

Mgr Katarzyna Anna Chabros

Patogenność mutacji w genie *GDAP1*  
Pathogenicity of mutations in the *GDAP1* gene

Rozprawa na stopień naukowy doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej Kochoński  
Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Dagmara Kabzińska



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora  
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, rok 2022

*Pragnę serdecznie podziękować  
Panu Prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Kochańskiemu  
za możliwość realizacji badań w Zespole Chorób Nerwowo-Mięśniowych,  
za przekazaną wiedzę, cenne wskazówki, opiekę merytoryczną oraz pomoc i wsparcie  
na każdym etapie mojego doktoratu.*

*Pragnę również podziękować  
Pani Dr hab. n. med. Dagmarze Kabzińskiej  
za poświęcony czas, niezastąpioną pomoc w prowadzeniu badań i przygotowaniu  
niniejszej pracy oraz życzliwość i miłą atmosferę w pracy.*

*Dziękuję również  
Dr hab. Joannie Kamińskiej  
za nieocenioną pomoc na każdym etapie przygotowywania niniejszej pracy,  
cenne uwagi i życzliwość.*

*Dziękuję  
Dr Weronice Rzepnikowskiej oraz wszystkim pozostałym Pracownikom Zespołu Chorób  
Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN za wszelką pomoc oraz przemiłą atmosferę  
w pracy.*

*Szczególnie dziękuję  
Moim Rodzicom oraz Mojemu Mężowi  
za wszelką pomoc, wyrozumiałość, cierpliwość, nieustanne wsparcie  
oraz nigdy niegasnącą wiarę w moje możliwości.*

*Niniejszą pracę dedykuję  
Moim Rodzicom,  
dzięki którym miałam możliwość kształcić się oraz zdobywać cenną wiedzę,  
którzy zawsze wierzyli w moje możliwości i wytrwale wspierali  
przez wszystkie lata nauki.*

Badania finansowano ze środków:

Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu OPUS 2016/23/B/NZ3/02035 oraz Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach grantu POWR.03.02.00-00-1028/17-00.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę komisji bioetycznej: Uchwała Nr 30/17 Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Warszawie z dnia 22 czerwca 2017 roku. Nr rejestru KB/1100/17.

Wyniki zamieszczone w niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane w ramach dwóch prac oryginalnych:

1. **Binięda, K.**, Rzepnikowska, W., Kolakowski, D., Kaminska, J., Szczepankiewicz, A. A., Nieznańska, H., Kochański, A., & Kabzińska, D. (2021). Mutations in *GDAP1* influence structure and function of the *trans*-Golgi network. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 914.
2. Kabzińska, D., **Chabros, K.**, Kamińska, J., & Kochański, A., (2022). The GDAP1 p.Glu222Lys variant - weak pathogenic effect, cumulative effect of weak sequence variants or synergy of both factors. *Genes*, 13(9), 1546.

Prace przeglądowe:

1. Kochański, A., Kabzińska, D., Rzepnikowska, W., **Binięda, K.**, & Kiepura, A. (2018). Perspektywy terapii w polineuropatiach genetycznie uwarunkowanych. *Postępy Biochemii*, 64(4), 288-299.
2. Rzepnikowska, W., Kaminska, J., Kabzińska, D., **Binięda, K.**, & Kochański, A. (2020). A yeast-based model for hereditary motor and sensory neuropathies: a simple system for complex, heterogeneous diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4277.

## SPIS TREŚCI

<b>ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW</b> .....	8
<b>STRESZCZENIE</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY</b> .....	16
<b>1. WSTĘP</b> .....	17
1.1 Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth .....	19
1.2 Perspektywy terapii eksperymentalnych w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth .....	25
1.3 Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth wywołane mutacjami w genie <i>GDAP1</i> .....	26
1.4 Gen <i>GDAP1</i> .....	27
1.5 Białko GDAP1 .....	28
<b>2. CELE PRACY</b> .....	32
<b>3. MATERIAŁY I METODY</b> .....	33
3.1 Pacjenci .....	33
3.2 Szczepy bakteryjne.....	35
3.3 Wektory plazmidowe .....	35
3.4 Startery wykorzystywane w pracy .....	36
3.5 Linie komórkowe .....	37
3.6 Metody badawcze.....	37
3.6.1 Zebranie dokumentacji medycznej pacjentów .....	37
3.6.2 Sekwencjonowanie całego egzomu .....	40
3.6.3 Analiza danych sekwencji egzomu .....	40
3.6.4 Opracowanie skali genotypowej i fenotypowej CMT-GDAP1.....	41
3.6.5 Wybór mutacji w genie <i>GDAP1</i> .....	44
3.6.6 Projektowanie starterów .....	44
3.6.7 Hodowla komórek bakteryjnych .....	44

3.6.7.1 Warunki hodowli bakteryjnych .....	44
3.6.7.2 Przygotowanie bakterii chemokompetentnych.....	45
3.6.7.3 Transformacja bakterii chemokompetentnych.....	45
3.6.7.4 Mutageneza genu <i>GDAP1</i> na plazmidzie pCMV6-XL5 .....	45
3.6.7.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) .....	46
3.6.7.6 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	46
3.6.7.7 Oczyszczanie fragmentów DNA .....	47
3.6.7.8 Sekwencjonowanie DNA.....	47
3.6.7.9 Określenie stężenia DNA plazmidowego .....	47
3.6.7.10 Przeklonowanie mutantów do wektora bicistronowego pIRES-AcGFP1 .....	47
3.6.7.11 Ligacja fragmentów DNA .....	47
3.6.7.12 Izolacja plazmidów w małej skali.....	47
3.6.7.13 Izolacja plazmidów w dużej skali .....	48
3.6.8 Hodowla komórek ssaczych .....	48
3.6.9 Transfekcja komórek ssaczych.....	49
3.6.10 Wyciszanie ekspresji genu <i>GDAP1</i> za pomocą siRNA .....	49
3.6.11 Oznaczanie żywotności komórek .....	49
3.6.12 Oznaczanie względnych ilości białka metodą Western-blot .....	50
3.6.13 Barwienie immunofluorescencyjne i mikroskopia konfokalna .....	52
3.6.14 Transmisyjna mikroskopia elektronowa.....	52
3.6.15 Analiza statystyczna .....	53
<b>4. WYNIKI .....</b>	<b>54</b>
4.1 Tło genetyczne choroby CMT-GDAP1 .....	54
4.1.1 Analiza wariantów sekwencji w innych „genach CMT” w grupie pacjentów CMT-GDAP1 .....	54
4.1.2 Analiza fenotypów pacjentów CMT-GDAP1 .....	56
4.1.3 Korelacja genotyp-fenotyp pacjentów CMT-GDAP1 .....	59

4.2 Wpływ wybranych mutacji genu <i>GDAP1</i> na komórki linii SH-SY5Y oraz HeLa .....	61
4.2.1 Wpływ poziomu białka GDAP1 na morfologię mitochondriów oraz aparatu Golgiego w komórkach SH-SY5Y .....	61
4.2.2 Wpływ wybranych wariantów genu <i>GDAP1</i> na poziom białka GDAP1 w komórkach HeLa .....	63
4.2.3 Wpływ obniżenia poziomu białka GDAP1 na morfologię aparatu Golgiego w komórkach HeLa .....	65
4.2.4 Wpływ obniżenia poziomu białka GDAP1 na zmiany w postranslacyjnych modyfikacjach białka TGN46 .....	67
4.2.5 Wpływ mutacji <i>GDAP1</i> p.Leu239Phe na lokalizację białka TGN46 w komórkach HeLa .....	69
4.2.6 Wpływ wybranych mutacji genu <i>GDAP1</i> na kształt komórek HeLa.....	71
4.2.7 Wpływ wybranych mutacji genu <i>GDAP1</i> na poziom wybranych białek mitochondrialnych w komórkach HeLa .....	74
4.2.8 Czy wybrane mutacje genu <i>GDAP1</i> powodują apoptozę komórek SH-SY5Y? .....	79
4.2.9 Badanie żywotności komórek SH-SY5Y .....	97
<b>5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA .....</b>	<b>99</b>
<b>6. WNIOSKI .....</b>	<b>117</b>
<b>SUPLEMENT .....</b>	<b>118</b>
<b>SPIS PIŚMIENICTWA .....</b>	<b>125</b>

## **ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW**

AD - dziedziczenie autosomalne dominujące

AIF - ang., *Apoptosis Inducing Factor*, czynnik indukujący apoptozę

Ala - alanina

Apaf-1 - ang., *Apoptotic Protease Activating Factor-1*

APS - nadsiarczan amonu

AR - dziedziczenie autosomalne recesywne

Asp - asparagina

Bax - ang., *Bcl2 Associated X*

Bcl2 - ang., *B-cell CLL/lymphoma 2*

Bcl-xl - ang., *B-cell lymphoma-extra large*

BSA - ang., *Bovine Serum Albumin*, albumina surowicy wołowej

CARTS - ang., *Carriers of the TGN to the cell Surface*

CIP - ang., *Conflicting Interpretation of Pathogenicity*

CMT - Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth

CMT1A - Charcot-Marie-Tooth typu 1A

CMT1B - Charcot-Marie-Tooth typu 1B

CMT2S - Charcot-Marie-Tooth typu 2S

CMT-GDAP1 - Charcot-Marie-Tooth wywołana mutacjami w genie *GDAP1*

DAPI - ang., *4'6-diamidino-2-phenylindole*

DMEM - ang., *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - ang., *Dimethyl Sulfoxide*, dimetylosulfotlenek

EDTA - ang., *Ethylenediaminetetraacetic Acid*, kwas wersenowy



ER - ang., *Endoplasmic Reticulum*, siateczka śródplazmatyczna

FBS - ang., *Fetal Bovine Serum*, płodowa surowica wołowa

GDAP1 - ang., *Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1*

GJB1 - ang., *Gap-Junction Beta 1*

Gln - glutamina

Glu - glutaminian

Gly - glicyna

GM130 - ang., *Golgi Matrix Protein*, 130 kD, białko części *cis* aparatu Golgiego

His - histydyna

HNPP - ang., *Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy*, Dziedziczna neuropatia z nadwrażliwością na ucisk

HSAN I - ang., *Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy type I*, Dziedziczna neuropatia czuciowa i autonomiczna

HSPB - ang., *Small Heat Shock Protein*, białka szoku cieplnego

IgG - ang., *Immunoglobulin G*, immunoglobuliny typu G

IGHMBP2 - ang., *Immunoglobulin mu-binding Protein 2*

Leu - leucyna

LITAF - ang., *Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis alpha factor*

Lys - lizyna

MAM - ang., *Mitochondria-associated membranes*, błony związane z mitochondriami

MFN2 - ang., *Mitofusin 2*, mitofuzyna 2

MNCV - ang., *Median Nerve Conduction Velocity*, włókna ruchowe nerwu pośrodkowego

MPZ - ang., *Myelin Protein Zero*

NCV - ang., *Nerve Conduction Velocity*, prędkość przewodzenia w nerwach obwodowych

NDUFS1 - ang., *NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S1*

NEFL - ang., *Neurofilament Light Chain*

OD - ang., *Optical Density*

PARP1 - ang., *Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1*

PBS - ang., *Phosphate Buffered Saline*, sól fizjologiczna buforowana fosforanem

pERK - ang., *Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase*

Phe - fenyloalanina

PMP22 - ang., *Peripheral Myelin Protein 22*

PMSF - ang., *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

Pro - prolina

ROS - ang., *Reactive Oxygen Species*, reaktywne formy tlenu

RVD - ang., *Regulatory Volume Decrease*

SDS - ang., *Sodium Dodecyl Sulfate*, dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE – ang., *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, elektroforeza białek w żelu denaturującym

SMARD1 – ang., *Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress type 1*, Rdzeniowy zanik mięśni z niewydolnością oddechową typu 1

SPTLC1 - ang., *Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 1*

TBS - ang., *Tris-Buffered Saline*, sól fizjologiczna buforowana za pomocą Tris

TEMED - ang., *Tetramethylethylenediamine*

TGN46 - ang., *Trans Golgi network protein*, 46 kDa, białko części *trans* aparatu Golgiego

TNF $\alpha$  - ang., *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* , czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$

TRIS - 2-amino-2-hydroksymetylo-propanodiol

VDAC1 - ang., *Voltage-dependent anion-selective channel 1*

VUS - ang., *Variants of Unknown Significance*, warianty o nieznanym znaczeniu

WES - ang., *Whole Exome Sequencing*, sekwencjonowanie całego eksomu

WGS - ang., *Whole Genome Sequencing*, sekwencjonowanie całego genomu

## STRESZCZENIE

Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT) nazywane również dziedzicznymi polineuropatiami ruchowo-czuciowymi (ang., *Hereditary Motor and Sensory Neuropathies*, HMSN), charakteryzują się powoli postępującym zanikiem i osłabieniem mięśni głównie dystalnych kończyn górnych i dolnych oraz zaburzeniami czucia. Jedną z przyczyn chorób CMT są mutacje w genie *GDAP1* (ang., *Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1*), które powodują kilka typów polineuropatii i mogą być dziedziczone zarówno w sposób autosomalny dominujący, jak i autosomalny recesywny. W przeciwieństwie do mutacji dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący w genie *GDAP1*, które wywołują na ogół łagodną postać choroby CMT-GDAP1 o późnym początku, mutacje dziedziczone w sposób autosomalny recesywny prowadzą zwykle do ciężkiej postaci dziedzicznej polineuropatii i niepełnosprawności ruchowej już w pierwszej lub drugiej dekadzie życia.

Gen *GDAP1* koduje białko zewnętrznej błony mitochondrialnej, które bierze udział w wielu kluczowych procesach komórkowych tj., tworzeniu sieci mitochondrialnej, transporcie mitochondrialnym, utrzymaniu bioenergetyki mitochondrialnej i homeostazy wapnia. Białko GDAP1 jest również zaangażowane w regulację interakcji pomiędzy mitochondriami, a siateczką śródplazmatyczną, oraz utrzymanie prawidłowej struktury peroksysomów. Jednak wiele aspektów funkcjonowania białka GDAP1, a także patomechanizm, w jakim działają jego mutacje, wciąż pozostają nieznane, a naturalny przebieg choroby CMT-GDAP1 dla poszczególnych mutacji jest dość wybiórczo scharakteryzowany.

Celem pracy była charakterystyka „tła genetycznego” towarzyszącego głównym patogennym wariantom sekwencji genu *GDAP1* u pacjentów będących pod opieką Zespołu Chorób Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN, identyfikacja zaburzeń molekularnych i komórkowych wywołanych przez mutacje genu *GDAP1* w modelu *in vitro* choroby CMT-GDAP1 opartego na komórkach ludzkich HeLa oraz SH-SY5Y, a także ocena patogenności wariantów sekwencji genu *GDAP1*.

W badanej grupie 14 pacjentów pochodzących z 9 rodzin dotkniętych chorobą CMT-GDAP1, po przeprowadzeniu analizy sekwencjonowania całego egzomu, stwierdzono obecność dodatkowych rzadkich wariantów sekwencji w innych „genach CMT”. Jako „geny CMT” w niniejszej pracy przyjmujemy geny związane

z czystą (ang., *pure*) polineuropatią CMT, jak i geny związane z wybranymi dziedzicznymi zespołami, w których występuje polineuropatia obwodowa. Co ciekawe, u pacjentów z mutacjami w genie *GDAP1*, dziedziczonymi w sposób autosomalny dominujący zidentyfikowano średnio 2 razy więcej wariantów sekwencji w porównaniu do pacjentów z mutacjami dziedziczonymi w sposób autosomalny recesywny. Zaobserwowano korelację pomiędzy genotypem, a fenotypem klinicznym badanych chorych.

W drugiej części pracy przeanalizowano wpływ siedmiu wybranych mutacji genu *GDAP1*. Wykazano, że niektóre z nich skutkują obniżeniem poziomu białka GDAP1, a także powodują zmiany w obrębie części *trans* aparatu Golgiego TGN. Ponadto zaobserwowano, że część analizowanych mutacji genu *GDAP1* wpływa na obniżenie żywotności transfekowanych komórek.

Wnioskujemy, że końcowy obraz kliniczny choroby CMT-GDAP1 zależy zarówno od rodzaju, jak i obecności wariantów sekwencji w innych „genach CMT”. Zaburzenia funkcji i struktury części *trans* aparatu Golgiego wydają się odgrywać istotną rolę w patogenezie molekularnej choroby CMT wywołanej mutacjami genu *GDAP1*.

## ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth (CMT) diseases, also known as Hereditary Motor and Sensory Neuropathies (HMSN), are characterized by slowly progressive atrophy and weakness of the muscles, mainly distal upper and lower extremities, and sensory disturbances. One of the causes of CMT diseases is mutations in the *GDAP1* (Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1) gene, which causes several types of polyneuropathy and can be inherited in both autosomal dominant and autosomal recessive ways. However, unlike the autosomal dominant mutations in the *GDAP1* gene, which cause the generally mild late-onset CMT-GDAP1 disease, autosomal recessive mutations typically lead to severe hereditary polyneuropathy and motor disabilities as early as the first or second decade of life.

The *GDAP1* gene encodes a mitochondrial outer membrane protein involved in many key cellular processes, i.e., mitochondrial networking, mitochondrial transport, maintenance of mitochondrial bioenergetics, and calcium homeostasis. The GDAP1 protein is also involved in the regulation of interactions between the mitochondria and the endoplasmic reticulum, and the maintenance of the normal structure of the peroxisomes. However, many aspects of the functioning of the GDAP1 protein, as well as the pathomechanism in which its mutations operate, remain unknown, and the natural course of CMT-GDAP1 disease for individual mutations is quite selectively characterized.

The aim of the study was to characterize the "genetic background" accompanying the main pathogenic variants of the *GDAP1* gene sequence in patients under the care of the Neuromuscular Disease Unit MMRI PAS to identify molecular and cellular disorders caused by mutations in the *GDAP1* gene in the *in vitro* model of CMT-GDAP1 disease based on human HeLa and SH-SY5Y cells, as well as assessment of pathogenicity of *GDAP1* gene sequence variants.

In the study group of 14 patients from 9 families affected by CMT-GDAP1 disease, additional rare sequence variants were found in other "CMT genes" following the whole exome sequencing analysis. As "CMT genes" in this work, we accept genes related to pure CMT polyneuropathy and genes related to selected hereditary syndromes in which peripheral polyneuropathy is present. Interestingly, in patients with autosomal dominant *GDAP1* mutations, an average of 2 times more sequence variants

were identified compared to patients with autosomal recessive mutations. A correlation was observed between the genotype and the clinical phenotype of the studied patients.

In the second part of the work, the influence of seven selected mutations of the *GDAP1* gene was analyzed. Some of them have been shown to reduce the level of GDAP1 protein and also cause changes in the *trans*-Golgi part of the TGN. Moreover, it was observed that some of the analyzed *GDAP1* gene mutations decreased the viability of the transfected cells.

We conclude that the final clinical picture of CMT-GDAP1 disease depends on the type and the presence of sequence variants in other "CMT genes". Furthermore, disturbances in the function and structure of the *trans*-Golgi appear to play an important role in the molecular pathogenesis of CMT disease caused by mutations in the *GDAP1* gene.

## INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY

Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT) są dziedzicznymi zaburzeniami obwodowego układu nerwowego wykazującymi dużą różnorodność genetyczną. Do tej pory, geny i mutacje związane z chorobami kręgu CMT zostały szeroko scharakteryzowane, jednak patogeneza molekularna większości podtypów CMT wciąż pozostaje nieznana. Choroba CMT-GDAP1 jest wywołana mutacjami w genie *GDAP1*, kodującym białko zewnętrznej błony mitochondrialnej. Jego funkcje molekularne nie są do końca poznane, jednak wydaje się, że jest ono zaangażowane w wiele kluczowych procesów komórkowych. Choroba CMT-GDAP1 charakteryzuje się szerokim spektrum fenotypowym, najczęściej ze stosunkowo ciężkim przebiegiem klinicznym tj. postępującym osłabieniem i zanikiem mięśni, głównie dystalnych kończyn górnych i dolnych.

W niniejszej pracy, po raz pierwszy zbadano wpływ „tła genetycznego” na obraz kliniczny pacjentów dotkniętych chorobą CMT-GDAP1. Dodatkowo wykazano, że mutacje w genie *GDAP1* kodującym białko mitochondrialne wywołują zmiany w obrębie części *trans* aparatu Golgiego (TGN).



## 1. WSTĘP

Polineuropatie, znane również, jako neuropatie obwodowe to duża grupa zaburzeń obwodowego układu nerwowego, dotykająca włókna ruchowe, czuciowe oraz autonomiczne nerwów obwodowych. Przyczyny polineuropatii są liczne i niejednorodne. Wyróżnia się polineuropatie nabyte (formy zakaźne, immunologiczne, toksyczne, metaboliczne), genetycznie uwarunkowane oraz idiopatyczne. Polineuropatie genetycznie uwarunkowane, podobnie jak inne choroby genetyczne, wywołane są mutacjami w pojedynczych genach (dziedziczenie mendlowskie, monogenowe), zaburzeniami strukturalnymi chromosomów lub mutacjami w wielu genach (dziedziczenie wielogenowe). Badania ostatnich lat wykazały, że w patogenezie chorób o podłożu genetycznym, oprócz wariantów dziedziczonych od rodziców, ważną rolę pełnią również mutacje powstające *de novo*, szczególnie o charakterze dominującym. Zmiany te, mogą nie być obserwowane u pacjentów, ani przekazywane następnym pokoleniom ze względu na wystąpienie mutacji z efektem letalnym, bądź ograniczone możliwości prokreacji, w przypadku wariantów sekwencji związanych z ciężkimi postaciami chorób. Jednak w wielu przypadkach są przekazywane dalszym pokoleniom, a ich charakter *de novo*, (jeżeli nie mamy do czynienia z mutacjami typu *hot spot* – mutacjami występującymi w rejonach o zwiększonej częstotliwości występowania, lub zmianami o znanej patogenności) utrudnia zdefiniowanie ich patogenności, postawienie ostatecznej diagnozy oraz określenie ryzyka przekazania choroby. Poszukiwanie genów, których mutacje prowadzą do wystąpienia danego obrazu klinicznego, stanowią początkowy etap poznania patomechanizmów poszczególnych chorób. Rozwój genetyki, a zwłaszcza technik analizy genomu doprowadziły w ostatnich latach, do zidentyfikowania wielu nowych, zaangażowanych w powstawanie chorób genów oraz mutacji sprawczych chorób genetycznych. Pomimo to, w znacznej części przypadków, nadal nie znajduje się w sekwencji DNA pacjentów zmian odpowiedzialnych za fenotyp kliniczny pacjentów lub charakter zmian jest trudny do określenia i powiązania z daną jednostką chorobową. Dodatkowym problemem diagnostyki molekularnej polineuropatii uwarunkowanych genetycznie jest fakt, że jest to grupa chorób heterogenna pod względem zarówno fenotypu, jak i genotypu, a ich obraz kliniczny jest wynikiem współwystępowania wielu czynników genetycznych, epigenetycznych i środowiskowych. Co więcej, niektóre z nich mogą być wynikiem dziedziczenia wielogenowego, dlatego też ocena zależności między genotypem,

a fenotypem klinicznym pacjentów jest niezwykle skomplikowana. Niektóre z mutacji sprawczych charakteryzują się niepełną penetracją, a te same mutacje mogą skutkować różnym przebiegiem klinicznym. Oprócz mutacji sprawczych istnieją także warianty sekwencji DNA, które mogą zwiększać lub zmniejszać ryzyko rozwoju choroby, modulować jej przebieg, czy wiek zachorowania. Przykładem mogą być warianty sekwencji w obrębie intronów, występujące w różnych niekodujących cząsteczkach RNA lub w regionach regulatorowych, położonych w regionach czasem znacznie oddalonych od genów, a mogących wpływać na ich ekspresję. Większość wariantów występujących poza sekwencjami kodującymi genów jest szczególnie trudna do interpretacji genetycznej, a ich status patogenności pozostaje nieokreślony. Ogromną trudność dla genetyków stanowią również warianty występujące w obrębie sekwencji kodującej genu, lecz o nieokreślonej patogenności. Wynika to po części z występowania takich wariantów u pojedynczych chorych, bez historii rodzinnej, a po części, szczególnie w dobie sekwencjonowania wielkoskalowego, z dużej liczby rzadkich wariantów identyfikowanych u pacjentów. Szczególnie, gdy warianty sekwencji znajdowane są w genach, niezwiązanych dotychczas z żadną jednostką chorobową. Problem stanowią także warianty sekwencji klasyfikowane, jako mutacje patogenne, wywołujące nieznaczne objawy choroby. Znajomość genotypu jest jednak niezwykle istotna, bo określenie mutacji patogennej może wskazywać na szlaki sygnałowe i biochemiczne biorące udział w patomechanizmie choroby. To z kolei jest niezbędne do opracowania terapii celowanej. Jednak, pomimo postępu, jaki dokonał się w ostatnim czasie w biologii molekularnej oraz genetyce klinicznej, patomechanizmy leżące u podstaw występowania wielu chorób, wciąż pozostają słabo poznane. Ogromną przeszkodą są braki w wiedzy na temat zależności między genotypem, a fenotypem. W związku z tym, że perspektywa leczenia przyczynowego, czy terapii genowej lub komórkowej wymaga bardzo dokładnego określenia podłoża zarówno genetycznego, jak i molekularnego choroby, terapie, w tym nawet te eksperymentalne, w wielu przypadkach, przy obecnym stanie wiedzy są niemożliwe. Przykładem chorób o nie do końca poznanych patomechanizmach są dziedziczne polineuropatie obwodowe, zwane chorobami kręgu Charcot-Marie-Tooth.

## 1.1 Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth

Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT) po raz pierwszy zostały opisane w 1886 roku przez trzech badaczy Jeana-Martina Charcota, Pierra Marie'a oraz Howarda Tootha i są jedną z najczęściej występujących polineuropatii na świecie [1]. Występują z częstością 1:2500 osób, jednak występowanie CMT nie jest równomierne w poszczególnych krajach i tak, na przykład w Serbii, czy Japonii choruje około 10 osób na 100 tysięcy mieszkańców, we Włoszech i w Wielkiej Brytanii około 18 osób na 100 tysięcy mieszkańców, podczas gdy w Norwegii aż 82 osoby [2,3].

Choroby kręgu CMT charakteryzują się powoli postępującym osłabieniem i zanikiem mięśni dystalnych kończyn górnych i dolnych. W zależności od typu choroby mogą również występować zaburzenia czucia, zaburzenia w zakresie układu autonomicznego, skrzywienie kręgosłupa, zniekształcenie stóp, zaburzenia chodu, drżenie rąk, czy problemy z poruszaniem się, wymagające użycia ortez lub wózka. Niekiedy dochodzi do powstania owrzodzeń w obrębie kończyn, a w konsekwencji do amputacji rąk i stóp. Czas wystąpienia pierwszych objawów klinicznych choroby bywa różny. Zazwyczaj choroba zaczyna się między pierwszą, a drugą dekadą życia [4,5].

Choroby kręgu CMT dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący, autosomalny recesywny oraz sprzężony z chromosomem X (dominujący i recesywny). Oprócz różnych wzorów dziedziczenia, polineuropatie genetycznie uwarunkowane, pomimo podobnych objawów klinicznych, charakteryzują się dużą heterogennością genetyczną. Dotychczas zidentyfikowano ponad 100 genów odpowiedzialnych za powstawanie chorób kręgu CMT, które kodują białka o różnorodnej lokalizacji w komórce oraz reprezentują szeroki wachlarz pełnionych funkcji (Tabela 1). Zaangażowane w choroby kręgu CMT białka biorą udział w różnych procesach molekularnych obejmujących syntezę białek i obróbkę postranslacyjną, transport wewnątrzkomórkowy, funkcjonowanie kanałów jonowych, czy funkcjonowanie mitochondriów [6]. Co więcej, za wystąpienie niektórych polineuropatii odpowiedzialne jest wystąpienie kilku mutacji zlokalizowanych w różnych genach [7].

