblastów sugerują odwrotną tendencję, czyli spadek relatywnego poziomu mtDNA w fibroblastach pozyskanych od symptomatycznych pacjentów w porównaniu do kontroli. Jedną z hipotez tłumaczących powyższe rozbieżności może być ewentualny wpływ zażywanych leków na wyniki eksperymentów przeprowadzonych w oparciu o materiały otrzymane z próbek krwi. Pacjenci niejednokrotnie przyjmują wiele leków jednocześnie, a część z nich może oddziaływać na funkcjonowanie mitochondriów oraz poziom mtDNA. Ponadto, przeprowadzono korelację wyników z wiekiem pacjentów oraz z wieloma parametrami opisującymi poziom zaawansowania choroby, z uwzględnieniem różnych objawów. Korelację przeprowadzono również dla wzrostu, wagi, BMI (ang. *Body Mass Index*) oraz innych parametrów środowiskowych, tj. spożywanie alkoholu i palenie papierosów (liczba wypitych jednostek alkoholu tygodniowo, liczba wypalanych papierosów dziennie i liczba lat palenia). Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, iż poziom mtDNA we krwi nie koreluje w sposób istotny z żadnym z badanych czynników. Opisane powyżej badania przedstawione zostały w publikacji nr 2.

Kolejnym etapem mojej pracy było bardziej szczegółowe opisanie profilu parametrów mitochondrialnych w fibroblastach skóry pozyskanych od pacjentów. Wyniki tej części mojej rozprawy doktorskiej zostały szczegółowo opisane w kolejnej publikacji włączonej do niniejszej dysertacji (publikacja nr 3). Z uwagi na wyniki wcześniejszych doświadczeń, wszystkie procedury w tej pracy zostały przeprowadzone na komórkach znajdujących się między 5 a 10 pasażem.

Pierwszym etapem pracy było zbadanie tempa wzrostu fibroblastów pozyskanych od pacjentów. Zaobserwowano, że linie komórkowe pozyskane od pacjentów rosną wolniej od linii kontrolnych, co może wskazywać na zaburzenia w cyklu komórkowym lub w metabolizmie komórki. Aby zweryfikować pierwszą z tych hipotez przeprowadzono analizę cyklu komórkowego po wcześniejszej synchronizacji komórek poprzez hodowanie ich w pożywce bez surowicy. Uzyskane dane wykazały, że mimo kilku istotnych statystycznie różnic w przebiegu cyklu komórkowego w pojedynczych liniach komórkowych pozyskanych od pacjentów, z biologicznego punktu widzenia można wykluczyć wpływ zaburzeń cyklu komórkowego na wzrost komórek. W związku z powyższymi wynikami poddano weryfikacji drugą hipotezę, mówiącą, że spowolniony wzrost komórek pobranych od chorych jest spowodowany defektami metabolicznymi przejawiającymi się zaburzeniami funkcjonowania mitochondriów. W tym celu w pierwszej kolejności ocenie poddałam poziom ATP, który jest istotnym parametrem zaburzeń bioenergetycznych w komórce. Pomiary poziomu ATP zostały wykonane w hodowlach komórkowych prowadzonych z pożywką z glukozą oraz bez glukozy, w której galaktoza służyła za główne źródło węgla. Stwierdzono, iż w obu warunkach hodowlanych fibroblasty pacjentów charakteryzują się obniżonym poziomem ATP, a obniżenie to jest bardziej widoczne, w komórkach z zahamowanym procesem glikolizy, czyli hodowanych w pożywce pozbawionej glukozy.

Następnie za pomocą testu z rezazuryną, który poprzez ocenę stopnia redukcji tego związku pośrednio wyraża ogólną aktywność metaboliczną mitochondriów, wykazano, że komórki pozyskane od chorych mają istotnie niższą relatywną aktywność metaboliczną niż komórki kontrolne. Następnie zbadano potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej, od którego po części może zależeć poziom ATP. Co zaskakujące, parametr ten w fibroblastach chorych był taki sam, jak w komórkach kontrolnych, sugerując, że spadek poziomu ATP nie jest wywołany zaburzeniami w potencjale na wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

W kolejnym etapie postanowiłam sprawdzić poziom wybranych podjednostek kompleksów mitochondrialnego łańcucha oddechowego, których niższy poziom mogłoby tłumaczyć obniżoną aktywność metaboliczną mitochondriów oraz obniżony poziom ATP. Ponadto, analizie poddano poziom białka TOM20, będącego markerem masy mitochondrialnej. Zabieg ten miał na celu sprawdzenie, czy ewentualne różnice nie są spowodowane zmianą w ilości mitochondriów w komórce. Uzyskane wyniki wyrażono jako stosunek do β -aktyny, która stanowiła kontrolę wewnętrzną potwierdzającą identyczną ilość białka nanoszonego na żel. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły określić, że zarówno

poziom badanych kompleksów łańcucha oddechowego, jak i masa mitochondriów nie są zaburzone w fibroblastach pacjentów.