<b>Proces Komórkowy</b>	<b>Wybrane białka związane z CMT</b>
Organizacja cytoszkieletu komórkowego	DST, FGD4, INF2, NEFH, NEFL
Tworzenie/ utrzymanie osłonki mielinowej/ funkcjonowanie komórek Schwanna	DRP2, Cx32, MPZ, PMP2, PMP22, PRX
Funkcjonowanie mitochondriów	AIFM1, COX6A1, DHTKD1, GDAP1, HK1, MFN2, PDK3, REEP1, SLC25A46, SURF1
Działanie kanałów jonowych	TRPV4, SCN9A, SCN11A
Ekspresja genów (transkrypcja, procesowanie mRNA, translacja)	AARS, CTDP1, ERG2, GARS, HARS, HINT1, IGHMBP2, KARS, LMNA, MARS, MED25, PLEKHG5, YARS
Transport wewnątrzkomórkowy	DCTN1, DNM2, DYNC1H1, FIG4, KIF1A, KIF1B, KIF5A, LITAF, MTMR2, MYH14, RAB7, SBF1, SBF2, SH3TC2, SPG11
Proteostaza	CCT5, DCAF8, DNAJB2, HSPB1, HSPB3, HSPB8, MME, TRIM2
Transdukcja sygnału	GNB4, LRSAM1, NGF-B, NTRK1, SPTLC1, SPTLC2, WNK1

**Tabela 1.** Wybrane białka zaangażowane w choroby kręgu CMT.

Choroby kręgu CMT zostały sklasyfikowane z uwzględnieniem ich sposobu dziedziczenia oraz prędkości przewodzenia we włóknach ruchowych nerwu pośrodkowego (ang., *Median Nerve Conduction Velocity*, MNCV). Na podstawie wartości MNCV wyróżnia się trzy podstawowe grupy, tj. polineuropatie demielinizacyjne, pośrednie oraz aksonalne. Polineuropatie demielinizacyjne charakteryzują się obniżoną szybkością (<38 m/s) przewodzenia we włóknach ruchowych nerwu pośrodkowego, co jest związane z występowaniem nieprawidłowości w tworzeniu i utrzymaniu osłonki mielinowej. W przeciwieństwie do polineuropatii demielinizacyjnych, polineuropatie aksonalne charakteryzują się prawidłową szybkością (>38 m/s) przewodzenia w nerwie pośrodkowym i są związane z degeneracją aksonów

[7,8]. Formy pośrednie charakteryzują się wartościami przewodzenia MNCV w zakresie 25-45 m/s [7].

Najczęściej występującym typem chorób kręgu CMT jest polineuropatia demielinizacyjna typu 1A (CMT1A). Duplikacja genu *PMP22* (ang., *Peripheral Myelin Protein 22*) odpowiedzialna za powstawanie CMT1A została zidentyfikowana u ponad 60% pacjentów z CMT [6,9]. Białko PMP22 jest zaangażowane w tworzenie oraz stabilizowanie osłonki mielinowej. Odgrywa również rolę w proliferacji oraz funkcjonowaniu komórek Schwanna, a także utrzymywaniu w nich homeostazy cholesterolu [10,11]. CMT1A zwykle charakteryzuje się łagodnym lub umiarkowanym przebiegiem klinicznym. W chorobie CMT1A kluczowym czynnikiem patogenetycznym jest efekt dawki genu, czyli wzrost poziomu mRNA *PMP22* na skutek duplikacji regionu 17p11.2-p12, w którym znajduje się gen *PMP22*. Efekt dawki wyrażany przez obniżenie ekspresji mRNA *PMP22* jest natomiast opisany u chorych z fenotypem dziedzicznej neuropatii z nadwrażliwością na ucisk (ang., *Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy*, HNPP), u których występuje delecja regionu 17p11.2-p12. Zaobserwowano, że stopień obniżenia ekspresji *PMP22* koreluje z ciężkością przebiegu HNPP [12]. Jednak w przypadku pacjentów z CMT1A, u których znaleziono cztery kopie genu *PMP22*, nie wykazano wyraźnie cięższego przebiegu polineuropatii, w porównaniu z pacjentami z trzema kopiami genu *PMP22* [13]. Pomimo to, badania określające poziom mRNA wykazały, że u chorych z CMT1A o ciężkim przebiegu klinicznym poziom mRNA genu *PMP22* w próbkach biopsji nerwu pośrodkowego jest zwiększony w porównaniu z pacjentami o łagodniejszym fenotypie [14]. Również w ostatnich badaniach z użyciem RNA wyizolowanym z komórek pobranych w biopsji skóry od pacjentów z CMT1A stwierdzono około 1,55 razy wyższy poziom mRNA dla *PMP22*, niż w próbkach kontrolnych [15]. Określono także wpływ dodatkowej mutacji w genie *LITAF* c.274A>G, p.Ile92Val na postęp choroby wywołanej mutacjami w genie *PMP22*. Stwierdzono, że wystąpienie tej mutacji koreluje z wcześniejszym wiekiem zachorowania na CMT1A oraz HNPP [16]. Oprócz duplikacji/delecji genu *PMP22*, w niewielkim stopniu za powstanie choroby CMT1A odpowiadają mutacje punktowe w genie *PMP22*.

Za około 30% pozostałych przypadków chorób kręgu CMT odpowiadają mutacje punktowe w trzech innych genach tj., *GJB1* (ang., *Gap-Junction Beta 1*), *MPZ* (ang., *Myelin Protein Zero*) i *MFN2* (ang., *Mitofusin 2*) [17]. Mutacje w genie *GJB1*, kodującym koneksynę 32 (ang., *connexin-32*) wywołują chorobę CMT1X, która jest

sprężona z płą [18]. Koneksyna 32 bierze udział w komunikacji komórkowej poprzez tworzenie tzw. połączeń szczelinowych, prawdopodobnie pomiędzy poszczególnymi warstwami osłonki mielinowej, gdzie odpowiada za międzykomórkową wymianę jonów, drobnocząsteczkowych metabolitów oraz cząsteczek sygnałowych [19]. Gen *MPZ* koduje białko produkowane w komórkach Schwanna wytwarzających mielinę i odpowiada za jej uporządkowanie. Mutacje w tym genie prowadzą do choroby CMT typu 1B (CMT1B), która dziedziczy się autosomalnie dominująco [20]. CMT1B zazwyczaj objawia się cięższym przebiegiem klinicznym, a także wcześniejszym początkiem, niż CMT1A [5].

Najczęstszą przyczyną chorób kręgu CMT typu aksonalnego są mutacje w genie *MFN2*, które wywołują chorobę CMT2A. Gen *MFN2* koduje mitofuzynę 2 zlokalizowaną w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i biorącą udział w fuzji, a także transporcie oraz degradacji mitochondriów [21]. Mitofuzyna 2 uczestniczy również w tworzeniu struktur zwanych MAMs (ang. *Mitochondria-associated membranes*). MAMs to miejsca kontaktu mitochondriów z reticulum endoplazmatycznym (ER), poprzez które zachodzi komunikacja oraz transport lipidów i drobnych cząsteczek między tymi organellami. W badaniu fibroblastów od pacjentów z mutacjami w genie *MFN2* wykazano, że funkcje MAMs są zmienione i skorelowane z nasileniem choroby. Pomimo tego, że morfologia mitochondriów pacjentów nie różni się w stosunku do mitochondriów komórek kontrolnych, to w komórkach pacjentów zaobserwowano utrudnioną komunikację między mitochondriami, a ER. Wykazano, że u pacjentów zarówno z lekkim, jak i ciężkim przebiegiem choroby, fibroblasty zwiększają syntezę estrów cholesterolu, natomiast u pacjenta z ciężkim przebiegiem choroby, fibroblasty mają znacznie zwiększone ciała lipidowe. Wyniki te wskazują na uogólnione zaburzenia syntezy lipidów w komórce w chorobie CMT2A [22]. Badania te dopisują, więc CMT2A do listy chorób zmieniających homeostazę lipidową w komórce [23].

Za chorobę CMT typu 1C odpowiadają mutacje w genie *LITAF* (ang., *Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis alpha factor*), kodującym białko będące czynnikiem martwicy nowotworów typu alfa, indukowanym przez lipopolisacharydy. Lee i współpracownicy (2011) zaobserwowali, że patogenne mutacje (p.Trp116Gly i p.Pro135Trp) w genie *LITAF* powodują nieprawidłową lokalizację białka LITAF. Nieprawidłowe białka są mniej stabilne i bardziej podatne na agregację, w porównaniu z białkami prawidłowymi. Ulegają one degradacji zarówno

przez proteasom, jak i w procesie autofagii [24]. Wykazano również, że wariant sekwencji genu *LITAF* c.274A>G, p.Ile92Val, niezaangażowany bezpośrednio w wystąpienie choroby CMT1C, przyczynia się do klinicznej zmienności choroby CMT1A [16].

Dziedziczne polineuropatie typu aksonalnego są też wywołane mutacjami w genach kodujących małe białka szoku cieplnego (ang., *Small Heat Shock Protein*, HSPB). Dotychczas pokazano, że mutacje w genach *HSPB1*, *HSPB3* oraz *HSPB8* powodują zarówno choroby kręgu CMT, jak i dziedziczne neuropatie ruchowe (ang., *Hereditary Motor Neuropathy*, HMN). Przykładem są mutacje w genie *HSPB1* prowadzące do postępującej degeneracji neuronów ruchowych, z przerwaniem sieci neurofilamentów i agregacją białka NEFL (ang., *Neurofilament Light Chain*) [25] oraz powodujące chorobę Charcot-Marie-Tooth typu 2F (CMT2F) [26].

Innymi genami, których mutacje powodują neuropatie są geny kodujące syntetazy aminoacylo tRNA tzw. geny *ARS* (*GARS*, *YARS*, *AARS*, *KARS*, *HARS*, *MARS*). Mutacje heterozygotyczne w tych genach są przeważnie związane z aksonalnym typem choroby. Mutacje homozygotyczne często prowadzą do powstania ciężkiej wieloukładowej choroby na skutek zmniejszenia ilości tRNA biorącego udział w translacji białek [27].

Genem, którego mutacje powodują występowanie polineuropatii, zarówno o dziedziczeniu autosomalnym dominującym, jak i autosomalnym recesywnym jest gen *GDAP1*. Gen ten koduje białko zewnętrznej błony mitochondrialnej, a jego funkcje molekularne nie są do końca poznane [28]. Choroba spowodowana mutacjami w genie *GDAP1*, CMT-GDAP1 charakteryzuje się szerokim spektrum fenotypów, od ciężkich polineuropatii o wczesnym początku, do łagodnych klinicznie polineuropatii o późnym początku [29]. Jednym z negatywnych modyfikatorów przebiegu choroby CMT-GDAP1 jest gen *JPH1*. Wykazano, że obecność głównej patogennej mutacji w genie *GDAP1* (c.358C>T, p.Arg120Trp) wraz z mutacją genu *JPH1* (c.638G>C, p.Arg213Pro) u pacjenta z CMT prowadzi do cięższej postaci choroby niż u pacjenta bez dodatkowej mutacji w genie *JPH1* [30].

W ostatnich latach wraz z rozwojem technik molekularnych odnotowuje się w pojedynczych rodzinach, nowe mutacje skutkujące chorobami kręgu CMT, w genach wcześniej niezwiązanych z polineuropatiami. Do takich genów

zaangażowanych w powstawanie bardzo rzadkich polineuropatii należy na przykład *IGHMBP2*.

Gen *IGHMBP2* (ang., *Immunoglobulin mu-binding Protein 2*) koduje białko wiążące immunoglobulinę 2. Mutacje w genie *IGHMBP2* prowadzą do rdzeniowego zaniku mięśni z niewydolnością oddechową typu 1 (SMARD1), jak również do choroby kręgu CMT typu 2S (CMT2S). W przeciwieństwie do SMARD1, w CMT2S nie dochodzi do poważnych problemów oddechowych u pacjentów [31,32]. Białko IGHMBP2 zostało dobrze scharakteryzowane, jako helikaza, jednak niewiele wiadomo na temat jej roli w procesach komórkowych. Wykazano, że wraz z niedoborem IGHMBP2 obserwuje się obniżone poziomy białka  $\beta$ -aktyny w stożkach wzrostu neuronów ruchowych. W związku z tym, że IGHMBP2 nie wiąże się bezpośrednio z mRNA  $\beta$ -aktyny i nie wpływa na ilość mRNA, sugeruje to, że niedobór IGHMBP2 powoduje miejscowe zakłócenie biosyntezy białek. Wskazuje to na to, że białko IGHMBP2 odgrywa ważną rolę w procesie translacji [33].

Innym przykładem jest choroba wywołana mutacjami w genie *SPTLC1* (ang., *Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 1*), która jest związana z dziedzicznymi neuropatiami czuciowymi i autonomicznymi, HSAN I (ang., *Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy type I*). Gen *SPTLC1* koduje podjednostkę palmitoilotransferazy serynowej (SPT), będącą początkowym enzymem w szlaku biosyntezy sfingolipidów. Badania Penno i współautorów (2010) wykazały, że mutacje w genie *SPTLC1*, związane z HSAN I przyczyniają się do zmiany specyficzności substratowej SPT, co powoduje powstanie dwóch nietypowych zasad dezoksysfingolipidowych, które nie mogą zostać dalej przekształcone w złożone sfingolipidy i w konsekwencji są akumulowane wewnątrzkomórkowo. Ma to neurotoksyczny wpływ na tworzenie neurytów w hodowlach neuronów czuciowych i podobnie jak w przypadku mutacji genu *HSPB1*, prowadzi do zaburzeń w strukturze neurofilamentów [34]. Gantner i wsp. (2019) zaobserwowali natomiast, że podwyższony poziom deoksysfingolipidów spowodowany mutacjami w genie *SPTLC1* jest także czynnikiem ryzyka wystąpienia neuropatii nerwu wzrokowego [35].

Pomimo dostępu do nowoczesnych zaawansowanych „narzędzi molekularnych”, tj. sekwencjonowanie całego eksomu (ang., *Whole Exome Sequencing*, WES), czy sekwencjonowanie całego genomu (ang., *Whole Genome Sequencing*, WGS),



diagnoza oparta na analizie genetycznej, wciąż nie jest dostępna dla wielu chorych. Nawet w erze sekwencjonowania nowej generacji (ang., *Next Generation Sequencing*, NGS) rozpoznanie kliniczne polineuropatii uwarunkowanych genetycznie jest możliwe tylko w około 45% przypadków choroby [6]. W związku z tym, nasza wiedza na temat chorób kręgu CMT, jako całości, wciąż pozostaje wybiórcza, a podejścia terapeutyczne ograniczone. Jednak, odkrycie różnorodnych patomechanizmów molekularnych stało się podstawą do opracowania wielu terapii eksperymentalnych, co doprowadziło do poszukiwania nowych sposobów leczenia, do tej pory, nieuleczalnej grupy chorób [36].

## 1.2 Perspektywy terapii eksperymentalnych w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth

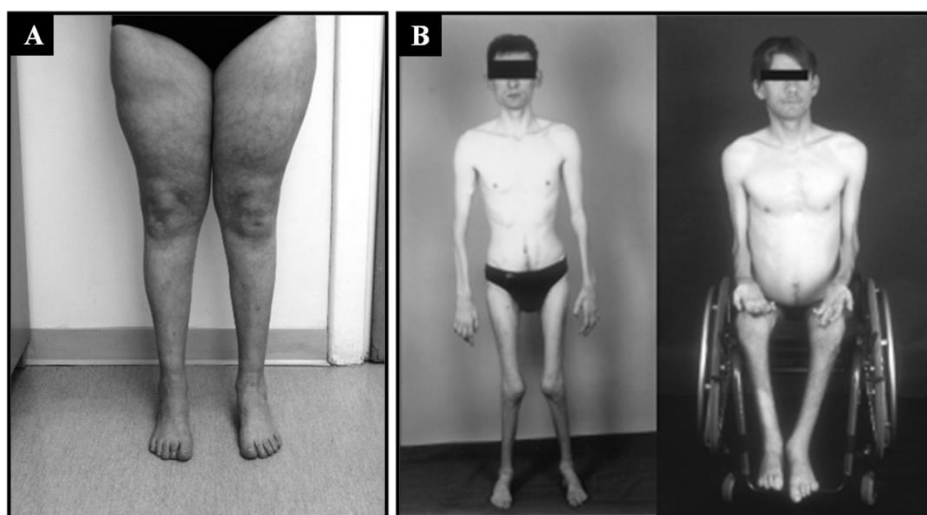
Większość terapii eksperymentalnych dotyczy najczęstszych typów chorób kręgu CMT, tj., CMT1A, CMT1X, CMT1B oraz CMT2A [2]. W chorobie CMT1A główną strategią terapeutyczną jest zmniejszenie poziomu białka PMP22. Niestety, pierwszych prób obniżenia ekspresji genu *PMP22*, z zastosowaniem kwasu askorbinowego w modelu mysim, czy antagonisty progesteronu (onapriston) w modelu szczurzym, nie doprowadzono do fazy klinicznej [37–39]. Obecnie jednym z testowanych leków w trzeciej fazie badań klinicznych jest PXT3003, stanowiący kombinację trzech dostępnych na rynku leków (baklofen, sorbitol, naltrekson), który w modelu szczurzym CMT1A był w stanie zredukować długoterminowe objawy neuropatii. Wstępne wyniki trzeciej fazy badań sugerują bezpieczeństwo oraz skuteczność PXT3003 u pacjentów z CMT1A [40]. Inną substancją stosowaną u chorych z CMT1A jest ADX7144. Jest to modulator receptorów GABA<sub>B</sub>, a jego działanie jest silniejsze i bardziej specyficzne, niż PTX3003. Obecnie, ADX7144 otrzymał zezwolenie na rozpoczęcie badań klinicznych pierwszej fazy [41]. W drugim, co do częstości występowania typie choroby kręgu CMT, CMT1X, najlepszą opcją leczenia wydaje się opracowanie terapii genowej, ze względu na niewielki rozmiar genu *GJB1*, a także ze względu na fakt, że większość jego mutacji skutkuje utratą funkcji kodowanego przez niego białka. Próby terapii genowej zostały również podjęte w przypadku choroby kręgu CMT, spowodowanej rzadkimi mutacjami w genie *IGHMBP2* [42,43]. Potencjalnie skuteczną substancją w leczeniu CMT1B, spowodowaną mutacjami w genie *MPZ* jest kurkumina. Udowodniono, że powoduje ona uwalnianie zmutowanych form białka MPZ z siateczki

śródpłazmatycznej do cytoplazmy i ograniczenie procesu apoptozy w komórkach HeLa. Podobnie, na mysim modelu CMT1B, działanie kurkuminy wydaje się obiecujące, jednak ze względu na konieczność spożywania jej w bardzo dużych ilościach, badania nie zostały przeniesione do fazy klinicznej [44]. U chorych z HSAN I doustna suplementacja L-seryny wydaje się bezpieczna i skuteczna w spowalnianiu progresji choroby [45,46]. Na dzień 18.08.2022 w bazie ClinicalTrials.gov, zarejestrowanych jest 385 badań klinicznych chorób kręgu CMT, w tym 103 aktywne badania rekrutujące pacjentów lub będące przed rekrutacją (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>).

Mimo wielu prób, do dziś nie zarejestrowano żadnego skutecznego leku na zaburzenia związane z chorobami kręgu CMT. Niemniej jednak cztery związki lecznicze, wpisano do wspólnotowego rejestru sierocych produktów leczniczych we wskazaniu CMT ([https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/reg\\_od\\_act.htm?sort=n](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/reg_od_act.htm?sort=n)). Jednakże pomimo dużej wiedzy o patogenezie molekularnej mutacji niektórych genów np. *PMP22*, czy *GJB1* i rozpoczęcia prac nad terapią eksperymentalną, wiedza na temat patogenezy molekularnej mutacji innych genów np. *GDAP1* wciąż pozostaje ograniczona [36].

### **1.3 Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth wywołane mutacjami w genie *GDAP1***

Choroby kręgu CMT wywołane mutacjami w genie *GDAP1* (CMT-GDAP1) w zależności od sposobu dziedziczenia oraz szybkości przewodzenia w nerwach obwodowych, dzieli się na kilka typów polineuropatii. Wyróżnia się cztery typy polineuropatii autosomalnych recesywnych: demielinizacyjną - CMT4A (AR), formę pośrednią - RI-CMTA (AR), aksonopatie recesywne - AR-CMT2K (AR), CMT2H (AR) oraz polineuropatie dominujące - CMT2K (AD) [47]. Mutacje w genie *GDAP1* dziedziczone w sposób autosomalny dominujący są związane ze stosunkowo łagodną postacią choroby CMT (Rycina 1A), która charakteryzuje się późnym początkiem. Mutacje genu *GDAP1* dziedziczone w sposób autosomalny recesywny powodują zazwyczaj ciężką formę dziedzicznej polineuropatii, o wczesnym początku i prowadzą do niepełnosprawności ruchowej w pierwszej lub drugiej dekadzie życia [47,48] (Rycina 1B).



**Rycina 1.** Obraz kliniczny choroby CMT spowodowanej mutacjami w genie *GDAP1*. (A) Łagodna postać choroby z widocznym wyszczupleniem mięśni podudzi. (B) Ciężka postać choroby, w której dochodzi do zaniku mięśni kończyn górnych i dolnych. Pacjent zmuszony jest do poruszania się na wózku. Zmodyfikowano, Kabzińska i wsp., 2006 [49]; Kabzińska i wsp., 2007 [50].

U pacjentów dochodzi do zaniku i osłabienia mięśni dystalnych kończyn górnych i dolnych oraz mięśni proksymalnych. Pacjenci mają zaburzenia czucia oraz zaburzenia autonomiczne. Oprócz zniekształcenia stóp ("*pes cavus*"), niekiedy dochodzi do deformacji kręgosłupa (skoliozy). U niektórych chorych pojawia się porażenie strun głosowych. Znaczna liczba osób jest zmuszona do poruszania się na wózku, już w wieku młodzieńczym [29]. W związku z tym choroba CMT-GDAP1 jest uznawana, jako jedna z najcięższych polineuropatii uwarunkowanych genetycznie. Niestety, pomimo ponad 20 lat badań, wiedza na jej temat, obejmująca naturalny przebieg choroby, a także patogenezę poszczególnych mutacji, jest niekompletna. Co więcej, dostępne dane literaturowe są niekiedy sprzeczne, co skutkuje tym, że wyznaczenie celów do potencjalnej terapii eksperymentalnej jest znacznie utrudnione.

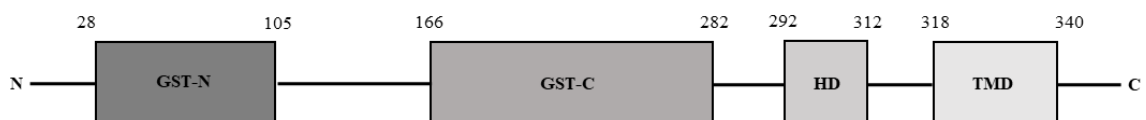
#### 1.4 Gen *GDAP1*

Gen *GDAP1* (ang., *Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1*) po raz pierwszy został zidentyfikowany w 1999 roku, jako jeden z kilku genów, których ekspresja wzrosła po transfekcji komórek mysiej linii komórkowej nerwiaka niedojrzałego (Neuro2a), cDNA genu syntazy gangliozydu GD3, co prowadzi do indukowanego gangliozydami różnicowania komórek Neuro2a [51]. Gen *GDAP1* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 8 pary (8q21), a jego sekwencja

kodująca składa się z 6 eksonów. Ekspresja genu *GDAP1* jest wyrażana w wielu narządach tj. mięśnie szkieletowe, serce, nerki, pęcherz moczowy, gonady męskie i żeńskie, tchawica, płuca, wątroba, trzustka, jelito, szpik kostny, tarczycza, śledziona, grasica oraz mózg, w którym jest najwyższa. *GDAP1* wyrażany jest głównie w aksonach, a także komórkach Schwanna [52], (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000104381-GDAP1/tissue>). Dość wysoki poziom *GDAP1* zaobserwowano w liniach nowotworowych różnego pochodzenia tkankowego [53].

## 1.5 Białko GDAP1

Białko GDAP1 składa się z 356 reszt aminokwasowych. W jego strukturze wyróżniono domeny, o sekwencji reszt aminokwasowych podobnej do sekwencji S-transferazy glutationowej (GST), są to domeny: GST-N oraz GST-C, oddzielone pętlą alfa. Dodatkowo wyróżnia się proksymalną w stosunku do C-końca domenę hydrofobową (HD1) i C-kończącą domenę transbłonową (TMD) (Ryc. 2). GDAP1 jest białkiem zlokalizowanym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [54] oraz w strukturach MAMs (podobnie jak mitofuzyna 2) [55], a także w miejscach kontaktu błon pomiędzy mitochondriami i peroksisomami [56] oraz mitochondriami i lizosomami [57].



**Rycina 2.** Schemat przedstawiający układ domen białka GDAP1.

Ze względu na fakt, że wyniki analizy bioinformatycznej sugerowały podobieństwo sekwencji GDAP1 do sekwencji aminokwasowej S-transferaz glutationowych (GST), na początku badań nad GDAP1 analizowano jego zdolność do przenoszenia glutationu na różne substraty [58,59]. Jednak dalsze badania nie wykazały żadnych dowodów na aktywność GDAP1 zależną od glutationu [54,60]. Dopiero po kilku latach, wykazano rolę GDAP1 w regulacji zawartości glutationu komórkowego (GSH), który jest czynnikiem chroniącym komórki przed stresem oksydacyjnym [61]. Stwierdzono również, że poziom białka GDAP1 jest podwyższony

w komórkach nerwowych hipokampa myszy odpornych na stres oksydacyjny. Co więcej, w komórkach tych, jak i nerwach obwodowych w mysim modelu CMT-GDAP1, nadekspresja *GDAP1* chroni przed endogennym stresem, spowodowanym niedoborem glutationu, natomiast obniżenie poziomu GDAP1 zwiększa wrażliwość komórek na glutation i powoduje stres oksydacyjny [61].

Dotychczasowe badania sugerują udział białka GDAP1 w dynamice mitochondriów. Zaprezentowano GDAP1, jako białko zaangażowane w proces fragmentacji mitochondriów [28]. Wykazano, że nadekspresja *GDAP1* skutkuje większą liczbą mitochondriów ze względu na zaindukowanie ich fragmentacji lub ze względu na zakłócenie ich fuzji. Zmiany te nie wywołują apoptozy, ale w efekcie zaburzają potencjał transbłonowy mitochondriów [28]. U *Drosophila melanogaster* obniżenie poziomu *GDAP1* powoduje fuzję mitochondriów, co skutkuje obecnością wydłużonych mitochondriów w komórkach mięśni oraz siatkówki *D. melanogaster*. Po nadekspresji genu *GDAP1* mitochondria w komórkach siatkówki były mniejsze [62]. Niemann i wsp. (2009) wykazali, że mutacje genu *GDAP1*, w zależności od sposobu dziedziczenia różnią się wpływem na dynamikę mitochondriów i proces apoptozy [63]. Stwierdzono, że mutacje w genie *GDAP1* dziedziczone w sposób autosomalny recesywny prowadzą do zmniejszonej aktywności białka GDAP1 w procesie fragmentacji mitochondriów, podczas gdy mutacje dziedziczone w sposób autosomalny dominujący powodują zakłócenie fuzji mitochondrialnej, ze zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (ROS) i podatnością na bodźce apoptotyczne [63].

Innym istotnym odkryciem dotyczącym białka GDAP1, był fakt, że jest on zlokalizowany w MAMs oraz oddziałuje z białkami związanymi z transportem wewnątrzkomórkowym [55]. Lokalizacja GDAP1 sugeruje, że może być ono istotne z punktu widzenia transportu jonów wapnia ( $Ca^{2+}$ ) z ER do mitochondriów, transportu lipidów do mitochondriów, tworzenia autofagosomów oraz przeżycia komórek. Dotychczas pokazano, że obniżenie poziomu GDAP1 prowadzi do zmian w obrębie sieci mitochondrialnej, polegającej na zmniejszeniu ilości MAMs, a przez to ograniczeniu wnikania  $Ca^{2+}$  do mitochondriów w ludzkich komórkach nerwiaka niedojrzałego [55]. Nieprawidłowości w utrzymaniu wewnątrzkomórkowej homeostazy  $Ca^{2+}$  zauważono także w neuronach myszy pozbawionych genu *GDAP1* [64].

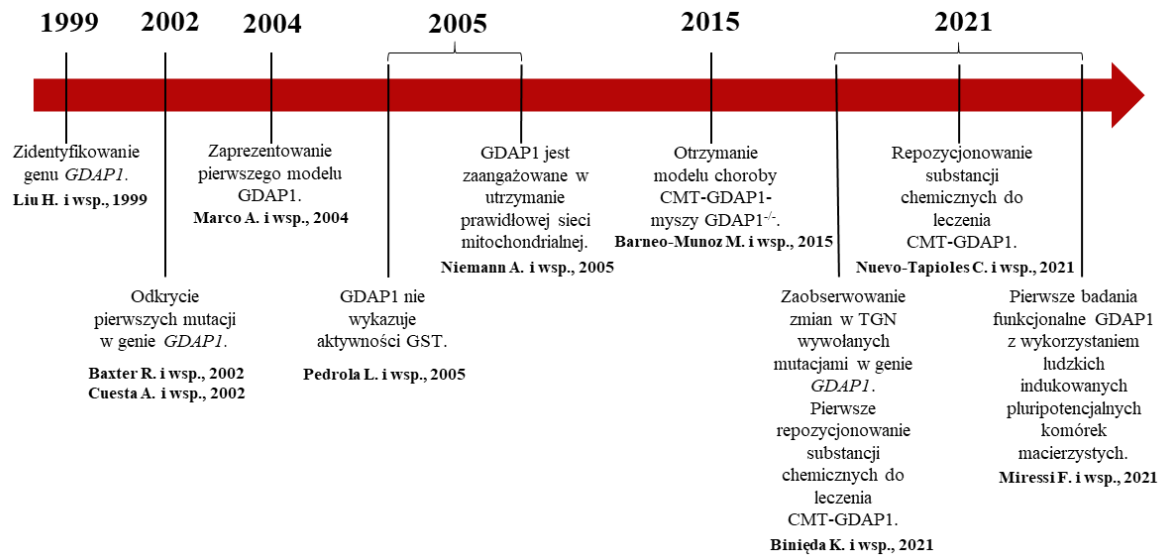
Białko GDAP1 jest również zaangażowane w transport mitochondriów przez interakcję z  $\beta$ -tubuliną oraz innymi białkami związanymi z cytoszkieletem i odpowiedzialnymi za transport np. GTPazą RAB6B. Wykazano, że wpływa ono na oddziaływanie mitochondriów z mikrotubulami [64].

Oprócz roli związanej z funkcjonowaniem mitochondriów, białko GDAP1 odgrywa rolę w regulacji morfologii peroksysomów. Pokazano, że obniżenie poziomu GDAP1 prowadzi do wydłużenia peroksysomów, natomiast nadekspresja genu *GDAP1* prowadzi do ich fragmentacji [65]. Ostatnie badania zaprezentowały natomiast udział białka GDAP1 w autofagii i dojrzewaniu lizosomów [57,66]. Wykazano, że GDAP1 oddziałuje z markerem lizosomalnym LAMP-1, przez co wiąże mitochondria z lizosomami. Wykazano, że obniżenie poziomu GDAP1 powoduje zmiany w wyglądzie błon powstających pęcherzyków autofagicznych, a także lizosomów. Ogranicza to procesy degradacji wewnątrzkomórkowej i w efekcie prowadzi to do nieprawidłowości w obrębie sieci mitochondrialnej [57,66].

Białko GDAP1 może również uczestniczyć w odpowiedzi zapalnej organizmu. Stwierdzono obecność markerów stanu zapalnego w układzie nerwowym, zarówno w rdzeniu kręgowym, jak i nerwie kulszowym w polineuropatii aksonalnej u myszy *GDAP1*<sup>-/-</sup> [67]. Wykazano, że brak GDAP1 bierze udział w regulacji procesów związanych z zapaleniem oraz powoduje znaczny wzrost mediatorów stanu zapalnego tj. TNF $\alpha$  (ang., *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) oraz pERK (ang., *Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase*), a także białek układu dopełniacza [67].

W modelu choroby CMT *Danio rerio* związanym z mutacjami genu *GDAP1*, opisano natomiast rolę białka GDAP1 w rozwoju nerwów czuciowych oraz ruchowych [68,69]. Wykazano, że wyciszenie genu *GDAP1* w zarodkach *Danio rerio* powoduje zmniejszoną gęstość włókien nerwowych w nerwach czuciowych, bez widocznego wpływu na morfologię sieci mitochondrialnej w komórkach skóry zarodków ryby [68]. Natomiast wcześniejsze badania na tym modelu wykazały, że aksony neuronów ruchowych z zarodków *Danio rerio* pozbawionych *GDAP1* charakteryzują się nieprawidłowym wydłużaniem i tworzeniem rozgałęzień [69]. Wpływ GDAP1 na rozwój neuronów został również pokazany na przykładzie komórek Neuro2a transfekowanych cDNA genu syntazy GD3 [51].

Pomimo, ponad 20 lat badań nad funkcją genu *GDAP1* i kilku ważnych odkryć dotyczących *GDAP1* (Ryc. 3), do dziś nie sprecyzowano, co jest kluczową (wiodącą) rolą białka kodowanego przez ten gen.



**Rycina 3.** Oś czasu (nie w skali) przedstawiająca istotne osiągnięcia w badaniach genu *GDAP1*.

Dodatkowo brak jest modelu zwierzęcego, który odtworzyłby, choć w pewnym stopniu fenotypy pacjentów, co znacznie utrudnia dalsze badania. W związku z powyższym, w swojej pracy doktorskiej postanowiłam pochylić się nad patogennością mutacji znajdujących w genie *GDAP1* oraz nad problemem poznania funkcji białka kodowanego przez ten gen.

## 2. CELE PRACY

1. Charakterystyka „tła genetycznego” towarzyszącego głównym patogennym wariantom sekwencji genu *GDAP1* u pacjentów będących pod opieką Zespołu Chorób Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN. Identyfikacja wariantów sekwencji w innych genach zaangażowanych w powstawanie chorób kręgu CMT, a także próba oceny ich wpływu na fenotyp.
2. Próba opracowania modelu oceny patogenności mutacji genu *GDAP1* w oparciu o wybrane fenotypy molekularne i komórkowe.
3. Próba identyfikacji zaburzeń molekularnych i komórkowych wywołanych przez mutacje genu *GDAP1* w modelu *in vitro* choroby CMT spowodowanej mutacjami w genie *GDAP1* opartego na komórkach ludzkich HeLa oraz SH-SY5Y, w celu poszukiwania fenotypu komórkowego, jako biomarkera postępu choroby.



### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1 Pacjenci

Chorzy i członkowie ich rodzin (kierowani z różnych placówek ochrony zdrowia w Polsce) zgłaszali się na konsultacje neurologiczne i genetyczne do Zespołu Chorób Nerwowo – Mięśniowych IMDiK PAN. Materiałem w badaniu były próbki DNA uzyskane z limfocytów krwi obwodowej pacjentów konsultowanych przez zespół lekarski (neurolog, internista, genetyk kliniczny) oraz zbankowane przez Zespół Chorób Nerwowo – Mięśniowych IMDiK PAN. Spośród pacjentów wybrano grupę rodzin, u których wcześniej zidentyfikowano główne patogenne mutacje w genie *GDAP1*, dziedziczone w sposób zarówno autosomalny dominujący (AD), jak i autosomalny recesywny (AR). Badaniami objęto 14 pacjentów z 9 rodzin ze zidentyfikowanymi wariantami patogennymi w genie *GDAP1*:

c.715C>T, p.Leu239Phe - AR,

c.467C>G, p.Ala156Gly - AD,

c.664G>A, p.Glu222Lys - AD.

W tabeli 2 przedstawiono charakterystykę grupy badanej:

Rodzina	Pacjent	Sposób dziedziczenia	Główna mutacja patogenna	Wiek wystąpienia pierwszych objawów	Objawy dodatkowe
R1	III:6	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	6 r.ż.	-
R2	III:11	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	2 r.ż.	-
R3	IV:7	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	8 r.ż.	-skolioza, -wiotkość, -drżenie rąk, -objaw Babińskiego
R4	III:3	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	6 r.ż.	-
R5	III:6	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	18 miesięcy	-stopa końsko-szpotawa, -demielinizacja,

					-poruszanie się na wózku
R6	II:8	AD	c.467C>G, p.Ala156Gly	13 r.ż.	-zaburzenia rytmu serca, -objaw Raynauda
R6	III:8	AD	c.467C>G, p.Ala156Gly	9 r.ż.	-arytmia przedsionkowa, -skolioza klatki piersiowej, -rozszerzenie kręgosłupa, -przykurcz ścięgien Achillesa -upośledzenie umysłowe
R6	III:9	AD	c.467C>G, p.Ala156Gly	8 r.ż.	-arytmia komorowa, -nadciśnienie -przykurcz ścięgien Achillesa, -demielinizacja
R7	III:12	AD	c.467C>G, p.Ala156Gly	18 r.ż.	-drżenie rąk, -chrypka
R8	II:4	AD	c.664G>A, p.Glu222Lys	Po 50 r.ż.	-
R8	III:2	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	2 r.ż.	-wydrażenie stopy, -przykurcz ścięgien Achillesa
		AD	c.664G>A, p.Glu222Lys		
R8	III:3	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	2 r.ż.	-osłabienie siły mięśni drobnych rąk
		AD	c.664G>A, p.Glu222Lys		
R9	III:9	AD	c.664G>A, p.Glu222Lys	Po 50 r.ż.	-
R9	III:11	AD	c.664G>A, p.Glu222Lys	Po 50 r.ż.	-

**Tabela 2.** Charakterystyka grupy badanej. Symbol AD oznacza dziedziczenie autosomalne dominujące, symbol AR oznacza dziedziczenie autosomalne recesywne, skrót r.ż. - rok życia. Oznaczenia chorych (III:6, III:11 itp.) znajdują się w rodowodach na stronach 38-40.

### 3.2 Szczepy bakteryjne

W pracy użyto szczepu bakteryjnego *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific).

### 3.3 Wektory plazmidowe

W tabeli 3 przedstawiono wektory plazmidowe stosowane w pracy:

pCMV6-XL5- <i>GDAP1</i>	cDNA ludzkiego nieoznakowanego klonu <i>GDAP1</i>	OriGene
pCMV6-XL5- <i>GDAP1m1</i>	<i>GDAP1</i> c.456delC, p.Pro153Argfs*19	n.p.b.
pCMV6-XL5- <i>GDAP1m2</i>	<i>GDAP1</i> c.980G>A, p.Gly327Asp	n.p.b.
pCMV6-XL5- <i>GDAP1m3</i>	<i>GDAP1</i> c.652C>G, p.Gln218Glu	n.p.b.
pCMV6-XL5- <i>GDAP1m4</i>	<i>GDAP1</i> c.664G>A, p.Glu222Lys	n.p.b.
pCMV6-XL5- <i>GDAP1m5</i>	<i>GDAP1</i> c.715C>T, p.Leu239Phe	n.p.b.
pCMV6-XL5- <i>GDAP1m6</i>	<i>GDAP1</i> c.368A>G, p.His123Arg	n.p.b.
pCMV6-XL5- <i>GDAP1m8</i>	<i>GDAP1</i> c.467C>G, p.Ala156Gly	n.p.b.
pIRES2-AcGFP1	Wektor bicistronowy z GFP	TAKARA Bio
pIRES2-AcGFP1- <i>GDAP1</i>	<i>GDAP1</i> WT	n.p.b.
pIRES2-AcGFP1- <i>GDAP1m1</i>	<i>GDAP1</i> c.456delC, p.Pro153Argfs*19	n.p.b.
pIRES2-AcGFP1- <i>GDAP1m2</i>	<i>GDAP1</i> c.980G>A, p.Gly327Asp	n.p.b.
pIRES2-AcGFP1- <i>GDAP1m3</i>	<i>GDAP1</i> c.652C>G, p.Gln218Glu	n.p.b.
pIRES2-AcGFP1- <i>GDAP1m4</i>	<i>GDAP1</i> c.664G>A, p.Glu222Lys	n.p.b.
pIRES2-AcGFP1- <i>GDAP1m5</i>	<i>GDAP1</i> c.715C>T, p.Leu239Phe	n.p.b.
pIRES2-AcGFP1- <i>GDAP1m6</i>	<i>GDAP1</i> c.368A>G, p.His123Arg	n.p.b.
pIRES-AcGFP1- <i>GDAP1m8</i>	<i>GDAP1</i> c.467C>G, p.Ala156Gly	n.p.b.

**Tabela 3.** Plazmidy stosowane w pracy. Skrót n.p.b. - skonstruowane na potrzeby badań.

### 3.4 Startery wykorzystywane w pracy

W tabeli 4 przedstawiono sekwencje starterów wykorzystywanych w pracy:

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'-3'
GDAP1r1F	CAGTGTGGAGGGAGAAGTC
GDAP1r1R	TAAGCCGGGATCATGGAGTC
GDAP1r2F	AGAACACCCAGGTTAATGCC
GDAP1r2R	GCTTTCCGTTTCCCCAGTTT
GDAP1r3F	AGAAGAGGGCCAGCAACC
GDAP1r3R	GGCAATCACAGGGTCTAGCT

**Tabela 4.** Startery stosowane w pracy.

W tabeli 5 przedstawiono sekwencje starterów wykorzystywanych w mutagenzie:

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'-3'
GDAP1_g980a_F	CACTCCTGCAAGCAAATCAACCACAAGGGTCGT
GDAP1_g980a_R	ACGACCCTTGTGGTTGATTTGCTTGCAGGAGTG
GDAP1_c458t_F	TTGTAGTTGCATAAGCCAGGATCATGGAGTCCACA
GDAP1_c458t_R	TGTGGACTCCATGATCCTGGCTTATGCAACTACAA
GDAP1_c652g_F	CAATTCAGTTTCAACCTCATCCAAGACTTTCTCCAATC
GDAP1_c652g_R	GAGTTGGAGAAAGTCTTGGATGAGGTTGAACTGAATTG
GDAP1_g664a_F	TTCTTCATTTCTTCTTTGCAATTTAGTTTCAACCTGATCCAAG ACTT
GDAP1_g664a_R	AAGTCTTGGATCAGGTTGAACTAAATTGCAAAGAAGAAAT GAAGAA
GDAP1_c715t_F	GGATTCACCGCAGAACCAAGGTTGCTGGC
GDAP1_c715t_R	GCCAGCAACCTTGGTTCTGCGGTGAATCC
GDAP1_a368g_F	GCAGCTCTCGGTAACGTTGTACCCGTGGG
GDAP1_a368g_R	CCCACGGGTACAACGTTACCGAGAGCTGC
GDAP1_c467g_F	TACGAATCCTTGTAGTTCATAAGCCGGGATCATG
GDAP1_c467g_R	CATGATCCCGGCTTATGGAAGTACAAGGATTCGTA

**Tabela 5.** Startery stosowane w mutagenzie.

### 3.5 Linie komórkowe

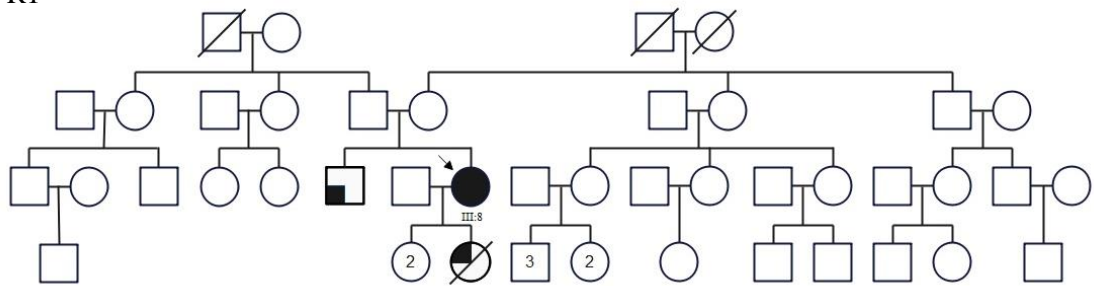
Ekspresja genu *GDAP1* początkowo została scharakteryzowana w linii komórkowej wyizolowanej z mysich komórek nerwiaka niedojrzałego (Neuro2a) [51]. Ze względu na udział białka GDAP1 w patogenezie CMT oraz podobieństwo pochodzenia z komórkami linii Neuro2a, badania prowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej SH-SY5Y (Sigma-Aldrich), pochodzącej z nerwiaka niedojrzałego od czteroletniej dziewczynki chorującej na nerwiaka niedojrzałego. Linia komórkowa SH-SY5Y jest wykorzystywana w badaniach neurobiologicznych od wielu lat [54,70,71]. Komórki linii SH-SY5Y charakteryzują się wysoką ekspresją endogennego genu *GDAP1*, co pozwoliło na zaobserwowanie wyników obniżenia ekspresji *GDAP1*. Możliwe było również zaobserwowanie efektów nadekspresji *GDAP1* w komórkach SH-SY5Y. Niestety, ze względu na wysoką ekspresję endogennego genu *GDAP1*, nie było możliwe zaobserwowanie skutków recesywnych mutacji genu *GDAP1* w tej linii komórkowej. W związku z tym do dalszych eksperymentów wykorzystano szeroko stosowaną linię komórkową HeLa (ATCC), pochodzącą z komórek nabłonka raka szyjki macicy uzyskanych w 1951 roku od 31-letniej Afroamerykanki Henrietty Lacks. Linia komórkowa HeLa charakteryzuje się niską ekspresją genu *GDAP1* i była odpowiednim modelem do analizy recesywnych mutantów genu *GDAP1*. Dotychczas, komórki HeLa były wykorzystywane w analizie różnych mutantów genu *GDAP1* [48,72,73].

### 3.6 Metody badawcze

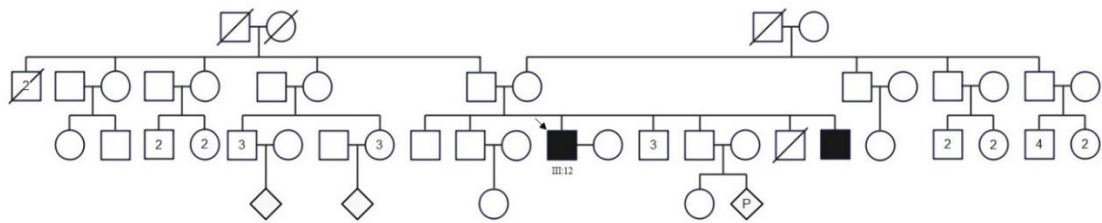
#### 3.6.1 Zebranie dokumentacji medycznej pacjentów

Od pacjentów będących pod opieką Zespołu Chorób Nerwowo – Mięśniowych IMDiK PAN, ze zidentyfikowanymi mutacjami w genie *GDAP1*, zebrano dokumentację medyczną, obejmującą dane dotyczące stanu klinicznego chorych oraz pełne protokoły badań elektrofizjologicznych. W badanych rodzinach zebrano wywiad i wykreślono kilkupokoleniowe rodowody (Rycina 4). Wszyscy konsultowani w Zespole pacjenci wyrazili świadomą zgodę na wykonanie badań genetycznych w ramach badań naukowych. Wybraną grupę chorych zakwalifikowano do analizy sekwencjonowania całego egzomu i analizowano dodatkowe warianty sekwencji w innych „genach CMT”.

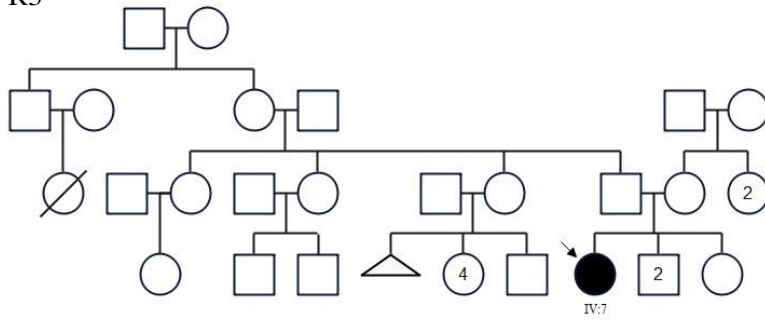
R1



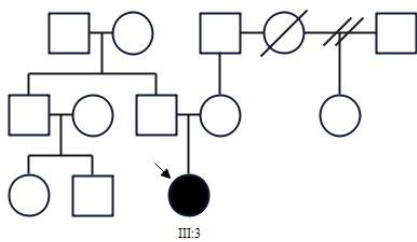
R2



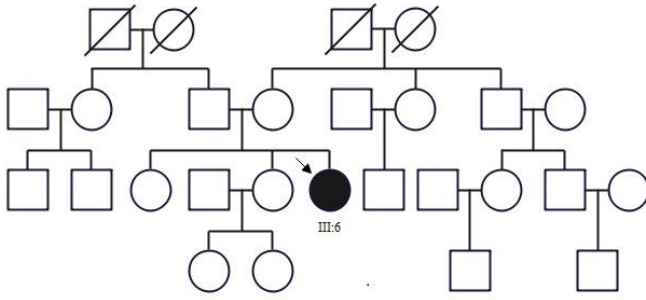
R3



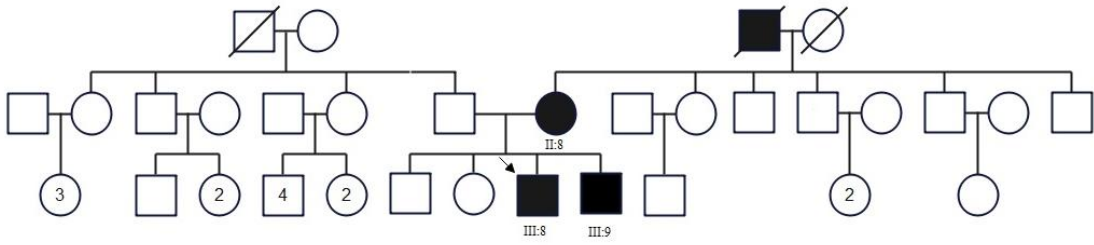
R4



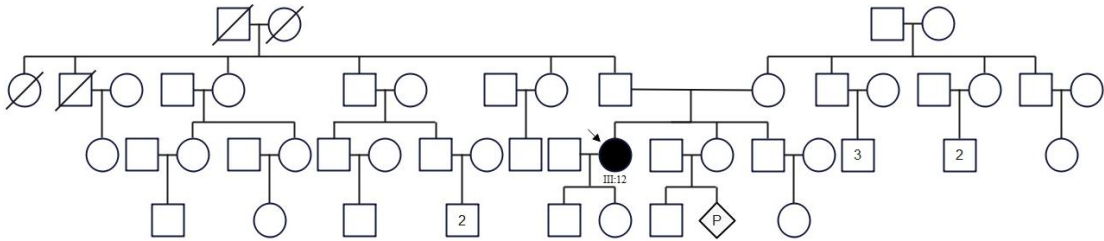
R5



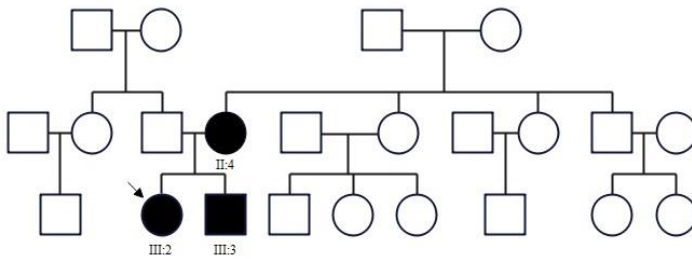
R6

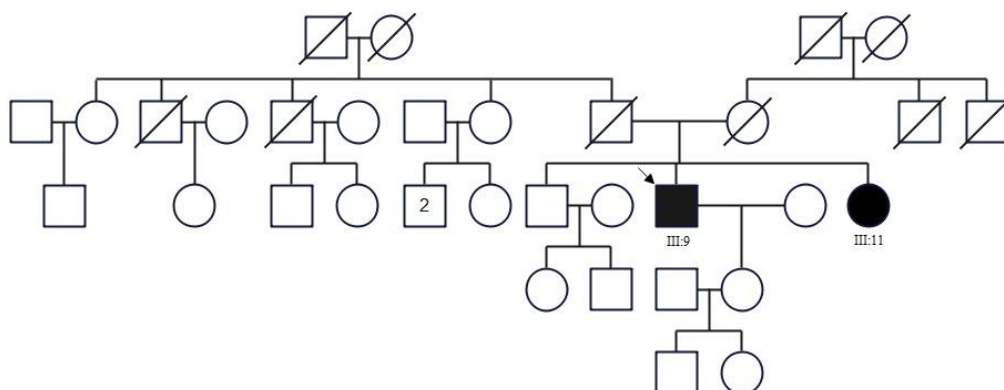


R7



R8





**Rycina 4.** Rodowody grupy badanej. Kółkami oznaczono kobiety, kwadratami oznaczono mężczyzn, rąb oznacza osobę o nieznanym płci, przekreślony symbol oznacza osobę zmarłą, czarne symbole oznaczają osoby chore, strzałka wskazuje probanta, litera „P” oznacza poronienie, cyfra w kwadracie lub kółku oznacza liczbę zdrowych osób danej płci. Cyfry rzymskie oznaczają pokolenia, cyfry arabskie oznaczają kolejne osoby w danym pokoleniu. Celem anonimizacji rodowodów zostały one uproszczone tam, gdzie modyfikacja w rodowodzie nie niosła ze sobą zmiany merytorycznej.

### 3.6.2 Sekwencjonowanie całego egzomu

Sekwencjonowanie całego egzomu (ang., *Whole Exome Sequencing*, WES) pacjentów przeprowadzono zgodnie z protokołem TruSeq Exome Enrichment Guide firmy Illumina, używając zestawu SureSelect Human All Exon 50 Mb (Agilent Technologies). Zhybrydyzowane fragmenty związano z kulkami streptawidyny, natomiast niezhybrydyzowane fragmenty wypłukano. Następnie, bibliotekę zweryfikowano przy użyciu Agilent 2100 Bioanalyzer i zsekwencjonowano za pomocą HiSeq 2000 (Illumina) w Intelliseq LLC (Kraków).

### 3.6.3 Analiza danych sekwencji egzomu

Odczyty sekwencji analizowano przy użyciu algorytmów stosowanych w Intelliseq LLC (Kraków). Odczyty w formacie FASTQ uzyskane podczas sekwencjonowania fragmentów kodujących porównano do ludzkiego genomu referencyjnego GRCh38 z użyciem algorytmu BWA-MEM. Wynikowy plik BAM poddano obróbce według protokołu GATK 3.7 Best Practices z wykorzystaniem oprogramowania GATK lub równoważnego oprogramowania Sentieon. Odczyty z dużym udziałem niedopasowanych zasad usunięto. Następnie zidentyfikowane warianty w formacie VCF annotowano przy użyciu baz danych: HGMD



(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>), gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), MITOMAP (<http://www.mitomap.org/MITOMAP/>), Human Phenotype Ontology (<https://hpo.jax.org/app/>) oraz GeneAtlas (<http://geneatlas.roslin.ed.ac.uk/>). Zannotowany plik VCF poddano filtrowaniu i priorytetyzacji. Odfiltrowano warianty powszechne (przy maksymalnym progu częstotliwości 0,05) i o niskim wpływie na produkt genowy. Finalną listę wariantów walidowano z użyciem programu Interactive Genome Viewer.

Do analizy wybrano 154 geny nazywając je „genami CMT” (Tabela S5). Pod tym pojęciem rozumiemy zarówno geny związane z czystą (ang., *pure*) polineuropatią CMT, jak i geny związane z wybranymi dziedzicznymi zespołami, w których występuje polineuropatia obwodowa. Dodatkowo przeanalizowano geny związane z występowaniem objawów towarzyszących (np. objawów kardiologicznych) w badanej grupie pacjentów.

### **3.6.4 Opracowanie skali genotypowej i fenotypowej CMT-GDAP1**

#### **a) Sumaryczny efekt „siły” wariantów sekwencji w „genach CMT”**

Na potrzeby badań stworzono wewnętrzną skalę genotypową obejmującą sposoby dziedziczenia, układy homozygotyczne i heterozygotyczne oraz patogenność wariantów sekwencji uzyskaną z bazy ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Następnie sumowano „siłę” poszczególnych wariantów. Posługiwano się następującą punktacją:

Cechy poszczególnych wariantów sekwencji w „genach CMT”		Liczba punktów
Sposoby dziedziczenia	Autosomalne dominujące	2 pkt.
	Autosomalne recesywne	1 pkt.
Układ	Homozygotyczny	2 pkt.
	Heterozygotyczny	1 pkt.
Patogenność wariantów	Łagodny	1 pkt.
	Prawdopodobnie łagodny	1,5 pkt.
	O nieznanym działaniu	2 pkt.
	Prawdopodobnie patogenny	2,5 pkt.
	Patogenny	3 pkt.
	Nieokreślony status patogenności	1 pkt.