Jednym z ostatnich etapów badań było określenie w fibroblastach HD poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) w cytoplazmie i mitochondriach oraz poziomu enzymów antyoksydacyjnych. Istotną informacją było wykazanie, że w mitochondriach dochodzi do niewielkiego, jednak istotnego statystycznie wzrostu anionorodnika ponadtlenkowego ($mt.O_2^{\bullet}$). W związku z powyższym zasadne było sprawdzenie poziomu enzymów antyoksydacyjnych: dysmutaz ponadtlenkowych 1 oraz 2 (SOD1, SOD2), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx1/2) oraz reduktazy glutationowej (GR). Analiza wykazała podwyższony poziom SOD2 oraz GR prawdopodobnie jako odpowiedź komórki na podwyższony poziom anionorodnika ponadtlenkowego, co może oznaczać obecność niewielkiego stresu oksydacyjnego w analizowanych komórkach pozyskanych od pacjentów.

Ostatnim etapem pracy było przeprowadzanie kompleksowej analizy statystycznej uwzględniającej parametry bioenergetyczne, poziom mtDNA, ROS i poziom enzymów antyoksydacyjnych i skorelowaniem zmian w tych parametrach ze stopniem zaawansowania choroby. W tym celu wykonano analizę składowych głównych (PCA). Skale opisujące stopień zaawansowania choroby zostały wybrane tak, aby charakteryzowały wszystkie rodzaje manifestacji choroby, czyli objawy psychiczne (wyrażone jako CGI – ang. *Clinical Global Impresion scale*), fizyczne (czas trwania objawów ruchowych) oraz opisujące ogólne funkcjonowanie pacjenta (TFC – ang. *Total Function Capacity*). Analiza wykazała, że profil parametrów mitochondrialnych w fibroblastach pacjentów różni się od fibroblastów kontrolnych. Ponadto zaobserwowano, że zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów są najbardziej wyraźne u pacjentów na wczesnych etapach choroby. Problemy ze strony psychicznej u większości chorych pojawiają się jako pierwsze, zaś nasze analizy wskazują, że różnice w charakterystyce profilu parametrów mitochondrialnych są szczególnie widoczne w analizie z uwzględnieniem skali CGI opisującej stan psychiczny pacjentów.

Choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Huntingtona, Alzheimera czy Parkinsona są obecnie jednym z poważniejszych zagrożeń dla rozwijających się, a jednocześnie starzejących społeczeństw. Oprócz oczywistych trudności związanych z opracowaniem nowych, potencjalnych terapii nie należy zapominać o poszukiwaniu specyficznych biomarkerów choroby, szczególnie w tkankach peryferycznych. Do tej pory brak jest wystarczających danych dotyczących defektów obserwowanych w tkankach

peryferycznych, w tym dysfunkcji mitochondrialnych. Podsumowując, realizacja niniejszego projektu stanowiącego moją rozprawę doktorską doprowadziła do scharakteryzowania profilu parametrów mitochondrialnych w leukocytach oraz fibroblastach pacjentów na różnych etapach choroby. Ponadto, korelacja otrzymanych wyników z danymi na temat przebiegu choroby pacjentów pozwoliła wykazać, że dysfunkcje mitochondrialne mogą być obecne w fibroblastach skóry już na wczesnych etapach choroby. Przedstawione w powyższej rozprawie badania sugerują, że w kontekście poszukiwania biomarkerów choroby związanych z funkcjonowaniem mitochondriów, kompleksowa analiza wielu parametrów mitochondrialnych wykazujących całościowy profil funkcjonowania mitochondriów wydaje się być obiecującym podejściem. Mając na uwadze niewielką liczbę zbadanych linii komórkowych należy podkreślić, że powyższe wyniki powinny zostać zweryfikowane na większej grupie badanych osób. Przeprowadzone przeze mnie badania stanowią również jedno z nielicznych doniesień dotyczących kompleksowej analizy nieprawidłowości mitochondrialnych w tkankach peryferycznych pacjentów z uwzględnieniem stopnia zaawansowania choroby. Powyższa praca stanowi poszerzenie stanu wiedzy na temat dysfunkcji mitochondrialnych w chorobie Huntingtona, co dodatkowo może być wykorzystane jako wstęp dla zrozumienia roli mitochondriów w ogólnym aspekcie neurodegeneracji.

Literatura:

1. **Jędrak P.**, Sowa N., Barańska S., Węgrzyn G., (2017). Characterization of conditions and determination of practical tips for mtDNA level estimation in various human cells. *Acta Biochimica Polonica*, 64(4), 699–704. doi: 10.18388/abp.2017_2303.
2. **Jędrak P.**, Krygier M., Tońska K., Drozd M., Kaliszewska M., Bartnik E., Sołtan W., Sitek E.J., Stanisławska-Sachadyn A., Limon J., Sławek J., Węgrzyn G., Barańska S. (2017). Mitochondrial DNA levels in Huntington disease leukocytes and dermal fibroblasts. *Metabolic Brain Disease*, 32(4), 1237-1247. doi: 10.1007/s11011-017-0026-0
3. **Jędrak P.**, Mozolewski P., Węgrzyn G., Więckowski M., (2018). Mitochondrial alterations accompanied by oxidative stress conditions in skin fibroblasts of Huntington's disease patients. *Metabolic Brain Disease*, doi: 10.1007/s11011-

018-0308-1.