**Tabela 6.** Punktacja przypisana poszczególnym cechom wariantów sekwencji.

#### **b) Fenotyp pacjentów**

Równocześnie, niezależnie, w celu analizy oraz porównania danych klinicznych pacjentów cierpiących na chorobę CMT-GDAP1, opracowano skalę fenotypową opartą na opisach klinicznych pacjentów w dostępnych danych literaturowych. Na podstawie badań elektrofizjologicznych oraz neurologicznych, a także biorąc pod uwagę wiek wystąpienia choroby oraz dodatkowe objawy stworzono skalę fenotypów. Zdecydowano o zastosowaniu wewnętrznej skali fenotypowej z uwagi na odmienną kliniczną chorobę CMT-GDAP1. Powszechnie stosowane skale oceny fenotypu polineuropatii koncentrują się na chorobie CMT1A i nie pozwalają uchwycić odrębności klinicznych polineuropatii CMT-GDAP1, czy CMT-MFN2 [74]. Podobnie, jak w przypadku skali genotypowej i w tym przypadku, zsumowano punkty, zgodnie z następującą przyjętą przez nas punktacją:

<b>Cechy fenotypu pacjentów z CMT</b>		<b>Liczba punktów</b>
Wiek wystąpienia pierwszych objawów	przed 5 rokiem życia	2 pkt.
	między 6, a 19 rokiem życia	1 pkt.
	powyżej 20 roku życia	0,5 pkt.
Badania elektrofizjologiczne i neurologiczne	Asymetryczny brak odruchów skokowych	0,5 pkt.
	Oslabione odruchy skokowe	0,25 pkt.
	Symetryczny brak odruchów skokowych	1 pkt.
	Brak odruchów kolanowych	1 pkt.
	Brak odruchów w kończynach górnych	1 pkt.
	Oslabione odruchy kolanowe	0,5 pkt.
	Zmniejszenie złożonego mięśniowego potencjału czynnościowego (CMAP)	0,5 pkt.
	Znaczne zmniejszenie CMAP	1 pkt.
	Brak czuciowego potencjału czynnościowego nerwu (SNAP)	2 pkt.
	Zmniejszenie wartości SNAP	1 pkt.
Dodatkowe objawy	Wydrążenie stopy	1pkt.
	Przykurcz ścięgna Achillesa	1 pkt.
	Oslabienie mięśni dłoni	1 pkt.
	Demielinizacja	2 pkt.
	Pofałdowanie mieliny	1 pkt.
	Poruszanie się na wózku	1 pkt.

**Tabela 7.** Punktacja przypisana poszczególnym cechom fenotypu pacjentów.

### 3.6.5 Wybór mutacji w genie *GDAP1*

Przeanalizowano siedem mutacji w genie *GDAP1*, wyselekcjonowanych w oparciu o kryteria:

#### 1. Dziedziczenie mutacji:

- dziedziczenie autosomalne recesywne:

c.980G>A, p.Gly327Asp, c.715C>T, p.Leu239Phe

- dziedziczenie autosomalne dominujące:

c.652C>G, p.Gln218Glu, c.664G>A, p.Glu222Lys, c.368A>G, p.His123Arg, c.467C>G, p.Ala156Gly

#### 2. Częstość występowania mutacji w populacji: c.715C>T, p.Leu239Phe

3. Dostępność danych klinicznych pacjentów cierpiących na chorobę CMT, związaną z określonym typem mutacji.

Mutacja c.456delC, p.Pro153Argfs\*19 nigdy nie została zidentyfikowana u żadnego pacjenta z chorobą kręgu CMT. Została uzyskana przez mutagenезę i była analizowana, jako przykład mutacji reprezentującej mutację utraty funkcji (ang., *loss off function*) białka *GDAP1*.

### 3.6.6 Projektowanie starterów

Startery zaprojektowano przy użyciu programu Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>). Startery do mutagenезy zaprojektowano przy użyciu programu QuickChange Primer Design (Agilent) (<https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>).

### 3.6.7 Hodowla komórek bakteryjnych

#### 3.6.7.1 Warunki hodowli bakteryjnych

W celu otrzymania pojedynczych kolonii bakterii, bakterie hodowano na podłożu stałym LB-agar z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego – kanamycyna (Thermo Fisher Scientific). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C przez noc. W celu uzyskania czystego DNA, płynną pożywkę LB, z dodatkiem kanamycyny,

zaszczepiano pojedynczą kolonią bakterii (z plazmidowym DNA) i inkubowano, z wytrząsaniem z prędkością 250 rpm, w temperaturze 37°C przez noc.

### **3.6.7.2 Przygotowanie bakterii chemokompetentnych**

Do 500 ml płynnej pożywki LB dodano 100 ml całonocnej hodowli bakterii. Następnie bakterie inkubowano, z wytrząsaniem z prędkością 250 rpm, w temperaturze 37°C. Co 20 minut mierzono OD<sub>600</sub> (ang., *Optical Density*), do czasu, gdy gęstość optyczna zawiesiny osiągnęła wartość z przedziału 0,3-0,4. Po uzyskaniu odpowiedniego OD, hodowlę bakteryjną inkubowano na lodzie przez 10 minut, po czym wirowano w 4°C, przez 10 minut z prędkością 4000 x g. Osad bakteryjny zawieszono w schłodzonym buforze CaCl<sub>2</sub> w objętości równej 1/20 początkowej objętości hodowli. Następnie inkubowano przez 10 minut na lodzie, po czym powtórnie wirowano. Komórki zawieszono w roztworze CaCl<sub>2</sub> z 15% glicerolem. Podzielono na porcje, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

### **3.6.7.3 Transformacja bakterii chemokompetentnych**

Do zawiesiny komórek kompetentnych *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific) dodawano 5 µl produktu ligacji. Inkubowano 30 minut na lodzie, po czym ogrzewano 30 sekund w temperaturze 42°C. Następnie inkubowano 2 minuty na lodzie. Do transformowanych komórek dodawano 550-850 µl płynnej pożywki LB i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1,5 godziny. Otrzymaną zawiesinę bakterii rozprowadzano na szalkach ze stałą pożywką LB zawierającą kanamycynę. Szalki inkubowano w temperaturze 37°C przez noc.

### **3.6.7.4 Mutageneza genu *GDAP1* na plazmidzie pCMV6-XL5**

Przeprowadzono mutagenezę genu *GDAP1* w wektorze pCMV6-XL5 (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD, USA; SC317569). Mutagenezę mutacji w genie *GDAP1* (c.980G>A, p.Gly327Asp, c.458C>T, p.Pro153Leu, c.652C>G, p.Gln218Glu, c.664G>A, p.Glu222Lys, c.715C>T, p.Leu239Phe, c.368A>G, p.His123Arg oraz c.467C>G, p.Ala156Gly) przeprowadzono przy użyciu zestawu Mut Express II Fast Mutagenesis Kit V2 (Vazyme Biotech Co., Ltd.), zgodnie z zaleceniami producenta, po czym zweryfikowano poprzez sekwencjonowanie.

### 3.6.7.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Reakcję PCR prowadzono z użyciem polimerazy Taq (Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem starterów w buforze dostarczonym przez producenta. Reakcję o poniższym składzie przeprowadzono w objętości 12,5  $\mu$ l:

<b>Skład mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Objętość</b>
DNA	2 $\mu$ l
Bufor do polimerazy Taq bez Mg <sup>2+</sup>	1,25 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	0,75 $\mu$ l
Mieszanina dNTP	0,25 $\mu$ l
Starter F (10pmol)	0,20 $\mu$ l
Starter R (10pmol)	0,20 $\mu$ l
Polimeraza Taq	0,1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7,75 $\mu$ l

**Tabela 8.** Skład mieszaniny reakcyjnej.

Warunki temperaturowe reakcji PCR przedstawiono w tabeli 9:

<b>Etap reakcji PCR</b>	<b>Warunki reakcji PCR</b>
Wstępna denaturacja	95°C – 2 minuty
Denaturacja	95°C – 45 sekund }x35
Przyłączanie starterów	56-62°C – 45 sekund }x35
Elongacja	72°C – 1 minuta }x35
Końcowa elongacja	72°C – 7 minut
Chłodzenie	4°C – 20 godzin

**Tabela 9.** Profil termiczny reakcji.

### 3.6.7.6 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Fragmenty DNA poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym, w buforze 1 x TBE, przy stałym napięciu 80 V. Jako znacznik wielkości używano GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

### **3.6.7.7 Oczyszczanie fragmentów DNA**

Po rozdzieleniu w żelu agarozowym fragmentów DNA, wycinano odpowiednie prążki, a następnie izolowano DNA, przy użyciu zestawu Gel Extraction Kit (Qiagen). Produkty po reakcji PCR, oczyszczano za pomocą EPPiC (A&A Biotechnology).

### **3.6.7.8 Sekwencjonowanie DNA**

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono przy użyciu zestawu Bright – Dye™ Terminator (Nimagen), według zaleceń producenta. Rozdział fragmentów pozyskanych po reakcji sekwencjonowania wykonano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN. Otrzymane sekwencje porównywano do sekwencji referencyjnych przy użyciu programu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **3.6.7.9 Określenie stężenia DNA plazmidowego**

Czystość i stężenie preparatów DNA sprawdzano przez pomiar absorbancji przy długościach fal 260 nm oraz 280 nm, mierzonej przy użyciu spektrofotometru DS-11 (DeNovix).

### **3.6.7.10 Przeklonowanie mutantów do wektora bicistronowego pIRES-AcGFP1**

cDNA *GDAPI* subklonowano z pCMV6-XL5 do wektora pIRES2-AcGFP1 (TAKARA Bio) przy użyciu enzymów *SacI* i *Sall* (Thermo Fisher Scientific).

### **3.6.7.11 Ligacja fragmentów DNA**

Ligację przeprowadzono z użyciem zestawu Anza™ T4 DNA Ligase Master Mix (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl. Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej.

### **3.6.7.12 Izolacja plazmidów w małej skali**

Pojedyncze kolonie bakterii (zawierające pożądany plazmid) wyhodowane na stałej pożywce LB przenoszono do 2 ml płynnej pożywki LB zawierającej kanamycynę, po czym inkubowano, z wytrząsaniem z prędkością 250 rpm,

w temperaturze 37°C, przez noc. Izolację plazmidów w małej skali przeprowadzono z użyciem gotowego zestawu odczynników Plasmid Mini (A&A Biotechnology), zgodnie z zaleceniami producenta.

### **3.6.7.13 Izolacja plazmidów w dużej skali**

Izolację plazmidów w dużej skali prowadzono z użyciem gotowego zestawu odczynników EZgene (BIOMIGA), zgodnie z zaleceniami producenta.

### **3.6.8 Hodowla komórek ssaczych**

Linie komórkowe hodowano na szalkach w odpowiedniej pożywce hodowlanej, aż do osiągnięcia konfluencji.

#### *Hodowla komórek SH-SY5Y*

Linie komórkową SH-SY5Y prowadzono w temperaturze 37°C w warunkach 95% wilgotności i 5% zawartości CO<sub>2</sub> na podłożu hodowlanym DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, Thermo Fisher Scientific), 1% koktajlem niezbędnych aminokwasów (NEAA, Sigma-Aldrich), a także antybiotykami (100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny, Thermo Fisher Scientific) i urydyną 10 mg/ml (Sigma-Aldrich).

#### *Hodowla komórek HeLa*

Linie komórkową HeLa hodowano na pożywce Eagle w modyfikacji Dulbecco (DMEM, GlutaMax, Thermo Fisher Scientific) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, Thermo Fisher Scientific) oraz antybiotykami (100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny, Thermo Fisher Scientific) i urydyną 10 mg/ml (Sigma-Aldrich) w temperaturze 37°C w warunkach 95% wilgotności i 5% zawartości CO<sub>2</sub>.

Komórki pasażowano, co 2-3 dni. W tym celu usuwano bufor hodowlany, komórki przepłukiwano roztworem PBS i inkubowano w 0,25% roztworze trypsyny (Sigma-Aldrich) z dodatkiem 0,53 mM EDTA. Po 4-5 minutach dodawano pożywkę hodowlaną, zapobiegając działaniu trypsyny. Zawiesinę komórek zbierano i wirowano przez 3 minuty z prędkością 200 x g. Supernatant usuwano, komórki zawieszano w pożywce hodowlanej i wysiewano do dalszej hodowli.



W celu długoterminowego przechowywania linii komórkowych, po trypsynizacji komórki wirowano, po czym zawieszano w pożywce DMEM z dodatkiem 20% FBS i 10% DMSO. Komórki zamrażano w pojemniku mrozeniowym wypełnionym izopropanolem. Następnie probówki z zamrożonymi komórkami umieszczano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ , po czym, w celu dłuższego przechowywania, przenoszono do ciekłego azotu.

### **3.6.9 Transfekcja komórek ssaczych**

Komórki linii SH-SY5Y oraz HeLa transfekowano za pomocą wektora pIRES2-AcGFP1 przy użyciu odczynnika Viromer Red (Lipocalyx), zgodnie z zaleceniem producenta ze standardową skalą transfekcji. Następnie wymieniano medium 48 godzin po transfekcji. Powstałe transfektanty SH-SY5Y i HeLa hodowano w odpowiednich podłożach hodowlanych z dodatkiem  $500\ \mu\text{g/mL}$  G418 (Lab Empire) przez 2 tygodnie.

#### **3.6.10 Wyciszanie ekspresji genu *GDAP1* za pomocą siRNA**

W celu wygenerowania linii komórkowej SH-SY5Y z obniżoną ekspresją genu *GDAP1*, komórki wysiewano na 24-dółkowe płytki o konfluencji około 70-80% i transfekowano przy użyciu  $1,6\ \mu\text{l}$  siRNA ( $10\ \mu\text{M}$  roztworu) (QIAGEN) na dołek oraz Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Klonalne linie komórkowe testowano pod kątem obniżenia ekspresji *GDAP1* przy użyciu metody Western-blot.

#### **3.6.11 Oznaczanie żywotności komórek**

Żywotność komórek SH-SY5Y oznaczano za pomocą barwienia przyżyciowego błękitem trypanu przy użyciu automatycznego licznika komórek Countess II (Invitrogen). Komórki SH-SY5Y zliczano i rozcieńczano w celu uzyskania stężenia około  $2\text{M}$  komórek/ml.  $10\ \mu\text{l}$  0,4% błękitu trypanu (Sigma-Aldrich) i  $10\ \mu\text{l}$  zawiesiny komórek mieszano i inkubowano około 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki natychmiast umieszczano na jednorazowych szkiełkach i automatycznie obliczano procent żywych komórek.

### 3.6.12 Oznaczanie względnych ilości białka metodą Western-blot

#### *Przygotowanie lizatów komórkowych*

Komórki po trypsynizacji, płukano roztworem PBS, po czym zalewano buforem do lizy komórek Cell Lyss Buffer (Cell Signaling Technology) z 1 mM PMSF oraz inhibitorem proteazy 1/200 v/v (Sigma-Aldrich). Po inkubacji na lodzie, próbki sonikowano w temperaturze 4°C i wirowano 20 minut przy 16000 x g w 4°C. W powstałym supernatancie oznaczano stężenie białka metodą Lowry'ego przy użyciu gotowego zestawu Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Do przygotowanych lizatów komórkowych dodawano odpowiednią ilość czterokrotnie stężonego buforu obciążającego (pH 6,8) o składzie Tris-HCl (0,5M), SDS (10%), merkaptoetanol (5%), glicerol (12,5%) błękit bromofenolowy (0,1 %), po czym ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 95°C.

#### *Przygotowanie żeli poliakrylamidowych*

Rozdział elektroforetyczny białek przeprowadzano z użyciem żeli poliakrylamidowych:

a) rozdzielającego o składzie: Tris (1,5 M o pH 8,8) SDS (10%), nadsiarazan amonu (APS 10%), TEMED, a także różnej zawartości akrylamid w zależności od masy cząsteczkowej analizowanych białek

oraz

b) zagęszczającego o składzie: Tris (0,5 M o pH 6,8) SDS (10%), nadsiarazan amonu (APS 10%), TEMED oraz akrylamid (5%).

#### *Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), transfer na błonę nitrocelulozową i immunodetekcja*

Ekstrakty komórkowe zawierające określoną ilość białka (25 µg) nanoszono na studzienki w żelach poliakrylamidowych i rozdzielano metodą elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w buforowanym roztworze do elektroforezy o składzie: Tris (25 mM, pH 8,3), glicyna (192 mM) oraz 0,1% SDS przy stałym natężeniu prądu 80V przez 30 minut i 145 V przez 1 godzinę. Każdorazowo na żel nakładano 5 µl białkowego markera masy cząsteczkowej.

Po zakończonej elektroforezie dokonywano transferu białek z żelu na membranę nitrocelulozową Amersham Protran (GE Healthcare BioSciences AB) o wielkości porów 0,45  $\mu\text{m}$  używając buforowanego roztworu do transferu składającego się z: Tris (25 mM), glicyna (192mM), SDS oraz 20% metanol. Transfer prowadzono przy stałym natężeniu prądu 350 mA przez 1,5 godziny w 4°C. Po zakończeniu transferu błonę przepłukiwano roztworem TBST: Tris (20mM, pH 7,6), NaCl (150mM), po czym blokowano w 5% odtłuszczonym mleku rozpuszczonym w TBST przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie błonę inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami:

- króliczym poliklonalnym anty-GDAP1 (Sigma-Aldrich), rozcieńczonym 1:300,
- mysim monoklonalnym anty-GM130 (BD Transduction Laboratories), rozcieńczonym 1:150,
- króliczym poliklonalnym anty-TGN46 (Sigma-Aldrich), rozcieńczonym 1:250,
- mysim monoklonalnym anty-VDAC1 (Santa Cruz), rozcieńczonym 1:500,
- króliczym poliklonalnym anty-NDUFS1 (Proteintech), rozcieńczonym 1:500,
- mysim monoklonalnym anty-Bcl2 (Onoprotein), rozcieńczonym 1:250,
- mysim poliklonalnym anty-Bcl-xl (Proteintech), rozcieńczonym 1:1000,
- króliczym poliklonalnym anty-Bax (Proteintech), rozcieńczonym 0,15:1000,
- mysim monoklonalnym anty-Cytochrom c (Proteintech), rozcieńczonym 1:20000,
- króliczym poliklonalnym anty-PARP1 (Proteintech), rozcieńczonym 1:1000,
- mysim monoklonalnym anty-Kaspaza-3 (Proteintech), rozcieńczonym 1:2000,

przez noc w 4°C. Po tym czasie błonę płukano roztworem TBST i inkubowano z odpowiednimi drugorzędowymi przeciwciałami, sprzężonymi z peroksydazą chrzanową: kozim antykróliczym IgG (Sigma-Aldrich), oraz króliczym antymysim IgG (Sigma-Aldrich), 30 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji błonę płukano w roztworze TBST i dokonywano wizualizacji sygnału przy użyciu zestawu Western Bright Sirius (Western blotting detection kit, Advansta) oraz aparatu ChemiDoc.

Analiza densytometryczna poziomów białek wykonana została z użyciem programu Image Lab 6.1 BIO-RAD. Poziomy białek odnoszono do membran barwionych Ponceau S.

### **3.6.13 Barwienie immunofluorescencyjne i mikroskopia konfokalna**

Komórki linii SH-SY5Y i HeLa hodowano na 12 mm szkiełkach nakrywkowych. Komórki utrwalono poprzez inkubację przez 15 minut w 4% formaldehydzie w PBS, a następnie permeabilizację przez 10 minut w 0,5% Triton-X w PBS oraz zablokowanie przez 1 godzinę w 0,1% Triton-X i 2% BSA w PBS. Szkiełka inkubowano przez noc z pierwszorzędowymi przeciwciałami:

- mysim monoklonalnym anti-GM130 (BD Transduction Laboratories), rozcieńczonym 1:40,
- króliczym poliklonalnym anti-B4GALT3 (Proteintech), rozcieńczonym 1:65,
- króliczym poliklonalnym anti-GORASP2 (Proteintech), rozcieńczonym 1:300,
- króliczym poliklonalnym anti-TGN46 (Sigma-Aldrich), rozcieńczonym 1:200.

Po przepłukaniu szkiełka inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem Alexa Fluor 546 skoniugowanym z kozim antykróliczym lub antymysim IgG (Invitrogen) rozcieńczonym 1:500 przez 1 godzinę. Następnie preparaty barwiono za pomocą DAPI (Thermo Fisher Scientific) przez 15 minut, po czym osadzano/montowano w medium montażowym (DAKO, Agilent). Komórki oglądano w mikroskopie konfokalnym LSM 780 Axio Observer Z.1 (Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Obrazy zostały zebrane przy użyciu oprogramowania Zen 2012 black edition (Zeiss). Obserwacje mikroskopii konfokalnej przeprowadzono w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Techniek Mikroskopowych w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN.

### **3.6.14 Transmisyjna mikroskopia elektronowa**

Komórki utrwalano w 0,1 M buforze kakodylanowym (BDH Chemicals) zawierającym 2,5% glutaraldehyd i 2% paraformaldehyd przez 1 godzinę w 4°C, po czym płukano w samym buforze kakodylanowym 3 razy po 10 minut. Następnie komórki

inkubowano w 2% czterotlenku osmu (Agar Scientific) w buforze kakodylanowym przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Płukano wodą dejonizowaną 3 razy po 10 minut. Odwadnianie przeprowadzono, inkubując komórki we wzrastających stężeniach etanolu (50%, 70%, 90%, 95%, 100%). Podczas odwadniania przeprowadzono kontrastowanie: roztwór 70% etanolu zawierał 2% octan uranylu (Serva). Następnie inkubowano komórki w mieszaninie etanol:tlenek propylenu (Electron Microscopy Sciences) 1:1 oraz 1:2, a ostatecznie w czystym (100%) tlenku propylenu. Zamiana etanolu na tlenek propylenu spowodowana była tym, że żywica Epon (Serva) słabo rozpuszcza się w etanolu. W następnych krokach rozpoczęto przesycanie żywicą Epon: najpierw inkubowano komórki w roztworze tlenek propylenu:Epon 1:1, następnie 1:2, a ostatecznie w czystym Eponie. Po zakończeniu etapu polimeryzacji w 60°C, bloczki z zatopionymi komórkami krojono na skrawki grubości 70 nm, które zbierano na siatki miedziane TEM (Ted Pella Inc.). Skrawki wykontrastowano octanem uranylu, a także cytrynianem ołowiu. Obrazowanie przeprowadzono przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego JEM 1400 przy 80 kV (JEOL Co., Tokio, Japonia) w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

### **3.6.15 Analiza statystyczna**

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism (San Diego, CA, USA) (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Do oceny istotności statystycznej różnic między poziomami białek zastosowano jednokierunkową analizę ANOVA z korektą Dunnetta, natomiast do oceny istotności statystycznej różnic między frakcjami komórek o wskazanych typach ultrastruktury aparatu Golgiego użyto jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Bonferroniego. Wyniki przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń  $\pm$ odchylenia standardowe. Różnice są uważane za istotne statystycznie, gdy  $p\text{Value} < 0,05$  z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 4. WYNIKI

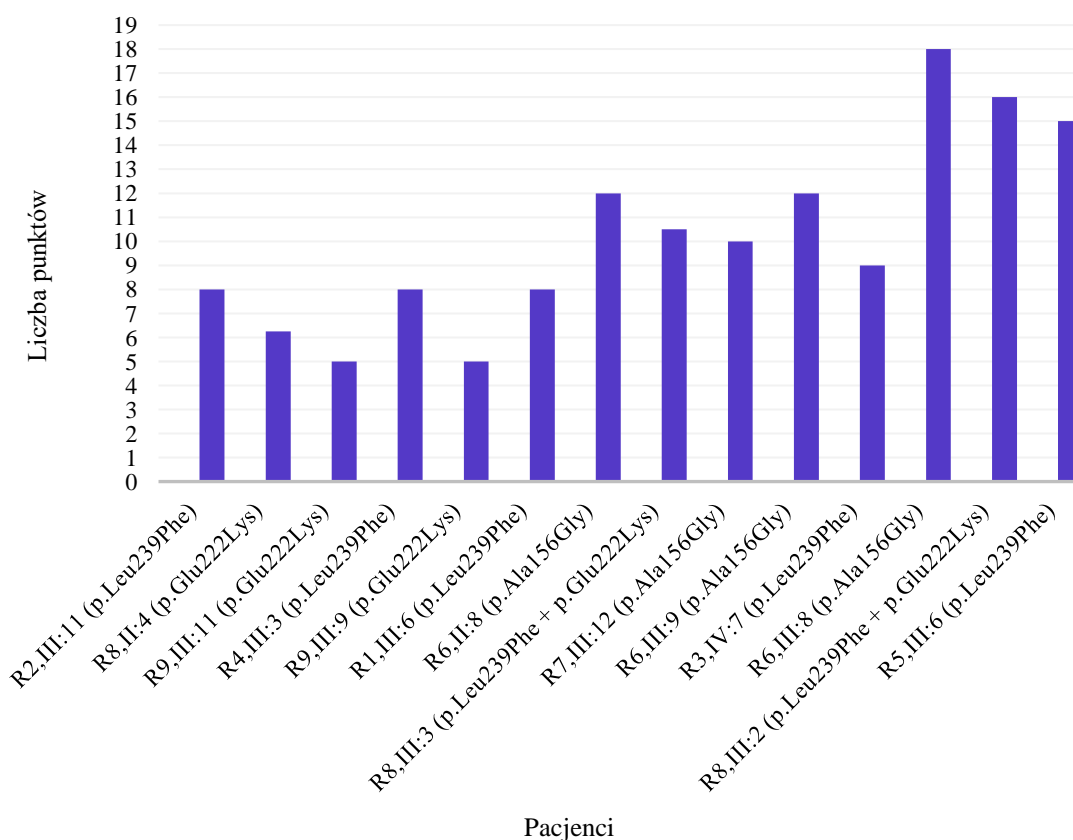
### 4.1 Tło genetyczne choroby CMT-GDAP1

#### 4.1.1 Analiza wariantów sekwencji w innych „genach CMT” w grupie pacjentów CMT-GDAP1

Nazwa choroba CMT-GDAP1 jest wspólnym określeniem, dla wszystkich podtypów CMT z mutacjami w genie *GDAP1*. W rzeczywistości jednak choroba CMT-GDAP1 charakteryzuje się szerokim spektrum fenotypów. Prawdopodobnym wytłumaczeniem tego może być oddziaływanie genów. Aby zweryfikować tę hipotezę trzeba określić „tło genetyczne”. W celu zbadania wpływu „tła genetycznego” na obraz kliniczny u wytypowanych 14 pacjentów z 9 rodzin konsultowanych w Zespole Chorób Nerwowo - Mięśniowych IMDiK PAN, ze zidentyfikowanymi głównymi patogennymi wariantami genu *GDAP1*: c.715C>T, p.Leu239Phe, c.467C>G, p.Ala156Gly oraz c.664G>A, p.Glu222Lys, przeprowadzono analizę sekwencjonowania egzomu. Określono warianty sekwencji wybranych „genów CMT” u badanych osób (Tabela S5). W kolejnym etapie opracowano dwie skale. Pierwszą skalę opartą na zebranych w bazach danych informacjach na temat wariantów sekwencji, dotyczącą „siły” poszczególnych wariantów sekwencji w genach zaangażowanych w choroby kręgu CMT (skala genotypowa) oraz drugą, obejmującą dane kliniczne pacjentów cierpiących na chorobę CMT-GDAP1 (skala fenotypowa). Następnie, poprzez porównanie dwóch skal można było oszacować, czy występuje korelacja genotypu z fenotypem w badanej grupie pacjentów. W założeniu istnienie korelacji pomiędzy skalami świadczy o wpływie „tła genetycznego” na obraz kliniczny.

Po przeprowadzeniu sekwencjonowania (WES), stwierdzono obecność dodatkowych rzadkich wariantów sekwencji w innych genach zaangażowanych w patogenezę chorób kręgu Charcot-Marie-Tooth (Tabele S1-S4). Po zsumowaniu punktacji przypisanej dla poszczególnych wariantów zgodnie z punktacją opisaną w rozdziale „Materiały i metody”, uzyskano sumaryczny, liczbowy, szacunkowy opis efektów wariantów sekwencji w „genach CMT” u badanych chorych (Rycina 5). Przykładowo, u pacjentów z Rodziny 9 (R9,III:9 i R9,III:11), oprócz mutacji patogenicznej w genie *GDAP1* c.664G>A, p.Glu222Lys dodatkowo zidentyfikowano obecność dwóch, takich samych wariantów sekwencji w „genach CMT” (Tabela S3). W związku z tym

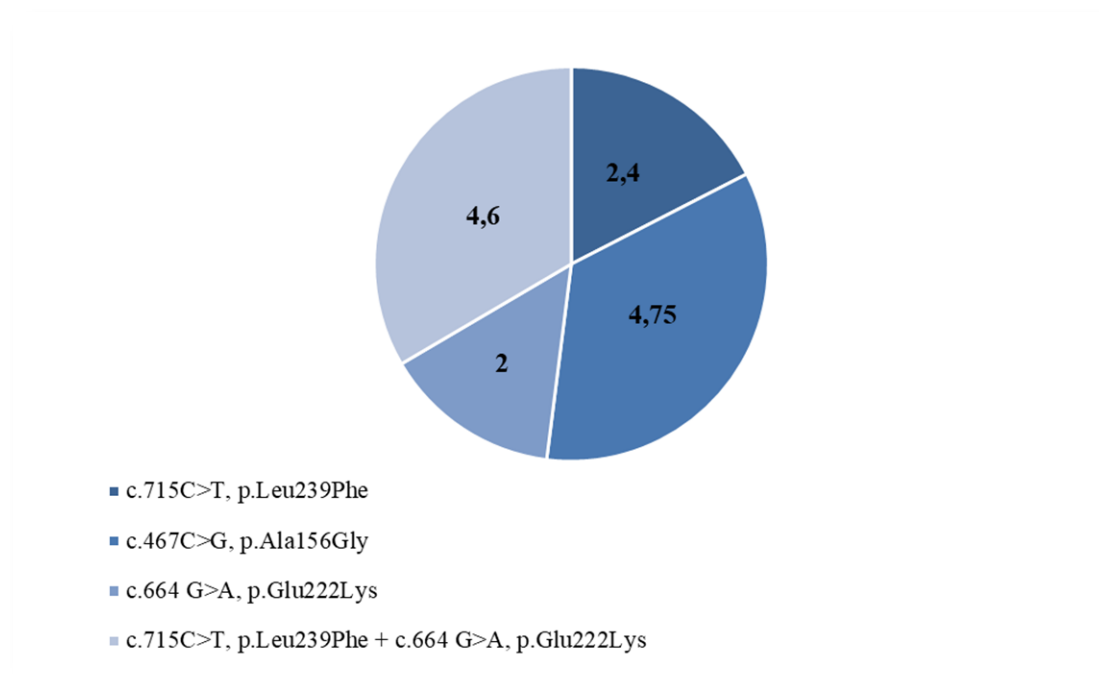
chorzy uzyskali taką samą liczbę punktów (Rycina 5). W przeciwieństwie do pacjentów z Rodziny 9, u pacjentów z Rodziny 8 (R8,II:4; R8,III:2 oraz R8,III:3) zaobserwowano zmienność wewnątrzrodzinną. U pacjenta R8,III:3 oprócz dwóch mutacji w genie *GDAP1* (c.715C>T, p.Leu239Phe oraz c.664G>A, p.Glu222Lys) zidentyfikowano 2 dodatkowe warianty sekwencji, natomiast u jego siostry, pacjentki R8,III:2 oprócz dwóch mutacji w genie *GDAP1* (c.715C>T, p.Leu239Phe oraz c.664G>A, p.Glu222Lys) wykryto aż 5 dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT” (Tabela S4), co spowodowało, że uzyskali oni inną liczbę punktów (Rycina 5). Zmienność wewnątrzrodzinną zaobserwowano także w Rodzinie 6 (Tabela S2).



**Rycina 5.** Sumaryczny efekt „siły” wariantów sekwencji określonej za pomocą skali genotypowej w „genach CMT” w badanej grupie pacjentów.

W grupie badanych pacjentów zidentyfikowano średnio 3,6 dodatkowych rzadkich wariantów sekwencji w „genach CMT”. Wśród pacjentów z główną patogenną mutacją c.715C>T, p.Leu239Phe wykryto średnio 2,4 warianty sekwencji w „genach CMT”, z mutacją c.467C>G, p.Ala156Gly wykryto średnio 4,75 warianty sekwencji w „genach CMT”, natomiast z mutacją c.664G>A, p.Glu222Lys wykryto średnio

2 warianty w sekwencji w „genach CMT”. U pacjentów z dwoma mutacjami w genie *GDAP1* c.715C>T, p.Leu239Phe oraz c.664G>A, p.Glu222Lys występowało średnio 4,6 warianty sekwencji w genach, zaangażowanych w patogenezę chorób kręgu Charcot-Marie-Tooth (Rycina 6). Co ciekawe, u pacjentów z mutacjami patogennymi w genie *GDAP1* dziedziczonymi w sposób autosomalny dominujący zidentyfikowano średnio dwa razy więcej dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT” w porównaniu do pacjentów z mutacjami dziedziczonymi w sposób autosomalny recesywny.



**Rycina 6.** Graficzne przedstawienie średniej liczby wariantów sekwencji w „genach CMT” w badanej grupie pacjentów.

#### 4.1.2 Analiza fenotypów pacjentów CMT-GDAP1

Badaną grupę pacjentów przeanalizowano pod względem fenotypów tj. objawów klinicznych. W celu porównania objawów klinicznych chorych na CMT-GDAP1 stworzono skalę fenotypową, opartą na wynikach badań elektrofizjologicznych oraz neurologicznych, z uwzględnieniem wieku wystąpienia choroby, a także obecności dodatkowych objawów, co opisano w rozdziale „Materiały i metody”. Poniżej przedstawiono charakterystykę pacjentów CMT-GDAP1 (Tabela 9).

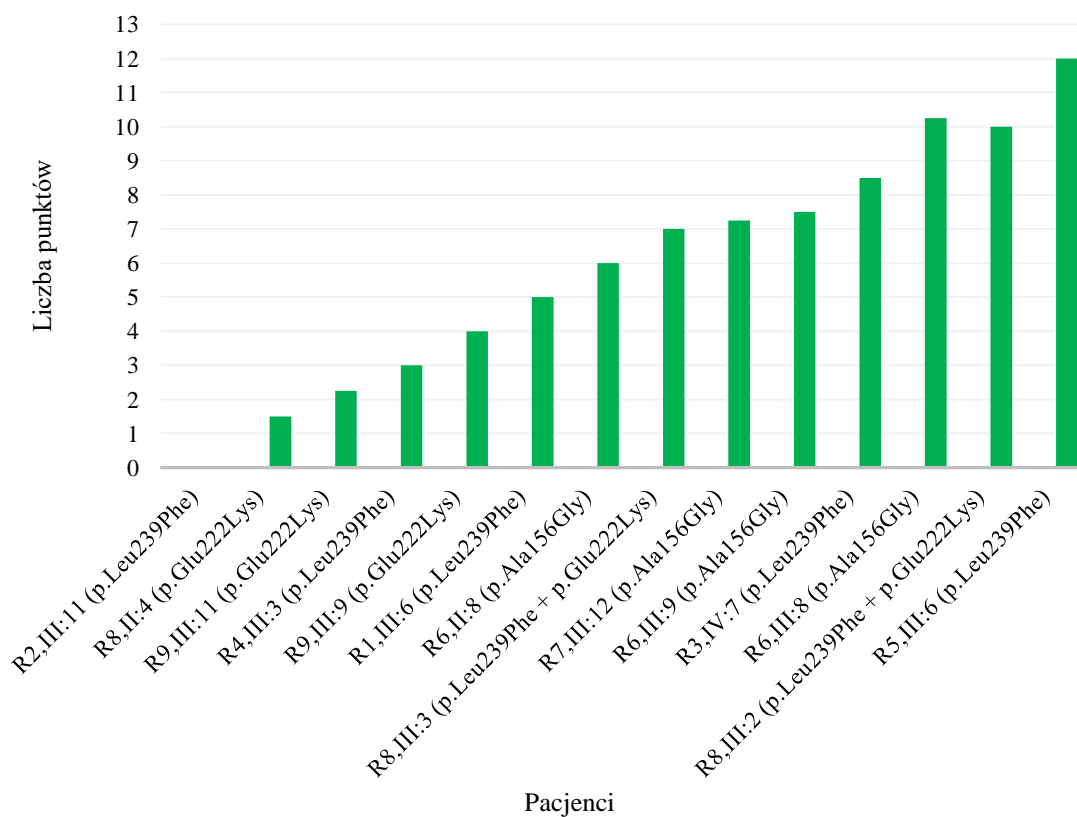


Rodzina	Pacjent	Sposób dziedziczenia	Główna mutacja patogenna	Wiek wystąpienia pierwszych objawów	Objawy dodatkowe	Suma punktów
R1	III:6	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	6 r.ż.	-	5
R2	III:11	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	2 r.ż.	-	b.d.
R3	IV:7	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	8 r.ż.	-skolioza, -wiotkość, -drżenie rąk, -objaw Babińskiego	8,5
R4	III:3	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	6 r.ż.	-	3
R5	III:6	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	18 miesięcy	-stopa końsko- szpotawa, -demielinizacja, -poruszanie się na wózku	12
R6	II:8	AD	c.467C>G, p.Ala156Gly	13 r.ż.	-zaburzenia rytmu serca, -objaw Raynauda	6
R6	III:8	AD	c.467C>G, p.Ala156Gly	9 r.ż.	-arytmia przedsionkowa, -skolioza -rozszczip kręgosłupa, -przykurcz ścięgien Achillesa -upośledzenie umysłowe	10,25
R6	III:9	AD	c.467C>G, p.Ala156Gly	8 r.ż.	-arytmia komorowa, -nadciśnienie -przykurcz ścięgien Achillesa,	7,5

					-demyelinizacja	
R7	III:12	AD	c.467C>G, p.Ala156Gly	18 r.ż.	-drżenie rąk, -chrypka	7,25
R8	II:4	AD	c.664G>A, p.Glu222Lys	Po 50 r.ż.	-	1,5
R8	III:2	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	2 r.ż.	-wydrażenie stopy, -przykurcz ścięgien Achilleasa	10
		AD	c.664G>A, p.Glu222Lys			
R8	III:3	AR	c.715C>T, p.Leu239Phe	2 r.ż.	-osłabienie mięśni dłoni	7
		AD	c.664G>A, p.Glu222Lys			
R9	III:9	AD	c.664G>A, p.Glu222Lys	Po 50 r.ż.	-	4
R9	III:11	AD	c.664G>A, p.Glu222Lys	Po 50 r.ż.	-	2,25

**Tabela 10.** Charakterystyka fenotypów pacjentów z głównymi mutacjami w genie *GDAP1*.

Po zsumowaniu punktacji przypisanej dla poszczególnych danych dotyczących obrazu klinicznego pacjentów uzyskano sumaryczny, liczbowy, szacunkowy opis fenotypów badanych pacjentów cierpiących na chorobę kręgu Charcot-Marie-Tooth (Rycina 7). Pacjenci z najcięższymi fenotypami i/lub z najszerszym spektrum objawów dodatkowych uzyskali najwyższą liczbę punktów. Pacjent z Rodziny 2 (R2,III:11) – brak danych klinicznych.



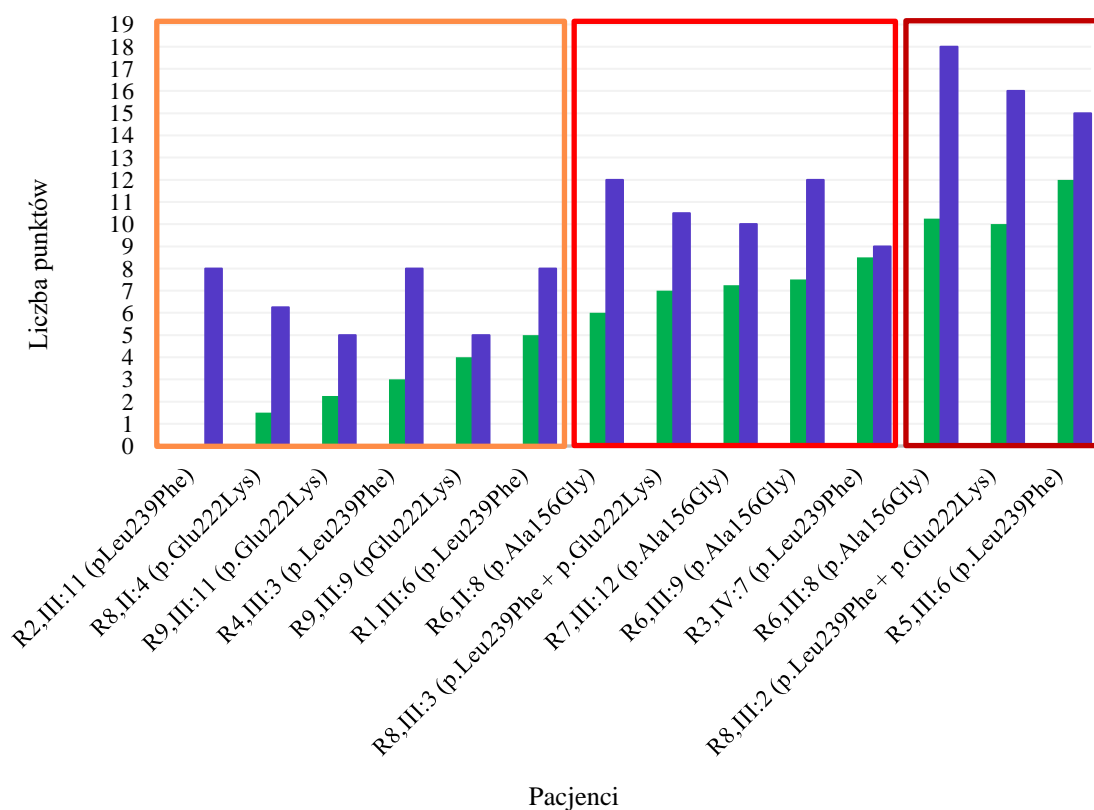
**Rycina 7.** Nasilenie fenotypu choroby oceniane przy użyciu skali fenotypowej pacjentów CMT-GDAP1.

#### 4.1.3 Korelacja genotyp-fenotyp pacjentów CMT-GDAP1

W celu analizy korelacji genotypowo – fenotypowej pacjentów objętych badaniem złożono dwie opracowane skale – genotypową i fenotypową. Wykazano, że pacjenci z najcięższymi fenotypami i/lub z najszerszym spektrum objawów dodatkowych posiadali odpowiednio dodatkowe warianty sekwencji w „genach CMT” (Rycina 8). Wyróżniono trzy grupy pacjentów, o łagodnym, umiarkowanym i ciężkim fenotypie (Rycina 8). Interesująca jest duża zmienność genotypowo-fenotypowa u dwóch rodzin, u których zidentyfikowano główną patogenną mutację c.664G>A, p.Glu222Lys. W Rodzinie 8, u rodzeństwa w podobnym wieku obserwujemy ciężki przebieg kliniczny choroby, na co składa się w dużej mierze wystąpienie drugiej mutacji patogenicznej c.715C>T, p.Leu239Phe dziedziczonej recesywnie, jednak z różnicami w fenotypie pacjentów. W Rodzinie 9 natomiast rodzeństwo charakteryzuje się bardzo podobnym, niezwykle łagodnym fenotypem. Co ciekawe, w Rodzinie 8 choroba CMT-GDAP1 jest dziedziczona w sposób złożony, autosomalnie dominujący współistniejąco

z recesywnym, a w Rodzinie 9 w sposób autosomalny dominujący. Analiza WES wykazała, że najciężej chora pacjentka z Rodziny 8 (R8,III:2) ma najwięcej, aż pięć dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT”. U znacznie łagodniej chorującego jej brata (R8,III:3) zidentyfikowano tylko dwa dodatkowe warianty sekwencji w „genach CMT”. W przypadku Rodziny 9 obciążenie genetyczne jest znacznie mniejsze i zarówno u chorego (R9,III:9), jak i jego siostry (R9,III:11) wykryto takie same, dwa dodatkowe warianty sekwencji w analizowanych genach. Innym przykładem korelacji genotypowo-fenotypowej jest Rodzina 6, w której zidentyfikowano główną mutację patogenną c.467C>G, p.Ala156Gly. U najciężej chorego pacjenta z tej rodziny (R6,III:8) wykryto, aż sześć dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT”. Natomiast u jego brata (R6,III:9) oraz matki (R6, II:8), chorujących łżej, niż pacjent R6,III:8, zidentyfikowano odpowiednio 3 i 4 dodatkowe warianty sekwencji w „genach CMT”.

Porównanie wyników uzyskanych za pomocą skali genotypowej i fenotypowej wskazuje na istnienie tendencji i sugeruje, że „tło genetyczne” wpływa na obraz kliniczny choroby, tj. im pacjenci są „obarczeni” większą liczbą dodatkowych mutacji w „genach CMT”, poza mutacjami w genie *GDAP1*, tym choroba ma cięższy przebieg kliniczny.



**Rycina 8.** Zestawienie wyników uzyskanych za pomocą skali genotypowej i fenotypowej obrazujących wpływ wariantów sekwencji w „genach CMT” (zaznaczone na niebiesko) na obraz kliniczny u badanych pacjentów (zaznaczone na zielono) z zaznaczeniem grupy pacjentów o łagodnym (pomarańczowa ramka), umiarkowanym (czerwona ramka) i ciężkim (bordowa ramka) fenotypie.

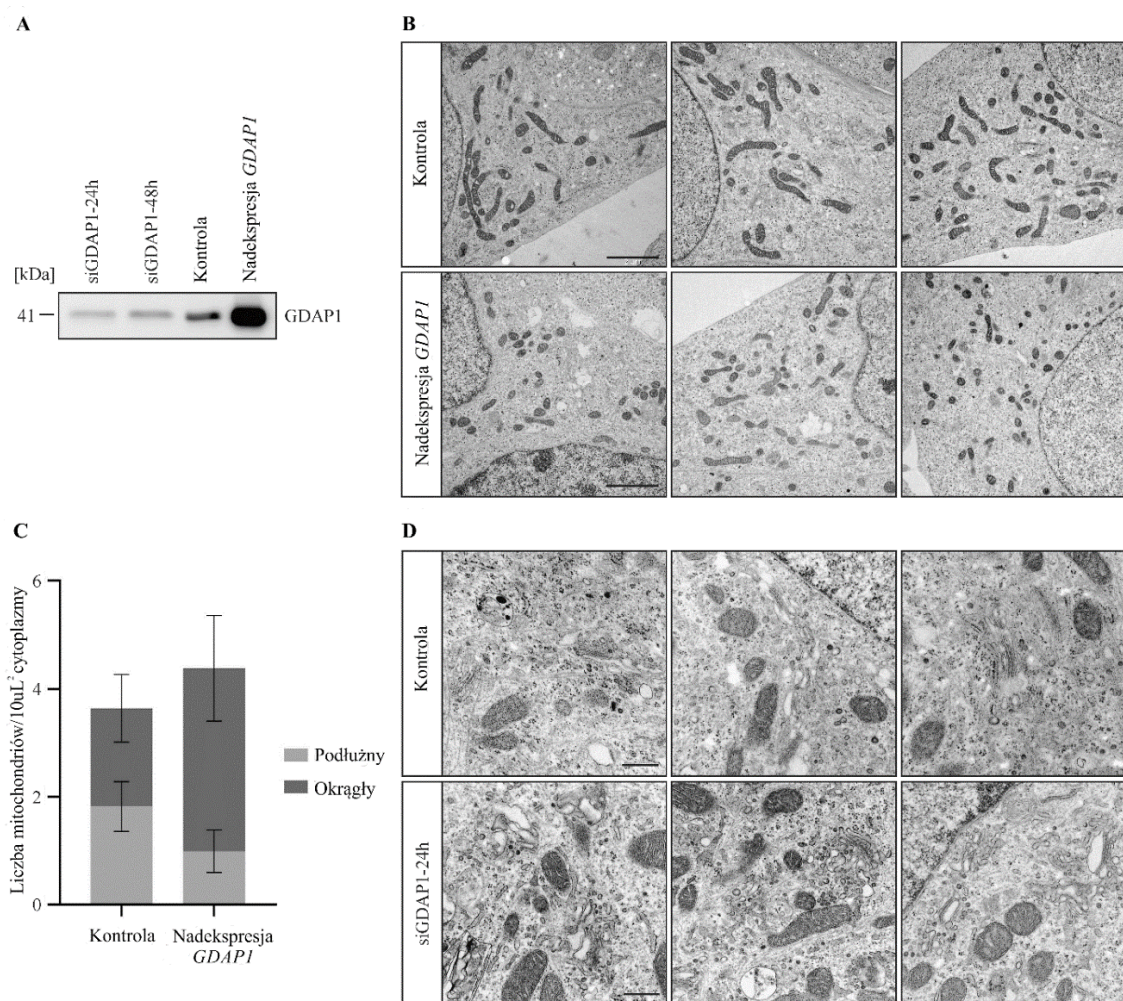
## 4.2 Wpływ wybranych mutacji genu *GDAP1* na komórki linii SH-SY5Y oraz HeLa

### 4.2.1 Wpływ poziomu białka *GDAP1* na morfologię mitochondriów oraz aparatu Golgiego w komórkach SH-SY5Y

Funkcja molekularna białka *GDAP1* nie jest znana. W celu identyfikacji procesów komórkowych zakłóconych przez mutacje genu *GDAP1* użyto modeli *in vitro* choroby CMT-*GDAP1* opartego na liniach komórkowych SH-SY5Y (pochodzącej z ludzkiego nerwiaka zarodkowego) oraz HeLa (pochodzącej z raka nabłonka szyjki macicy). Wymienione linie komórkowe transfekowano wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego oraz z poszczególnymi mutacjami genu *GDAP1*: c.456delC, p.Pro153Argfs\*19; c.980G>A, p.Gly327Asp; c.652C>G, p.Gln218Glu; c.664G>A, p.Glu222Lys; c.715C>T, p.Leu239Phe; c.368A>G, p.His123Arg; c.467C>G, p.Ala156Gly. W dalszej części

pracy, w celu uproszczenia zapisu, do opisu mutacji zastosowano nazewnictwo oparte na zapisie białkowym.

W celu zmniejszenia ekspresji *GDAP1* wyciszono jego ekspresję za pomocą siRNA w komórkach linii SH-SY5Y. Sprawdzono efektywność wyciszenia metodą Western-blot. Analiza wykazała, że 24 godziny po transfekcji siRNA poziom białka *GDAP1* był znacznie obniżony w porównaniu z kontrolą. Obniżenie poziomu *GDAP1* nadal można było obserwować, chociaż niższe 48 godzin po transfekcji. Można też zauważyć, że nadekspresja *GDAP1* była bardzo skuteczna tzn., uzyskano bardzo wysoki poziom białka *GDAP1* (Rycina 9A).



**Rycina 9.** Wpływ poziomu białka *GDAP1* na morfologię mitochondriów i aparatu Golgiego w komórkach SH-SY5Y. (A) Poziom białka *GDAP1* po 24 i 48 godzinach od obniżenia ekspresji genu *GDAP1* za pomocą siRNA oraz po nadprodukcji *GDAP1* w komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych z użyciem przeciwciała anti-*GDAP1*. (B) Morfologia mitochondriów w komórkach z nadekspresją *GDAP1* w komórkach SH-SY5Y. Skala 2µm. (C) Ilościowe określenie wyników z panelu B. (D) Morfologia aparatu Golgiego po obniżeniu ekspresji genu *GDAP1* w komórkach SH-SY5Y. Skala 500nm. Zmodyfikowano, Binięda i wsp., 2021 [75].

Za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) zbadano wpływ zmian poziomu białka GDAP1 na strukturę organelli komórkowych. W związku z tym że wcześniej wykazano, że GDAP1 bierze udział w utrzymaniu morfologii mitochondriów [28] analizowano przede wszystkim ultrastrukturę mitochondriów. Jednakże zaobserwowano również zmiany w ultrastrukturze aparatu Golgiego. Początkowo, obserwowano ogólny wygląd tych organelli w komórce ze zmienionymi poziomami GDAP1. Rycina 9B pokazuje, że nadekspresja *GDAP1* wpływa na rozmiar i kształt mitochondriów. W komórkach z nadekspresją *GDAP1*, mitochondria w przeważającej ilości były mniejsze i bardziej okrągłe w porównaniu z mitochondriami komórek kontrolnych. Nie zaobserwowano wpływu obniżenia ekspresji genu *GDAP1* na ultrastrukturę mitochondriów (Rycina 9B).

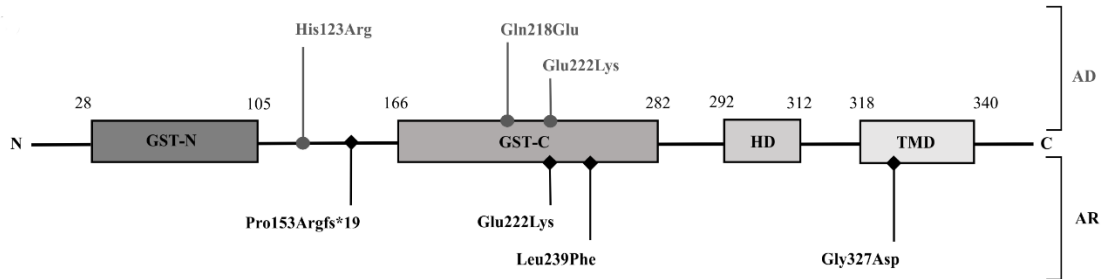
Analiza obrazów wykonanych za pomocą TEM wykazała, że nawet częściowe obniżenie ekspresji *GDAP1* spowodowało zmiany w ultrastrukturze aparatu Golgiego. Cysterny aparatu Golgiego miały bardziej nieregularny kształt, a zakończenia stosów cystern aparatu Golgiego wykazywały większą gęstość (Rycina 9D).

Analiza TEM linii komórkowej SH-SY5Y zasugerowała, że białko GDAP1 może wpływać na strukturę i funkcję aparatu Golgiego.

#### **4.2.2 Wpływ wybranych wariantów genu *GDAP1* na poziom białka GDAP1 w komórkach HeLa**

W związku z tym, że wyniki poprzedniego eksperymentu wskazywały na zaangażowanie GDAP1 w utrzymanie struktury aparatu Golgiego, wysunięto hipotezę, że patogenne skutki mutacji genu *GDAP1* mogą przynajmniej częściowo, wynikać z funkcjonowania tej organelli. W celu sprawdzenia wysuniętej hipotezy zbadano wpływ poszczególnych wariantów sekwencji genu *GDAP1* na morfologię aparatu Golgiego. Linia komórkowa SH-SY5Y charakteryzuje się wysoką ekspresją endogennego genu *GDAP1*, co spowodowało, że niemożliwe były do zaobserwowania skutki recesywnych wariantów sekwencji genu *GDAP1*. Biorąc to pod uwagę, do dalszych eksperymentów wykorzystano linię komórkową HeLa, która była już wcześniej używana w badaniach nad genem *GDAP1* [48,72,73]. Przeanalizowano wpływ sześciu mutacji genu *GDAP1* (p.Gly327Asp, p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu,

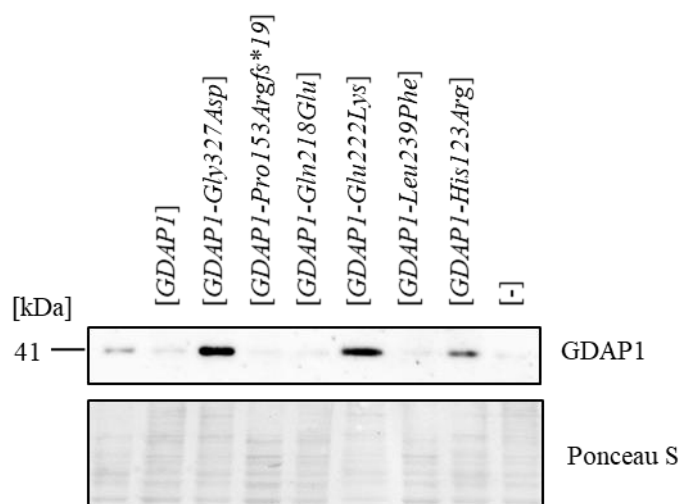
p.Glu222Lys, p.Leu239Phe, p.His123Arg) (Rycina 10), wyselekcjonowanych w oparciu o kryteria opisane w rozdziale „Materiały i Metody”.



**Rycina 10.** Schemat przedstawiający układ domen białka GDAP1 z zaznaczeniem wariantów GDAP1 i uwzględnieniem sposobu dziedziczenia wariantów sekwencji genu *GDAP1*: autosomalnie dominującego (AD) – górna część schematu oraz autosomalnie recesywnego (AR) – dolna część schematu. Zmodyfikowano, Binięda i wsp., 2021 [75].

W celu sprawdzenia wpływu ekspresji wybranych alleli genu *GDAP1* w komórkach HeLa, przeanalizowano poziomy zmutowanych białek GDAP1. Zaobserwowano, że transfekcja samym wektorem ([-]), bądź wektorem zawierającym cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego ([*GDAP1*]) lub z mutacjami (p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu, p.Leu239Phe) spowodowała wyraźne obniżenie poziomu GDAP1 (Rycina 11). Natomiast, po transfekcji komórek cDNA *GDAP1* p.Gly327Asp, p.Glu222Lys oraz p.His123Arg poziom białka GDAP1 wzrósł (Rycina 11).





**Rycina 11.** Wpływ ekspresji różnych alleli genu *GDAP1* w komórkach HeLa na poziom białka GDAP1. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych z nietransfekowanych komórek HeLa (ścieżka pierwsza od lewej), transfekowanych pustym wektorem ([-]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-GDAP1. Poniżej przedstawiono membranę wybarwioną Ponceau S, z uwidocznionymi białkami w poszczególnych ścieżkach (potwierdzającą równo ilości białek w ścieżkach). Zmodyfikowano, Binięda i wsp., 2021 [75].

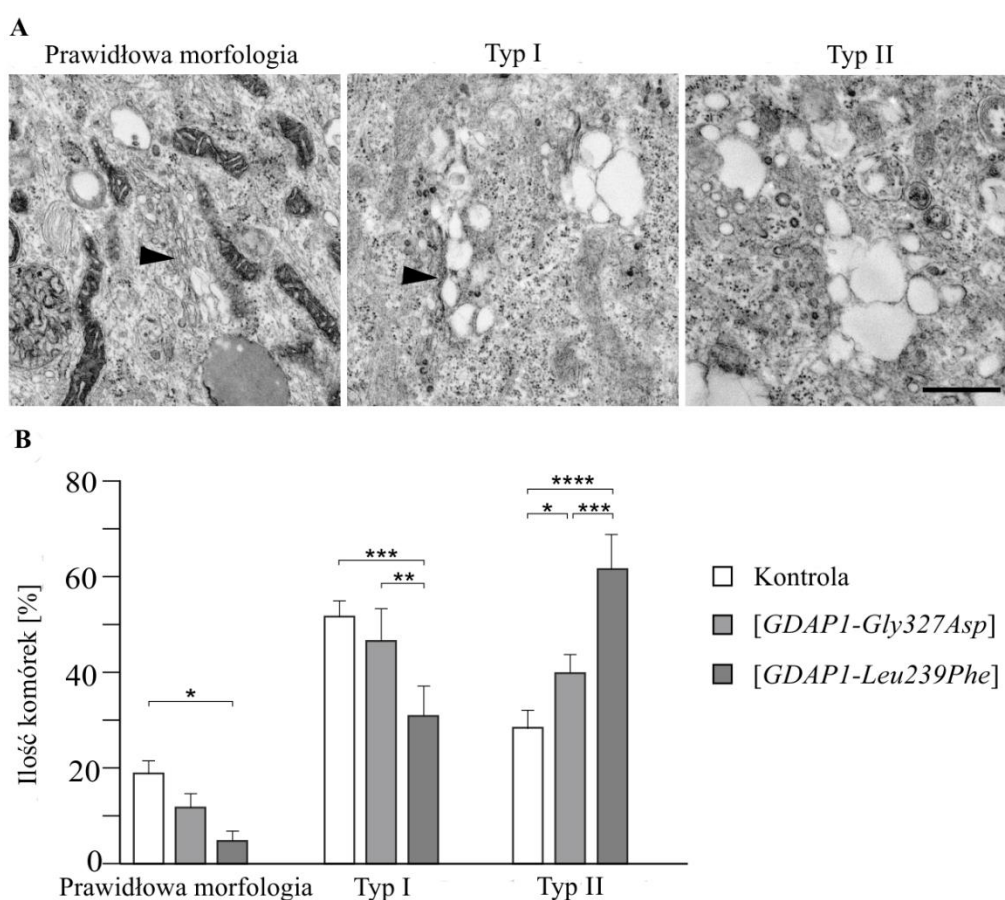
Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, stwierdzono, że warianty sekwencji genu *GDAP1* można podzielić na dwie grupy:

1. Obejmująca warianty sekwencji skutkujące tym samym efektem, który jest obserwowany w przypadku wprowadzenia na wektorze cDNA *GDAP1* typu dzikiego (obniżenie ekspresji *GDAP1*).
2. Obejmująca warianty, których wprowadzenie na wektorze cDNA *GDAP1* skutkuje podwyższeniem poziomu białka GDAP1.

#### 4.2.3 Wpływ obniżenia poziomu białka GDAP1 na morfologię aparatu Golgiego w komórkach HeLa

Wykazano, że wprowadzenie cDNA *GDAP1* typu dzikiego oraz z niektórymi mutacjami (p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu, p.Leu239Phe) genu *GDAP1* w komórkach HeLa prowadzi do obniżenia poziomu białka GDAP1. W związku z tym sprawdzono, czy podobnie jak w przypadku komórek pochodzących z nerwiaka zarodkowego SH-SY5Y, obniżony poziom białka GDAP1 w linii komórkowej HeLa spowoduje zmiany w morfologii aparatu Golgiego.

Analiza TEM wykazała, że w zaledwie około 20% komórek kontrolnych HeLa, aparat Golgiego miał prawidłową morfologię, a w około 50% tych komórek zaobserwowano zmienioną morfologię aparatu Golgiego (Rycina 12A), który przybierał formę cystern i pęcherzyków (typ I). Zaobserwowano również komórki, w których aparat Golgiego był widoczny wyłącznie w formie pęcherzyków (typ II). W komórkach transfekowanych wektorem z cDNA *GDAP1* z mutacją p.Leu239Phe, w których poziom białka *GDAP1* uległ obniżeniu, liczba komórek z widocznymi cysternami (niezmieniony i zmieniony typ I) zmniejszyła się, podczas gdy liczba komórek, w których aparat Golgiego przybrał postać pęcherzyków (typ II), wzrosła (Rycina 12A i B).

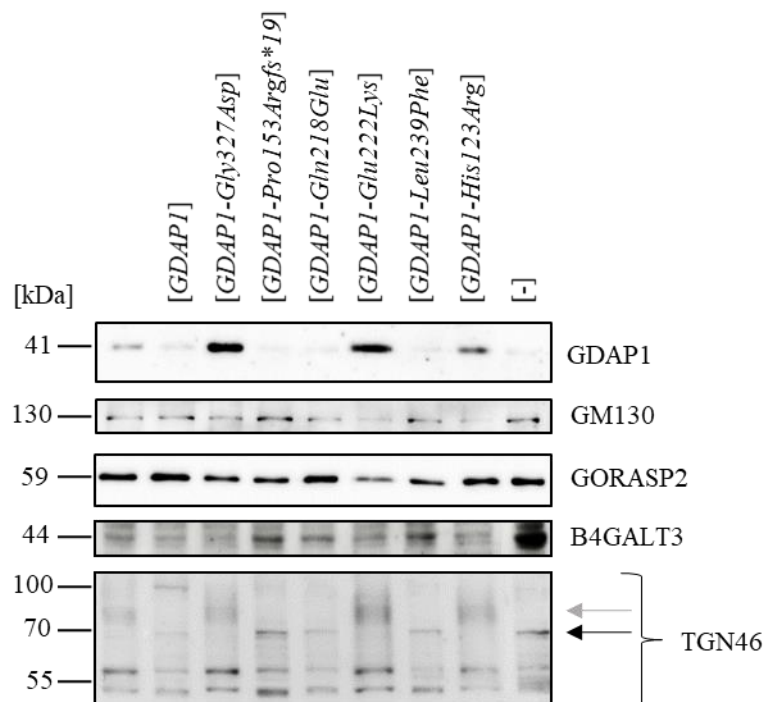


**Rycina 12.** Wpływ zmutowanych alleli genu *GDAP1* na morfologię aparatu Golgiego w komórkach HeLa. (A) Morfologia aparatu Golgiego uwidoczniona za pomocą TEM w nietransfekowanych komórkach HeLa (Kontrola) oraz komórkach HeLa transfekowanych wektorem zawierającym mutacje p.Gly327Glu oraz p.Leu239Phe. Przykłady struktur aparatu Golgiego zaobserwowanych w komórkach HeLa. Groty strzałek wskazują cysterny aparatu Golgiego. Skala 750 nm. (B) Ilość komórek, (jako procent zliczonych komórek) ze wskazanymi typami ultrastruktury aparatu Golgiego. Przeprowadzono analizę statystyczną danych z trzech niezależnych eksperymentów z zastosowaniem jednokierunkowej analizy ANOVA i korektą Bonferroniego: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Zmodyfikowano, Binięda i wsp., 2021 [75].

Komórki transfekowane wektorem z cDNA *GDAP1* p.Glu327Asp, w których obserwowany był podwyższony poziom GDAP1, również wykazywały zmienioną morfologię aparatu Golgiego. Zmiany te były niewielkie w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w komórkach z mutacją p.Leu239Phe. Transfekcja komórek wektorem z mutacją p.Glu327Asp spowodowała niewielki wzrost liczby komórek, w których aparat Golgiego przybrał postać pęcherzyków (Rycina 12).

#### **4.2.4 Wpływ obniżenia poziomu białka GDAP1 na zmiany w postranslacyjnych modyfikacjach białka TGN46**

W związku z wpływem obniżenia poziomu białka GDAP1 na morfologię aparatu Golgiego w komórkach HeLa, sprawdzono czy zmiany struktury aparatu Golgiego wyrażają się również, jako zmiany w poziomach lub modyfikacjach białek aparatu Golgiego. Początkowo, przeanalizowano poziomy białek charakterystycznych dla subkompartamentów *cis*, *medial* i *trans* aparatu Golgiego. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w poziomie markera subkompartamentu *cis* aparatu Golgiego – GM130 (ang., *Golgi Matrix Protein*, 130 kDa). Ze względu na problemy, z jakością przeciwciał anty-GORASP2 oraz anty-B4GALT3 nie było możliwe wykonanie odpowiedniej ilości powtórzeń do wykonania analiz statystycznych. Jednak wstępne obserwacje zasugerowały, że w przypadku białek GORASP2 oraz B4GALT3 również nie występują różnice w ich poziomie. Analiza Western-blot wykazała zmiany we wzorze prążków rozdziału elektroforetycznego białka części *trans* aparatu Golgiego – TGN46 (Rycina 13), co może świadczyć o zmienionym wzorze modyfikacji białka TGN46.



**Rycina 13.** Poziom białka GDAP1 koreluje ze zmianami we wzorze modyfikacji białka TGN46. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych z nietransfekowanych komórek HeLa (ścieżka pierwsza od lewej), transfekowanych pustym wektorem ([-]) oraz wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciał anti-GDAP1, anti-GM130, anti-GORASP2, anti-B4GALT3 oraz anti-TGN46. Analiza Western-blot z użyciem przeciwciała anti-GM130 stanowi kontrolę ilości analizowanych białek w poszczególnych ścieżkach. Czarna strzałka wskazuje niedojrzałe białko TGN46, szara strzałka wskazuje dojrzałą, zmodyfikowaną formę białka TGN46. Zmodyfikowano, Binięda i wsp., 2021 [75].

TGN46 (ang. *Trans Golgi network protein*, 46 kDa) jest integralnym białkiem błonowym sieci *trans* aparatu Golgiego, które krąży między TGN, a błoną plazmatyczną, powracając przez endosomy. TGN46 jest silnie glikozylowanym białkiem, które ma kilka form rozdzielających się podczas elektroforezy i w analizie Western-blot uwidacznia się w postaci kilku prążków. Formy o masie >110 kDa reprezentują dojrzałe sialowane białko TGN46 [76].

Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych wykazała, że wprowadzenie na wektorze cDNA *GDAP1* typu dzikiego oraz z niektórymi mutacjami genu *GDAP1* (p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu, p.Leu239Phe) spowodowało obniżenie poziomu białka GDAP1. Korelowało to ze zmianą wzorca postranslacyjnej modyfikacji białka TGN46. W komórkach transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego oraz z mutacjami p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu i p.Leu239Phe,

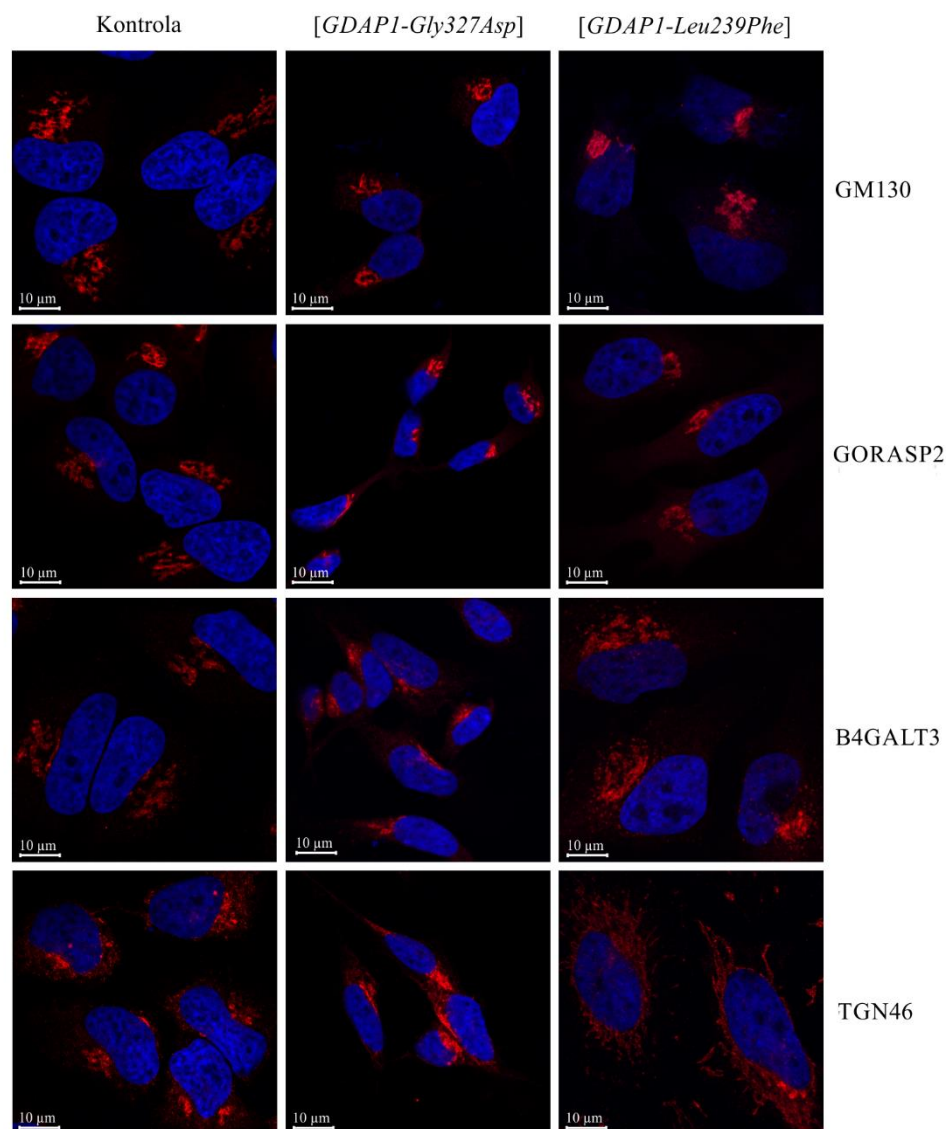
białko TGN46 uwidoczniło się w formie 70 kDa, a formy o masie >110 kDa nie zaobserwowano (Rycina 13).

Powyższe obserwacje sugerują, że zmniejszenie poziomu białka GDAP1 wpływa na niektóre procesy zachodzące w aparacie Golgiego, co potwierdzają zmiany dotyczące dojrzewania białka TGN46 lub że GDAP1 wywiera wpływ wybiórczo na modyfikację białka TGN46.

#### **4.2.5 Wpływ mutacji *GDAP1* p.Leu239Phe na lokalizację białka TGN46 w komórkach HeLa**

Postranslacyjna modyfikacja białek reguluje ich aktywność, stabilność oraz lokalizację. Jak opisano w poprzednim podrozdziale, komórki HeLa o obniżonym poziomie białka GDAP1 wykazywały zmiany w dojrzewaniu białka TGN46. W związku z tym sprawdzono, czy te zmiany wpływają również na lokalizację białka TGN46 w komórkach HeLa transfekowanych wektorem z dwoma wybranymi mutacjami p.Leu239Phe i p.Gly327Asp genu *GDAP1*, różnie wpływającymi na poziom białka GDAP1 (skutkujący obniżonym lub podwyższonym poziomem białka GDAP1).

W celu wizualizacji morfologii aparatu Golgiego poddano immunobarwieniu białka GM130 (*cis*), GORASP2 (*medial*), B4GALT3 oraz TGN46 (TGN). Następnie, lokalizację komórkową tych białek obserwowano metodą mikroskopii konfokalnej. W komórkach kontrolnych HeLa wszystkie obserwowane białka: GM130, GORASP2, B4GALT3 oraz TGN46 były w strukturach w pobliżu jednego bieguna jądra komórkowego. Podobną lokalizację tych białek obserwowano w komórkach transfekowanych wektorem z cDNA *GDAP1* z mutacją p.Gly327Asp. W przeciwieństwie do tego, w komórkach transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* z mutacją p.Leu239Phe, lokalizacja białka TGN46 była zmieniona. Białko to obserwowano w strukturach rozciągających się od jądra komórki w kierunku peryferycznym komórki (Rycina 14).



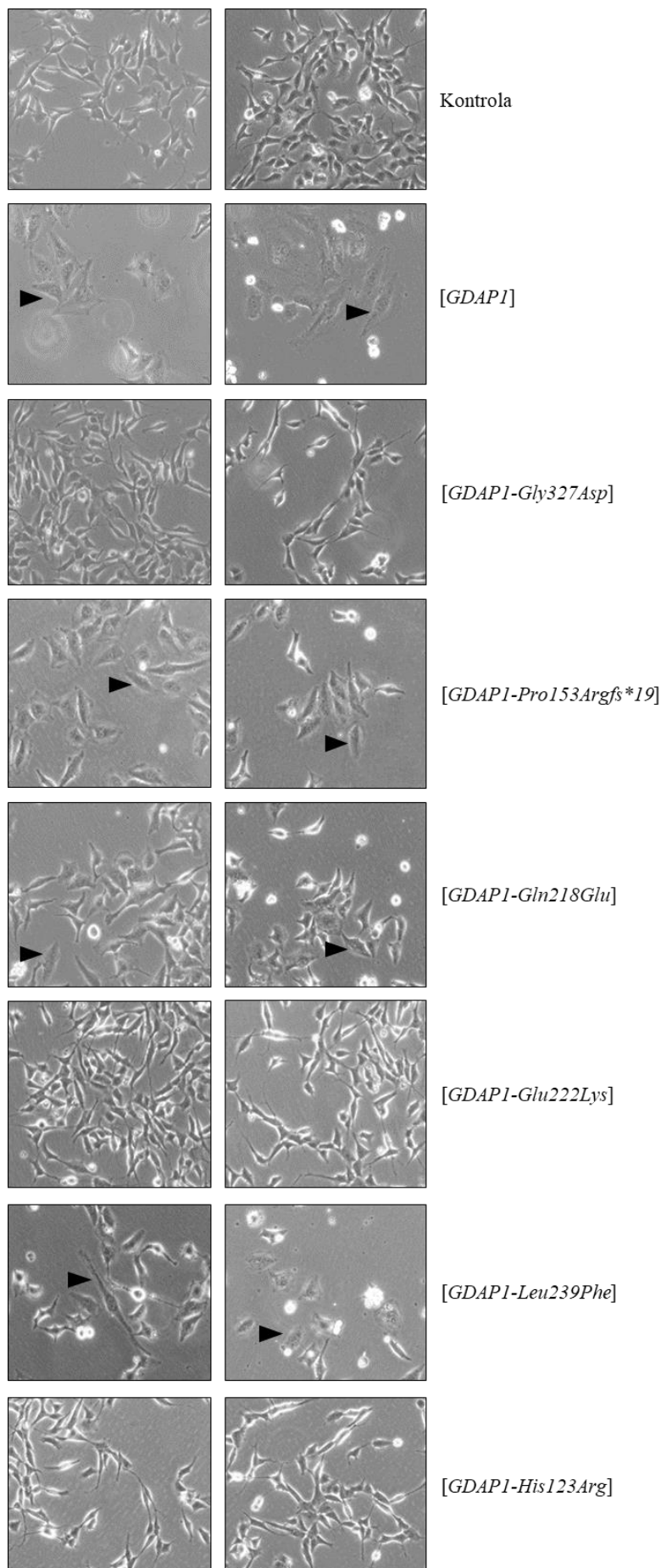
**Rycina 14.** Lokalizacja białka TGN46 jest zmieniona w komórkach HeLa z mutacją *GDAP1* p.Leu239Phe. Na obrazach z mikroskopu konfokalnego widoczna jest lokalizacja białek GM130, GORASP2, B4GALT3 oraz TGN46 w kontrolnych komórkach HeLa oraz komórkach HeLa z mutacjami p.Gly327Asp, a także p.Leu239Phe. Wszystkie białka uwidoczniono metodą immunofluorescencji pośredniej. DNA jądrowe wybarwiono DAPI. Sygnał czerwony wskazuje poszczególne białka, sygnał niebieski wskazuje jądra komórek. Zmodyfikowano, Binięda i wsp., 2021 [75].

Nieprawidłowa lokalizacja białka TGN46 może być konsekwencją zmienionej modyfikacji postranslacyjnej białka TGN46 bądź odwrotnie, zmieniona lokalizacja białka TGN46 może być przyczyną zmian w jego postranslacyjnej modyfikacji.

#### 4.2.6 Wpływ wybranych mutacji genu *GDAP1* na kształt komórek HeLa

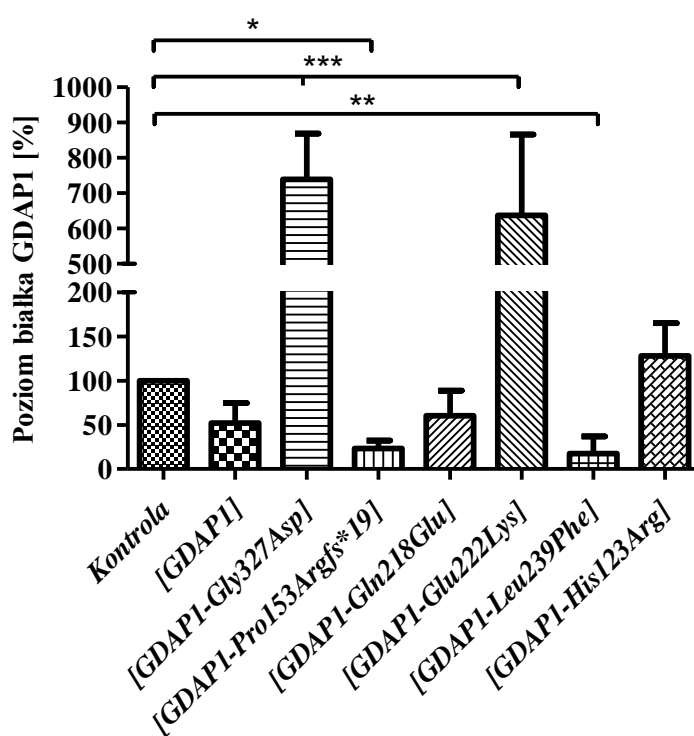
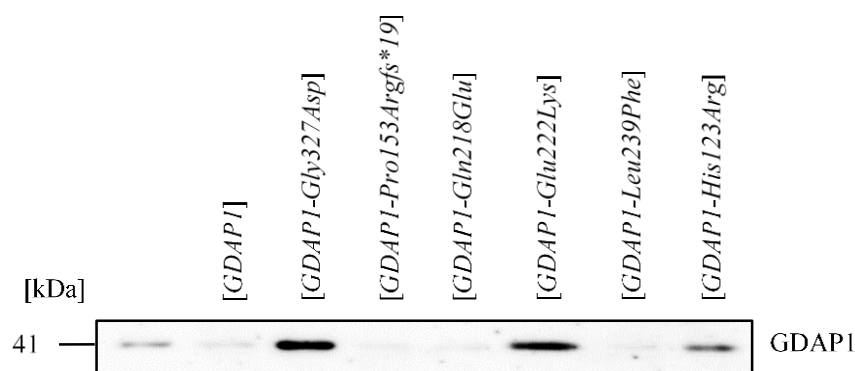
W związku z tym, że w poprzednich eksperymentach wykazano, że niektóre z mutacji genu *GDAP1* zmieniają modyfikacje potranslacyjne białka TGN46 oraz jego lokalizację w komórce, postanowiono sprawdzić, jak jeszcze mutacje genu *GDAP1* wpływają na komórki HeLa. Podczas prowadzenia standardowej hodowli komórkowej, zaobserwowano, że wprowadzenie do komórek wektora z cDNA *GDAP1* z niektórymi mutacjami, skutkowało zmianą ich kształtu. Komórki transfekowane wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego oraz z mutacjami p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu, a także p.Leu239Phe były pogrubiałe w porównaniu z komórkami kontrolnymi (nietransfekowanymi) oraz komórkami transfekowanymi wektorem z cDNA *GDAP1* z mutacjami p.Gly327Asp, p.Glu222Lys, a także p.His123Arg (Rycina 15).

Zaobserwowano związek pomiędzy zmianą kształtu komórek, a poziomem białka GDAP1 w transfekowanych komórkach HeLa. W komórkach HeLa z dodatkową kopią genu *GDAP1* oraz transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* zawierającym mutacje: p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu oraz p.Leu239Phe (zmieniony kształt komórek), poziom białka GDAP1 był obniżony w stosunku do komórek nietransfekowanych (kontrola) (Rycina 16). W przeciwieństwie do tego, komórki transfekowane wektorem z cDNA genu *GDAP1* zawierającym mutacje p.Gly327Asp, p.Glu222Lys oraz p.His123Arg, charakteryzujące się prawidłowym kształtem komórek, miały podwyższony poziom białka GDAP1 w stosunku do poziomu w komórkach kontrolnych (Rycina 16).



**Rycina 15.** Zmiana kształtu komórek HeLa transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego (nadekspresja *GDAP1*) oraz z mutacjami p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu, a także p.Leu239Phe. Groty strzałek wskazują komórki o zmienionym kształcie (pogrubiałe). Komórki uwidoczniono w kontraście fazowym, obiektyw 40 x





**Rycina 16.** Poziom białka GDAP1 w transfekowanych komórkach HeLa. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych z nietransfekowanych komórek HeLa (Kontrola) oraz transfekowanych wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-GDAP1. Stosunek poziomu GDAP1 obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka GDAP1 w nietransfekowanych komórkach HeLa (Kontrola) oraz transfekowanych wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu kontroli i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń +/- odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

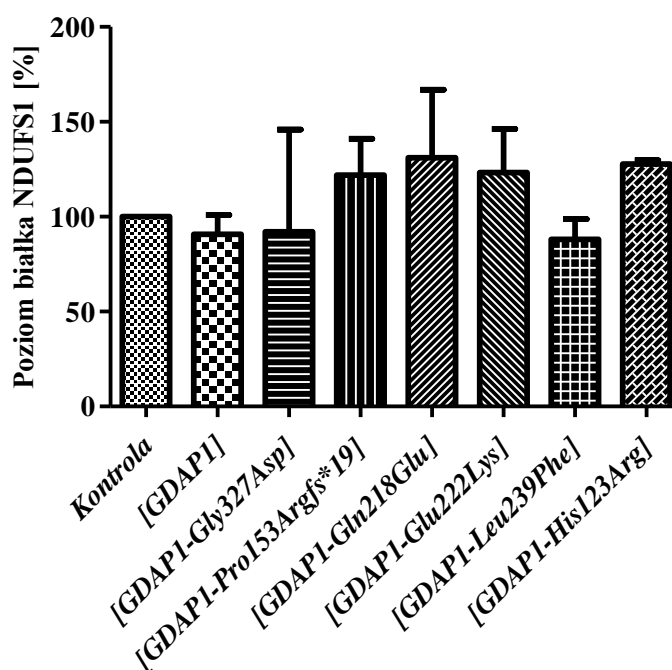
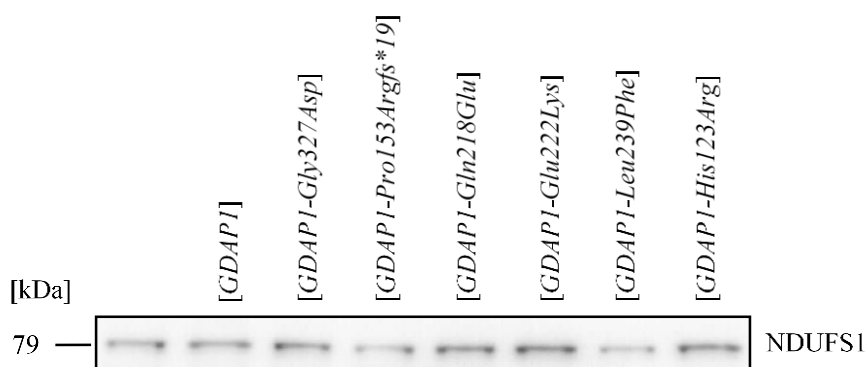
#### 4.2.7 Wpływ wybranych mutacji genu *GDAP1* na poziom wybranych białek mitochondrialnych w komórkach HeLa

Poprzednie eksperymenty wykazały, że w przypadku niektórych mutacji genu *GDAP1* dochodzi do zmiany kształtu komórek. Co więcej, w komórkach linii SH-SY5Y z nadekspresją genu *GDAP1*, mitochondria były mniejsze oraz bardziej okrągłe w porównaniu z mitochondriami komórek kontrolnych (podrozdział 4.2.1; Rycina 9). Obserwacja ta jest zgodna z dostępnymi danymi literaturowymi [28,77], w których pokazano, zmianę morfologii mitochondriów w kierunku ich coraz większej fragmentacji wraz z upływem czasu od transfekcji *GDAP1*. Zaobserwowano też wpływ mutacji punktowych *GDAP1* na zdolność do indukcji fragmentacji mitochondriów. W pracy Niemann i współautorów (2005) stwierdzono również, że pofragmentowaniu mitochondriów w komórkach COS-7 na skutek ekspresji dodatkowej kopii *GDAP1* nie towarzyszy utrata potencjału błony mitochondrialnej, ani wpływ cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy. We wspomnianej pracy autorzy nie testowali wpływu mutacji genu *GDAP1* na funkcjonowanie mitochondriów, a tylko na ich morfologię. Jednakże nie wyklucza to, że w przypadku nieprawidłowo funkcjonującego białka *GDAP1*, na skutek transfekcji komórek zmutowanym cDNA genu *GDAP1*, może dochodzić do zmian w funkcjonowaniu mitochondriów, a w konsekwencji do zaindukowania procesu apoptozy w komórkach. W związku z tym postanowiono zbadać poziom białek *NDUFS1* (ang., *NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S1*), *VDAC1* (ang., *Voltage-dependent anion-selective channel 1*) oraz *Bcl2* (ang., *B-cell CLL/lymphoma 2*) w transfekowanych komórkach HeLa.

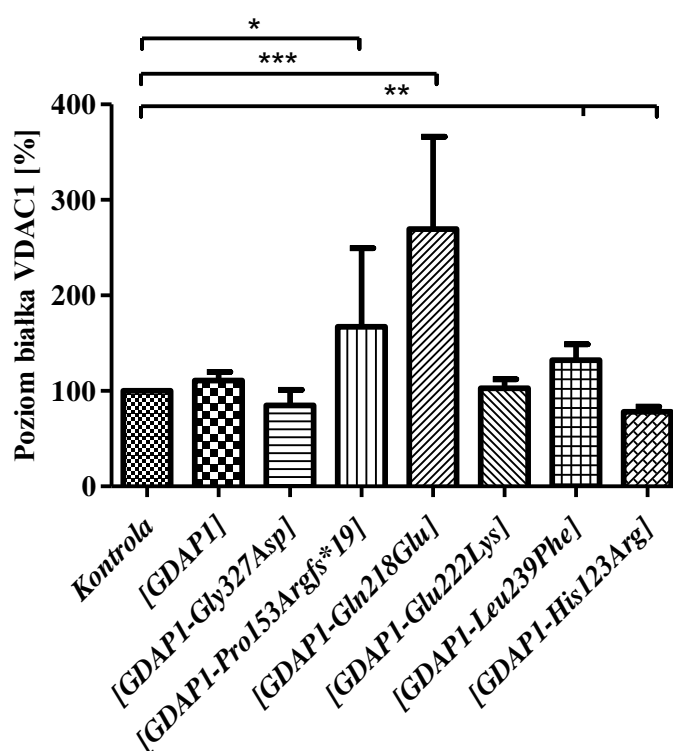
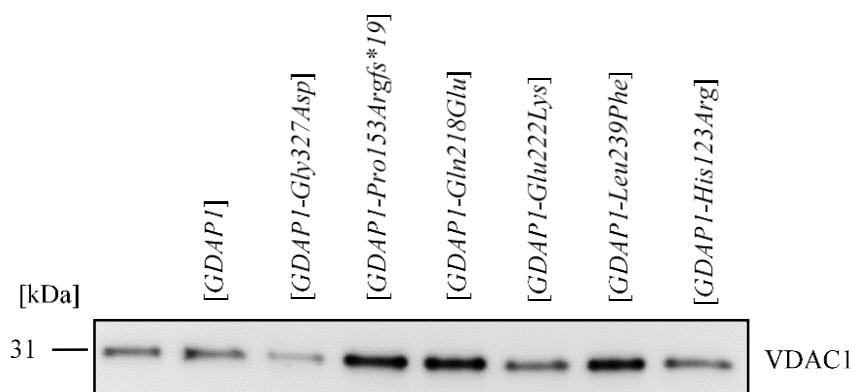
*NDUFS1* jest białkiem wewnętrznej błony mitochondrialnej i należy do rodziny białek *NDUFS* będących podjednostkami kompleksu I dehydrogenazy *NADH*. *NDUFS1* jest największym białkiem tego kompleksu (75 kDa) i ma aktywność dehydrogenazy *NADH* oraz aktywność oksydoreduktazy. Białko to przenosi elektrony z *NADH* do łańcucha oddechowego, przez co jest zaangażowane w oddychanie mitochondrialne. *NDUFS1* zostało opisane, jako substrat kaspaz podczas apoptozy [78]. W związku z tym jego obniżony poziom mógłby świadczyć o zaindukowaniu procesu apoptozy. Białko *VDAC1* tworzy kanał jonowy bramkowany napięciem zlokalizowany w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. *VDAC1* reguluje potencjał błonowy mitochondriów oraz kontroluje wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ang., *Reactive Oxygen Species*,

ROS), a także uwalnianie cytochromu c, przez co jest zaangażowany w regulację apoptozy [79]. Natomiast białko Bcl2 (ang., *B-cell CLL/lymphoma 2*) jest białkiem zlokalizowanym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej i siateczce śródplazmatycznej. Jest to białko antyapoptotyczne, tzn., hamuje apoptozę przez zapobieganie tworzeniu się porów w błonie mitochondrialnej, a co za tym idzie, zapobiega uwalnianiu się cytochromu c oraz czynnika indukującego apoptozę (ang., *Apoptosis Inducing Factor*, AIF) z mitochondriów. Spadek poziomu białka Bcl2 w stosunku do poziomu białek proapoptotycznych świadczyć może o zapoczątkowanym procesie apoptozy [80].

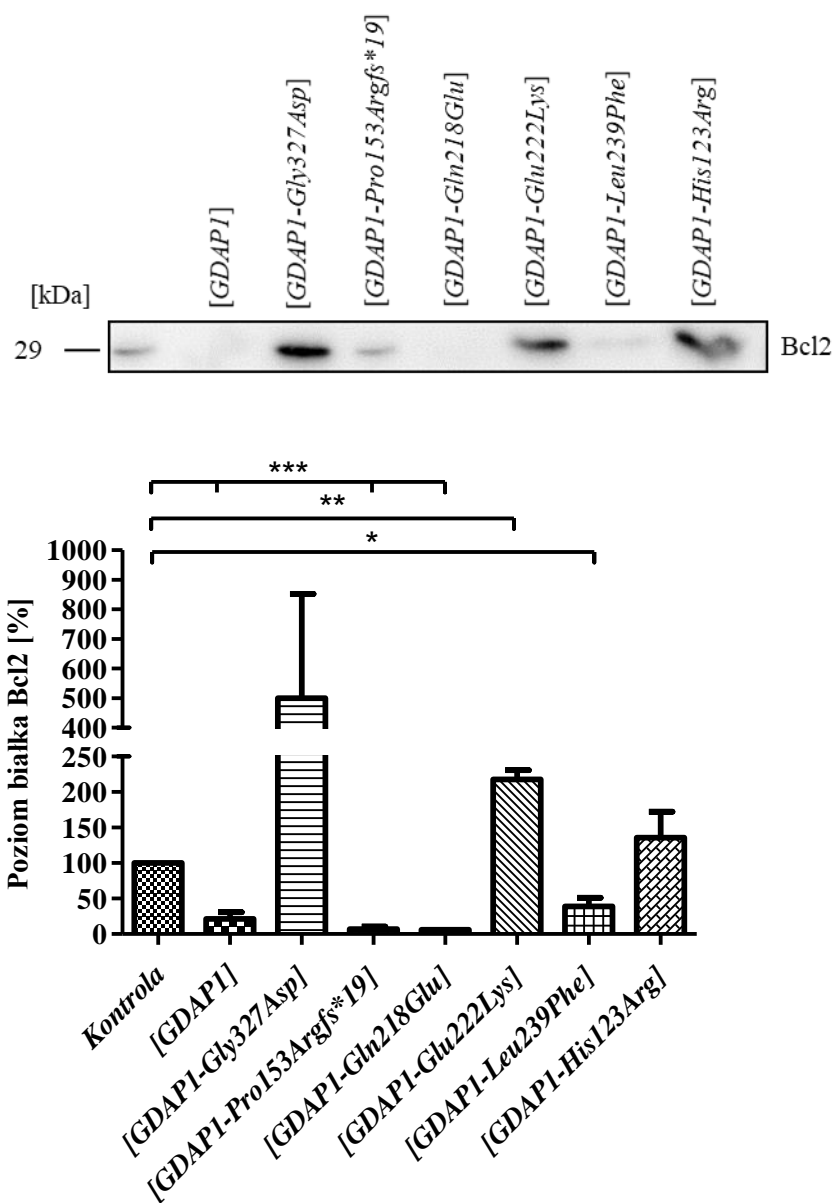
Poziom wspomnianych białek w ekstraktach z komórek HeLa z dodatkowymi kopiami genu *GDAP1* oszacowano na podstawie analizy Western-blot. Analiza ta wykazała, że poziom białka NDUFS1 nie zmienił się istotnie statystycznie w przypadku komórek z ekspresją poszczególnych wariantów genu *GDAP1* w porównaniu do poziomu białka NDUFS1 w komórkach kontrolnych linii komórkowej HeLa (Rycina 17). Natomiast poziom białka VDAC1 uległ podwyższeniu w przypadku komórek transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* z mutacjami p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu, p.Leu239Phe w porównaniu z jego poziomem w komórkach kontrolnych oraz transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego oraz z mutacjami p.Gly327Asp, p.Glu222Lys i p.His123Arg (Rycina 18). Badania wykazały również, znaczne obniżenie poziomu białka Bcl2 w komórkach transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego oraz z mutacjami p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu i p.Leu239Phe w porównaniu do jego poziomu w komórkach kontrolnych oraz transfekowanych wektorem niosącym mutacje: p.Gly327Asp, p.Glu222Lys i p.His123Arg. W komórkach tych poziom białka Bcl2 wzrósł (Rycina 19).



**Rycina 17.** Poziom białka NDUFS1 w transfekowanych komórkach HeLa. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych z nietransfekowanych komórek HeLa (Kontrola) oraz transfekowanych wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-NDUFS1. Stosunek poziomu NDUFS1 obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka NDUFS1 w nietransfekowanych komórkach HeLa (Kontrola) oraz transfekowanych wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do kontroli i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń +/- odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Rycina 18.** Poziom białka VDAC1 w transfekowanych komórkach HeLa. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych z nietransfekowanych komórek HeLa (Kontrola) oraz transfekowanych wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-VDAC1. Stosunek poziomu VDAC1 obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka VDAC1 w nietransfekowanych komórkach HeLa (Kontrola) oraz transfekowanych wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu kontroli i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń +/- odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Rycina 19.** Poziom białka Bcl2 w transfekowanych komórkach HeLa. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych z nietransfekowanych komórek HeLa (Kontrola) oraz transfekowanych wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-Bcl2. Stosunek poziomu Bcl2 obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka Bcl2 w nietransfekowanych komórkach HeLa (Kontrola) oraz transfekowanych wektorem niosącym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do kontroli i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń +/- odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Przedstawione wyniki sugerują istnienie związku pomiędzy poziomem białek GDAP1, VDAC1 i Bcl2, a zmianą kształtu komórek HeLa (Rycina 13). Komórki HeLa, w których na skutek transfekcji wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego lub z mutacjami p.Pro153Argfs\*19, p.Gln218Glu i p.Leu239Phe, poziom białka Bcl2 uległ obniżeniu, a poziom VDAC1 podwyższeniu (Rycina 19), miały zmieniony kształt, były „rozpulchnione” (Rycina 15). Biorąc pod uwagę antyapoptotyczny charakter białka Bcl2, nasunęło się pytanie, czy w komórkach na skutek obniżenia poziomu białka GDAP1 dochodzi do obniżenia poziomu białka Bcl2, a w konsekwencji do zmian ich kształtu, jako przejawu apoptozy.

#### **4.2.8 Czy wybrane mutacje genu *GDAP1* powodują apoptozę komórek SH-SY5Y?**

Zmiany kształtu komórek HeLa korelujące ze wzrostem poziomu białka VDAC1, przy jednoczesnym spadku poziomu białka Bcl2 można wytłumaczyć dwojako. Komórki te weszły na drogę apoptozy ze względu na niższy poziom Bcl2 lub obserwowane zmiany są przejawem jakiegoś innego procesu.

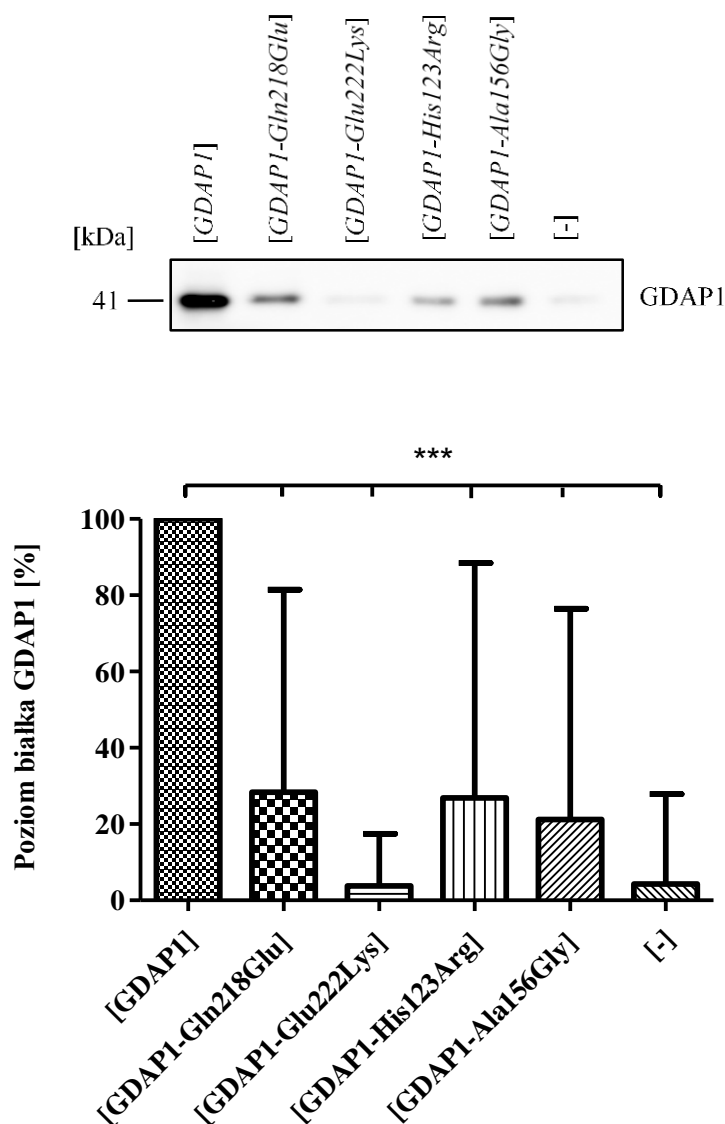
Z analizy obrazów komórek SH-SY5Y wykonanych metodą mikroskopii elektronowej wiemy, że badane przez nas komórki z nadekspresją *GDAP1*, jak i jego wyciszeniem nie wykazywały cech charakterystycznych dla apoptozy, nie obserwowano fragmentacji jądra, podobnie jak nie zaobserwowano tego w komórkach COS-7 [28]. Jednakże nie można było wykluczyć, że zmiany poziomu białek VDAC1 oraz Bcl2 w transfekowanych komórkach HeLa mogą być związane z procesem apoptozy. Biorąc to pod uwagę oraz to, że podczas neurodegeneracji związanej z chorobami neurologicznymi, śmierć komórki zwykle występuje w wyniku apoptozy, wysunięto hipotezę, że niektóre z mutacji genu *GDAP1* mogą powodować apoptozę transfekowanych komórek i postanowiono ją zweryfikować. W celu weryfikacji hipotezy, ocenie poddano poziom markerów apoptozy tj. białek z rodziny Bcl2 tj., Bcl2, Bcl-xl (ang., *B-cell lymphoma-extra large*), Bax (ang., *Bcl2 Associated X*), a także innych białek tj., cytochromu c, kaspazy-3 i PARP1 (ang., *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*).

Ze względu na podobieństwo pochodzenia linii komórkowej SH-SY5Y z komórkami Neuro2a, w których początkowo scharakteryzowano ekspresję genu *GDAP1* oraz to, że linia ta jest powszechnie wykorzystywana w badaniach neurobiologicznych od wielu lat, dalsze eksperymenty przeprowadzono na linii

komórkowej SH-SY5Y. Do badań, ze względu na obecność wysokiego poziomu endogennego białka GDAP1, wybrano mutacje, które u pacjentów dziedziczą się w sposób autosomalny dominujący: c.652C>G, p.Gln218Glu; c.664G>A, p.Glu222Lys, c.368A>G, p.His123Arg i c.467C>G, p.Ala156Gly, dalej w tekście opisywane nomenklaturą mutacji na poziomie białkowym.

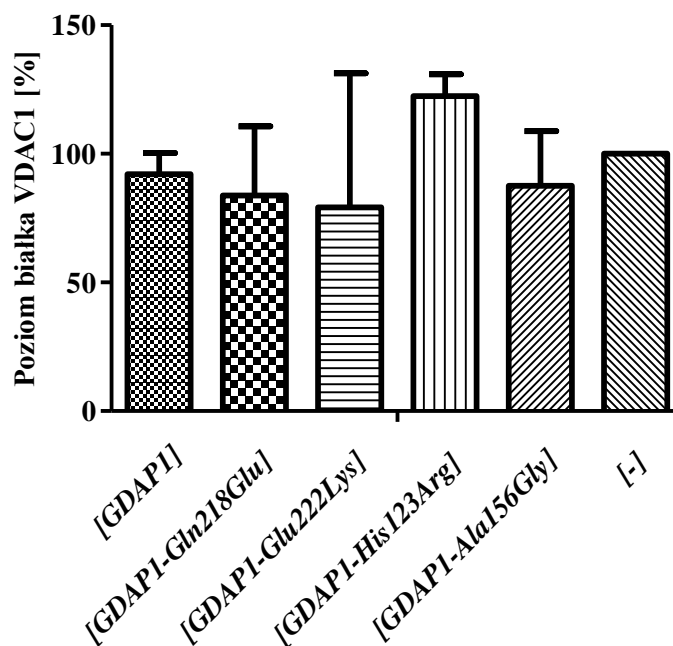
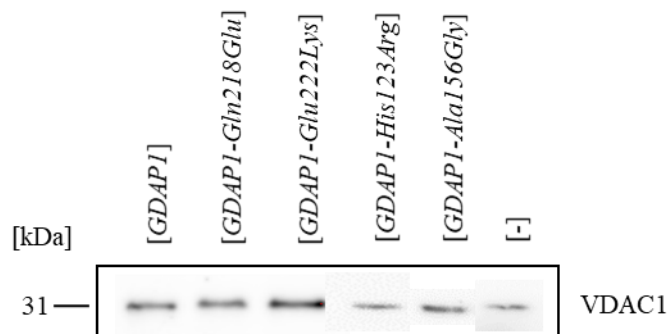
W celu sprawdzenia wpływu wybranych mutacji genu *GDAP1* na komórki SH-SY5Y początkowo przeanalizowano poziomy zmutowanego białka GDAP1. Zaobserwowano, że transfekcja wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego skutkowała wysokim poziomem białka GDAP1. W związku z tym, sprawdzono, jak transfekcja wektorem zawierającym poszczególne mutacje genu *GDAP1* wpływa na poziom białka GDAP1. Ilość białka GDAP1 analizowano w porównaniu do ilości białka po transfekcji komórek wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego. Poziom białka GDAP1 w komórkach po transfekcji pustym wektorem nie różnił się od poziomu białka GDAP1 w komórkach nietransfekowanych (dane niepokazane). Ekstrakty białkowe uzyskane z badanych komórek poddano analizie Western-blot. Analiza ta wykazała, że transfekcja pustym wektorem oraz niosącym cDNA genu *GDAP1* z mutacjami p.Gln218Glu, p.Glu222Lys, p.His123Arg i p.Ala156Gly skutkowała znacznie obniżonym poziomem białka GDAP1 w porównaniu do poziomu białka GDAP1 po nadekspresji *GDAP1* (Rycina 20). Najniższy poziom białka GDAP1 zaobserwowano w komórkach SH-SY5Y transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* z mutacją p.Glu222Lys (Rycina 20).





**Rycina 20.** Poziom białka GDAP1 w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych transfekowanych pustym wektorem ([ $-$ ]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-GDAP1. Stosunek poziomu GDAP1 obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka GDAP1 w komórkach SH-SY5Y transfekowanych pustym wektorem ([ $-$ ]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do [*GDAP1*] i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń  $\pm$  odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Zmodyfikowano, Kabzińska i wsp., 2022 [81].

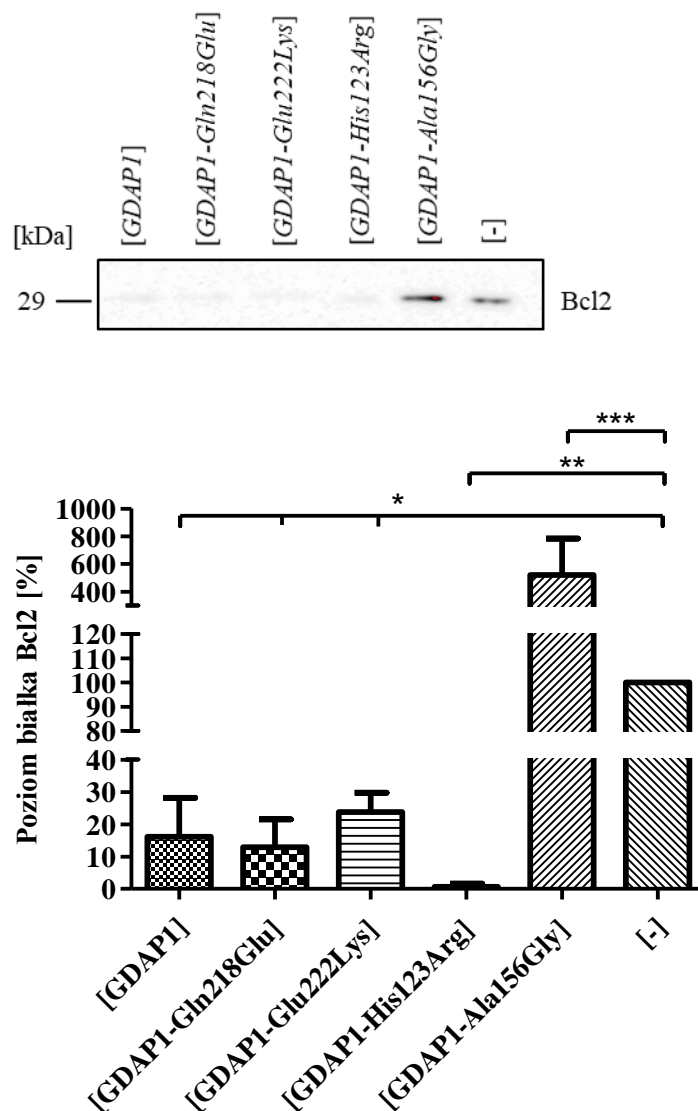
W związku z tym, że zaobserwowano inne poziomy białka GDAP1 po transfekcji komórek wektorem z poszczególnymi mutantami *GDAP1* w liniach komórkowych HeLa oraz SH-SY5Y, analizie poddano poziom białka VDAC1 w linii komórkowej SH-SY5Y, po transfekcji komórek pustym wektorem oraz wektorami zawierającymi cDNA *GDAP1* typu dzikiego lub z mutacjami p.Gln218Glu, p.Glu222Lys, p.His123Arg i p.Ala156Gly. Ekstrakty białkowe uzyskane z badanych komórek poddano analizie Western-blot. Analiza ta nie wykazała istotnych statystycznie różnic w poziomie białka VDAC1 we wszystkich badanych ekstraktach w porównaniu do poziomu tego białka w komórkach po transfekcji pustym wektorem pIRES ([ - ]), stanowiącym kontrolę (Rycina 21). Pomimo braku różnic w poziomie białka VDAC1 we wszystkich badanych ekstraktach komórkowych, nie znaczy to, że nie dochodzi w tych komórkach do zaindukowania procesu apoptozy, gdyż białko VDAC1 jest regulowane na kilka sposobów tj., aktywowane/ dezaktywowane na skutek różnych modyfikacji postranslacyjnych, czy przez oddziaływanie z innymi białkami [82]. Dlatego też przeprowadzono analizę poziomu innych białek związanych z procesem apoptozy.



**Rycina 21.** Poziom białka VDAC1 w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych transfekowanych pustym wektorem ([ $-$ ]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-VDAC1. Stosunek poziomu VDAC1 obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka VDAC1 w komórkach SH-SY5Y transfekowanych pustym wektorem ([ $-$ ]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do poziomu białka po transfekcji komórek pustym wektorem i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń  $\pm$  odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Białka z rodziny Bcl2 ze względu na ich budowę i pełnione funkcje dzieli się na białka antyapoptotyczne np. Bcl2, Bcl-xl oraz proapoptotyczne np. Bad, Bax. Białka Bcl2 i Bcl-xl tworzą heterodimery z białkami proapoptotycznymi, uniemożliwiając przebieg apoptozy. Ponadto, białka Bcl2 i Bcl-xl połączone z czynnikiem Apaf1 (ang., *Apoptotic Protease Activating Factor-1*) uniemożliwiają tworzenie apoptosomu, hamując tym samym aktywację kaspazy9 i proces apoptozy. Rodzina białek Bcl2 reguluje również wpływ cytochromu c z mitochondrium, aktywację kaspaz i DNAaz, jak również stan równowagi oksydoredukcyjnej w komórce. O ewentualnym przeżyciu komórki lub jej apoptotycznej śmierci decyduje jednak stosunek białek proapoptotycznych do białek antyapoptotycznych [80,83].

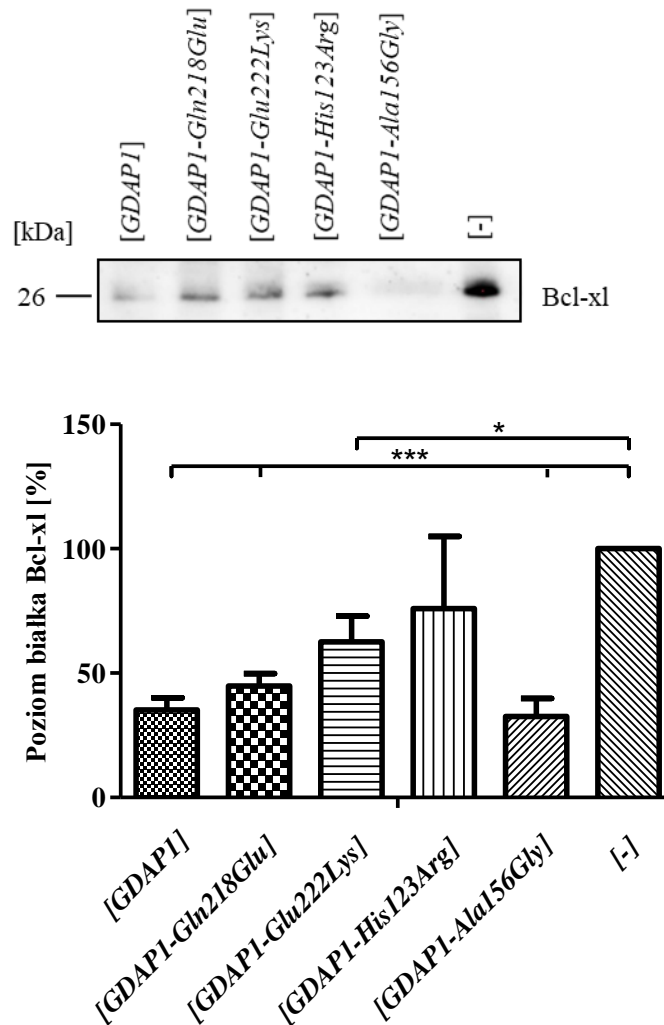
Analiza Western-blot ekstraktów białkowych otrzymanych z transfekowanych komórek SH-SY5Y wykazała, że poziom białka Bcl2 uległ znacznemu obniżeniu w komórkach z nadekspresją *GDAP1* oraz transfekowanych wektorem zawierającym cDNA *GDAP1* z mutacjami p.Gln218Glu, p.Glu222Lys i p.His123Arg w porównaniu do kontroli, czyli komórek transfekowanych pustym wektorem (Rycina 22). Poziom białka Bcl2 w komórkach SH-SY5Y z wprowadzoną mutacją p.Ala156Gly znacznie wzrósł (Rycina 22). Obniżony poziom białka Bcl2 w wybranych ekstraktach komórkowych może wskazywać na obecność procesu apoptozy.



**Rycina 22.** Poziom białka Bcl2 w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych transfekowanych pustym wektorem ([ $-$ ]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-Bcl2. Stosunek poziomu Bcl2 obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka Bcl2 w komórkach SH-SY5Y transfekowanych pustym wektorem ([ $-$ ]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do poziomu białka po transfekacji komórek pustym wektorem i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń  $\pm$  odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

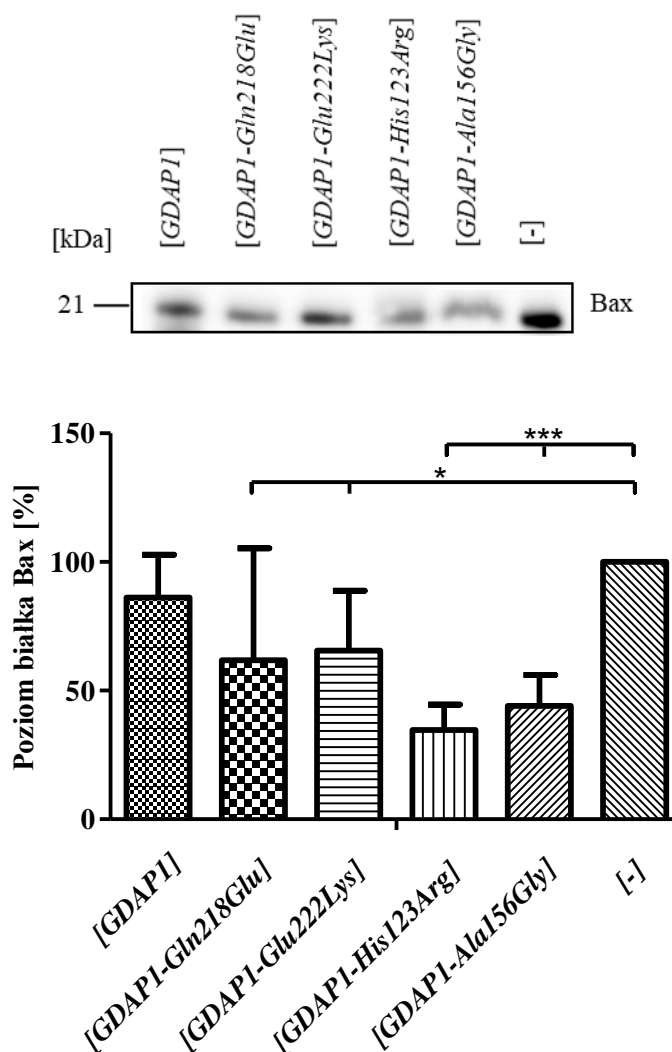
W tych samych ekstraktach, w których badano poziom białka Bcl2, przeanalizowano też poziom białka Bcl-xl. Badania wykazały, że w komórkach SH-SY5Y transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego oraz z poszczególnymi mutacjami (p.Gln218Glu, p.Glu222Lys, p.His123Arg,

p.Ala156Gly), podobnie jak w przypadku białka Bcl2, poziom białka Bcl-xl uległ znacznemu obniżeniu w porównaniu do jego poziomu w komórkach transfekowanych pustym wektorem (Rycina 23). Najniższy poziom białka Bcl-xl zaobserwowano w komórkach SH-SY5Y wyrażających zmutowaną formę białka p.Ala156Gly (Rycina 23). Interesujące jest to, że komórki SH-SY5Y z mutacją p.Ala156Gly, które mają podwyższony poziom białka Bcl2, mają znacząco obniżony poziom białka Bcl-xl.



**Rycina 23.** Poziom białka Bcl-xl w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych transfekowanych pustym wektorem ([ -]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([GDAP1]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-Bcl-xl. Stosunek poziomu Bcl-xl obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka Bcl-xl w komórkach SH-SY5Y transfekowanych pustym wektorem ([ -]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([GDAP1]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do poziomu białka po transfekcji komórek pustym wektorem i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń +/- odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

W kolejnym kroku poddano analizie poziom białka proapoptotycznego Bax. Przeprowadzona analiza poziomu białka Bax metodą Western-blot wykazała, że jego poziom w komórkach SH-SY5Y transfekowanych wektorem z cDNA *GDAP1* typu dzikiego oraz z poszczególnymi mutacjami (p.Gln218Glu, p.Glu222Lys, p.His123Arg, p.Ala156Gly), podobnie jak w przypadku białek Bcl2 oraz Bcl-x1, uległ obniżeniu w porównaniu do poziomu białka Bax w komórkach transfekowanych pustym wektorem, stanowiącym kontrolę (Rycina 24). Jednakże nie wyklucza to zaindukowania procesu apoptozy w komórkach na skutek obecności zmutowanego białka *GDAP1*, gdyż jak wspomniano wcześniej, w procesie apoptozy decydującym jest stosunek białek proapoptotycznych do białek antyapoptotycznych.

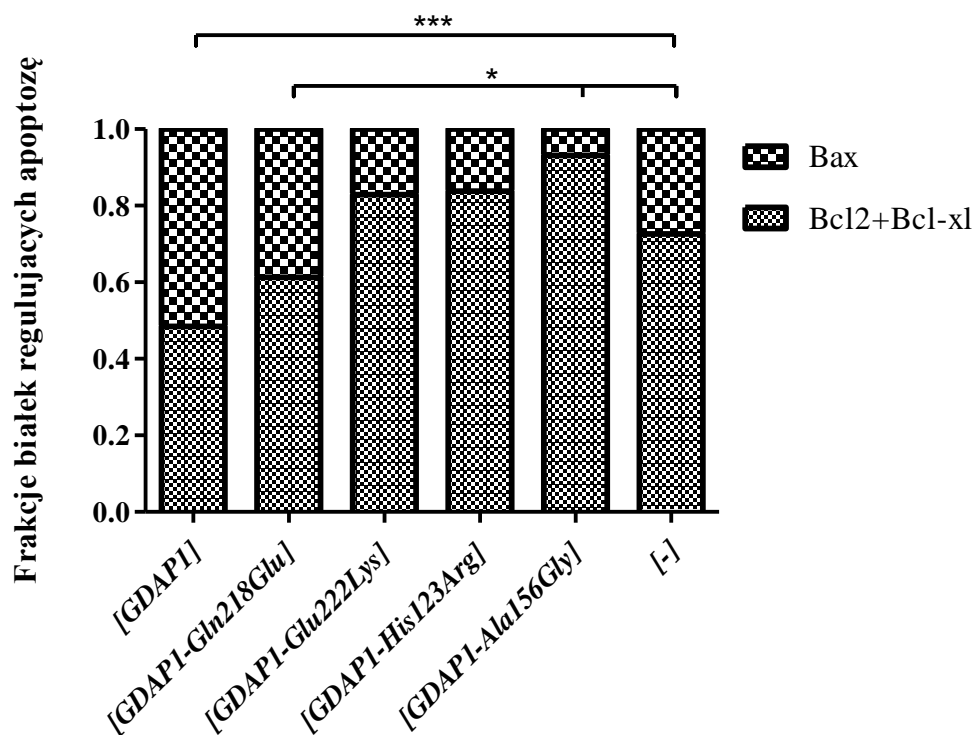


**Rycina 24.** Poziom białka Bax w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych transfekowanych pustym wektorem ([-]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([GDAP1]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-Bax. Stosunek poziomu Bax obliczony na podstawie analizy densytometrycznej poziomu białka Bax w komórkach SH-SY5Y transfekowanych pustym wektorem ([-]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([GDAP1]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do poziomu białka po transfekcji komórek pustym wektorem i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń +/- odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Dlatego, następnie określono stosunek poziomu białek proapoptotycznych do poziomu białek antyapoptotycznych w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza poziomów białek Bax, Bcl2 oraz Bcl-xl metodą Western-blot wykazała, że transfekcja komórek wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego spowodowała zwiększenie poziomu białka Bax w stosunku do poziomu białek Bcl2 i Bcl-xl w sposób



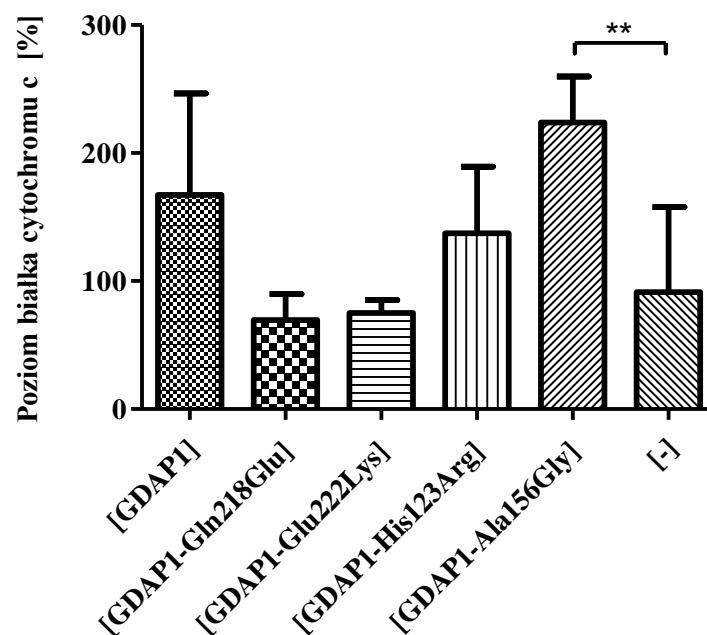
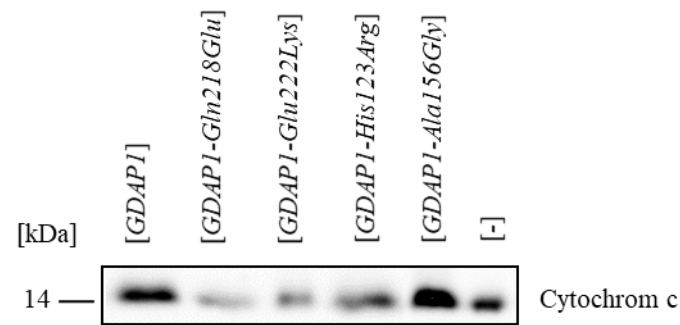
istotny statystycznie (Rycina 25). Natomiast w komórkach transfekowanych wektorem z poszczególnymi mutacjami genu *GDAP1* istotnie statystycznie zmiany w stosunku białek proapoptotycznych do antyapoptotycznych zaobserwowano w przypadku mutacji p.Gln218Glu oraz p.Ala156Gly (Rycina 25). Wprowadzenie cDNA *GDAP1* z mutacją p.Gln218Glu skutkowało zwiększeniem poziomu białka Bax w stosunku do poziomu białek Bcl2 i Bcl-xl, podobnie jak w przypadku komórek z nadekspresją genu *GDAP1*, a wprowadzenie cDNA z mutacją p.Ala156Gly spowodowało istotną statystycznie zmianę stosunku w przeciwnym kierunku tj. obniżenie poziomu białka Bax w stosunku do poziomu białek Bcl2 i Bcl-xl (Rycina 25). Wyniki te wskazują na to, że wszystkie analizowane mutacje genu *GDAP1* powodują zmianę stosunku białek proapoptotycznych do antyapoptotycznych w odniesieniu do stosunku tych białek w przypadku komórek transfekowanych cDNA *GDAP1* typu dzikiego.



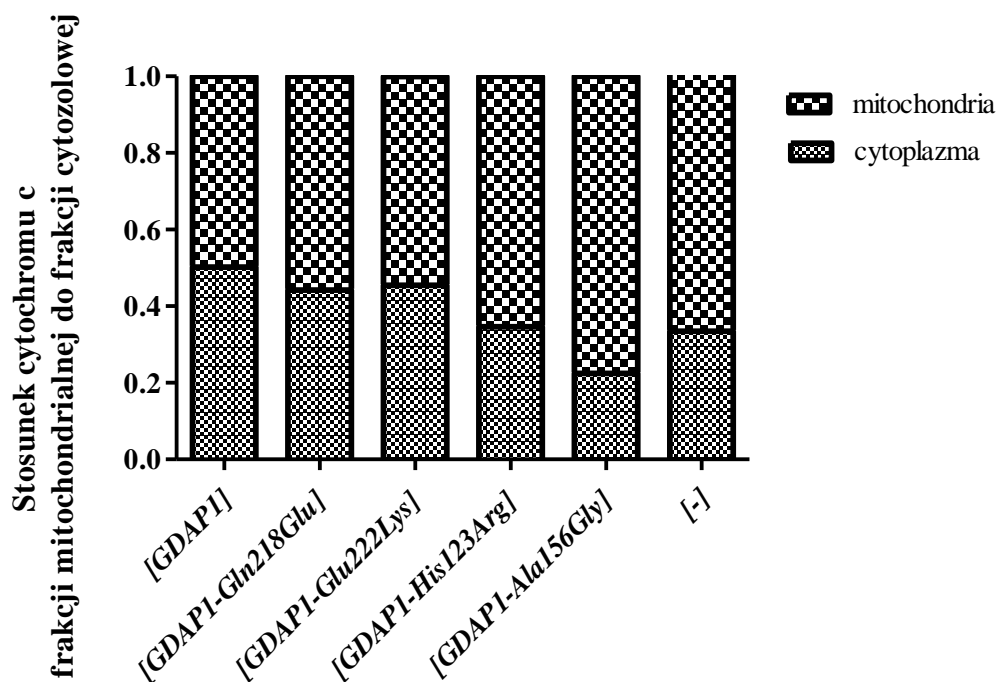
**Rycina 25.** Stosunek poziomu białka proapoptotycznego Bax do poziomu białek antyapoptotycznych Bcl2 i Bcl-xl zmienia się w komórkach wyrażających wybrane mutacje genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do stosunku białek po transfekcji komórek pustym wektorem i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń.

Kolejnym etapem badań było określenie całkowitego poziomu cytochromu c w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Cytochrom c jest hemoproteiną pełniącą funkcję transportera elektronów w łańcuchu oddechowym w mitochondriach. W warunkach stresu, gdy dochodzi do zaindukowania procesu apoptozy, dzięki działaniu białek proapoptotycznych tj., Bax oraz Bak, które tworzą kanał w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, zostaje uwolniony z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy. Tam wiąże się z białkami adaptorowymi, które następnie agregują i wiążą prokaspazę 9. Tworzy się apoptosom, którego utworzenie rozpoczyna aktywację kaskady kaspaz, prowadzącą do apoptozy komórki. Zmiana lokalizacji cytochromu c z mitochondrialnej na cytoplazmatyczną jest, więc jednym z markerów zaindukowanego procesu apoptozy [83]. Ten fakt wykorzystano w dalszych doświadczeniach.

Przeprowadzono najpierw analizę zmian całkowitego poziomu białka cytochromu c metodą Western-blot, a następnie analizę jego poziomu we frakcjach mitochondrialnej i cytozolowej w badanych komórkach. Analiza ta wykazała, że całkowity poziom cytochromu c w komórkach SH-SY5Y transfekowanych wektorem zawierającym cDNA *GDAP1* typu dzikiego lub z mutacjami p.His123Arg i p.Ala156Gly wzrósł w stosunku do jego poziomu w komórkach transfekowanych pustym wektorem, stanowiącym kontrolę. W przeciwieństwie do tego, jego poziom w komórkach transfekowanych wektorem zawierającym *GDAP1* z mutacjami p.Gln218Glu oraz p.Glu222Lys był porównywalny do poziomu w kontroli (Rycina 26). Dodatkowo zaobserwowano, że w tych komórkach oraz komórkach z wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego poziom cytochromu c we frakcji mitochondrialnej był porównywalny do poziomu we frakcji cytozolowej. Natomiast w komórkach wyrażających mutacje p.His123Arg i p.Ala156Gly zaobserwowano wzrost poziomu cytochromu c we frakcji mitochondrialnej, podobnie jak w komórkach transfekowanych pustym wektorem (Rycina 27). Wyniki te wskazują na to, że w przypadku mutantów genu *GDAP1* nie dochodzi do uwolnienia cytochromu c do cytoplazmy, co ma miejsce, podczas gdy dochodzi do zaindukowania procesu apoptozy.



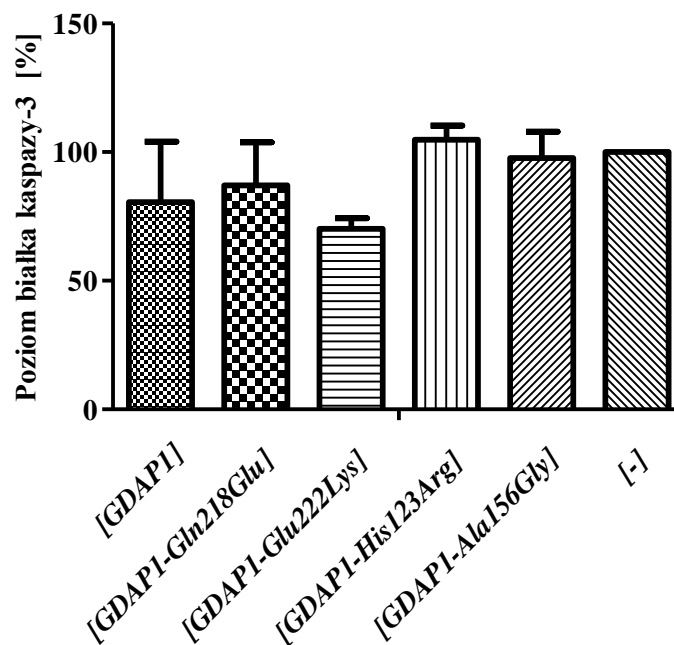
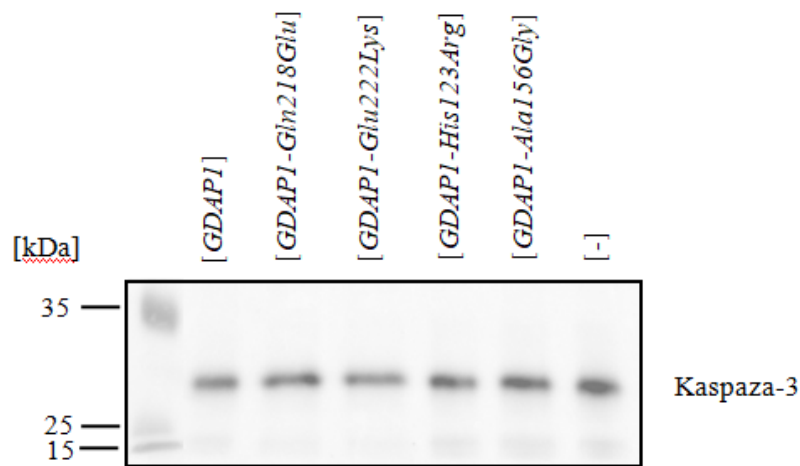
**Rycina 26.** Zmiany poziomu cytochromu c w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych transfekowanych pustym wektorem ([ $-$ ]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-Cytochrom c. Analiza densytometryczna poziomu białka Cytochromu c w komórkach SH-SY5Y transfekowanych pustym wektorem ([ $-$ ]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do poziomu białka po transfekcji komórek pustym wektorem i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń  $\pm$  odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Rycina 27.** Stosunek poziomu cytochromu c we frakcji mitochondrialnej do poziomu we frakcji cytozolowej komórek transfekowanych pustym wektorem ([-]), wektorem zawierającym cDNA *GDAP1* typu dzikiego ([*GDAP1*]) lub wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1*.

W celu weryfikacji wyciągniętego wniosku, że nie doszło do zaindukowania procesu apoptozy, gdyż nie zaobserwowano wypływu cytochromu c do cytoplazmy wkomórkach SH-SY5Y transfekowanych poszczególnymi mutacjami genu *GDAP1*, analizie poddano poziom kaspazy-3. Należy ona do rodziny kaspaz, będących wewnątrzkomórkowymi enzymami z grupy proteaz cysteinowych. Z uwagi na etap procesu apoptozy, w którym aktywowane są poszczególne kaspazy, wyróżnia się kaspazy indukujące (sygnałowe; -2, -8, -9, -10, -12) oraz kaspazy wykonawcze (efektorowe; -3, -6, -7). Kaspazy są obecne w komórce w postaci nieaktywnych prokaspaz i ulegają aktywacji dopiero w momencie zainicjowanego procesu apoptozy. Kaspaza-3 jest jedną z najważniejszych kaspaz wykonawczych procesu apoptozy. Jest ona odpowiedzialna za kondensację chromatyny i degradację DNA. Aktywacja kaspazy-3 wymaga proteolitycznego cięcia nieaktywnej formy prokaspazy, na aktywne fragmenty, które w analizie Western-blot uwidaczniają się w formie prążków na wysokości odpowiadającej 17 i 19 kDa. Prokaspaza-3 jest widoczna na wysokości ~ 32 kDa [84].

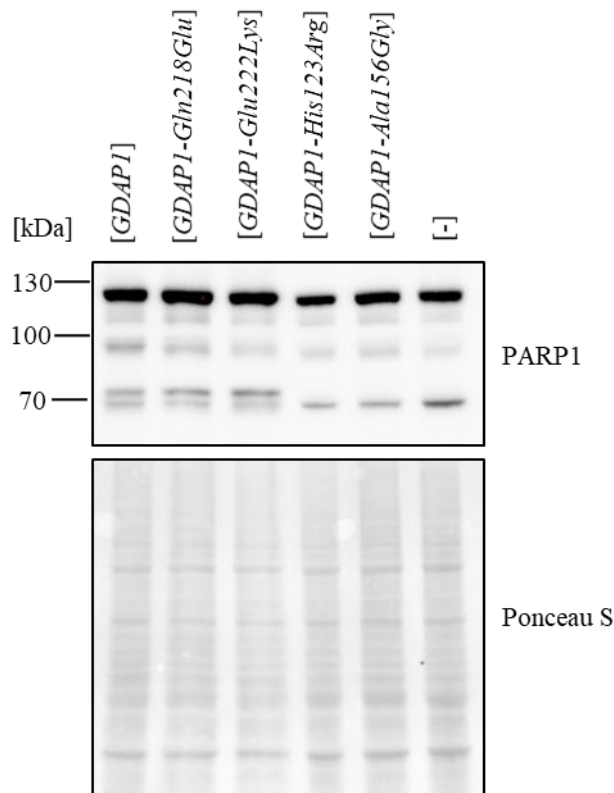
Analiza ekstraktów białkowych metodą Western-blot wykazała, że w komórkach SH-SY5Y transfekowanych pustym wektorem, bądź wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego lub mutacje p.Gln218Glu, p.Glu222Lys, p.His123Arg oraz p.Ala156Gly, zmiany ilości białka prokaspazy-3 były nieistotne statystycznie, a wzór jej cięcia nie zmieniał się (Rycina 28). W transfekowanych komórkach SH-SY5Y nie zaobserwowano aktywnej formy białka kaspazy-3 (Rycina 28). Jest to zgodne z poprzednimi wnioskami, które pokazały, że zmniejszeniu poziomu białek Bcl2 i Bcl-xl nie towarzyszy wzrost ilości białka proapoptotycznego Bax, nie dochodzi też do wycieku cytochromu c do cytoplazmy, czyli nie dochodzi do aktywacji apoptozy, a co za tym idzie, nie dochodzi do aktywacji kaspazy-3.



**Rycina 28.** Poziom białka kaspazy-3 w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych transfekowanych pustym wektorem ([-]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([GDAP1]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-kaspaza-3. Analiza densytometryczna poziomu białka kaspazy-3 w komórkach SH-SY5Y transfekowanych pustym wektorem ([-]), wektorem zawierającym GDAP1 typu dzikiego ([GDAP1]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1*. Wyniki wyrażono w odniesieniu do poziomu białka po transfekcji komórek pustym wektorem i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń +/- odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Dodatkowo, aby utwierdzić się w prawidłowości wyciągniętego wniosku, że nie zaobserwowano aktywnej kaspazy-3, czyli nie została zapoczątkowana apoptoza, sprawdzono, czy jest obecny efekt działania aktywnej kaspazy-3. Zbadano cięcie substratu dla tej kaspazy, białka PARP1. PARP1 jest białkiem zlokalizowanym w jądrze komórkowym, gdzie odgrywa kluczową rolę w naprawie DNA. PARP1 jest białkiem, które ma kilka form o różnych masach molekularnych rozdzielających się podczas elektroforezy i w analizie Western-blot uwidacznia się w postaci kilku prążków. W przypadku apoptozy pojawiają się dodatkowe formy PARP1 po cięciu przez kaspazę-3, o masie 89 i 24 kDa [85].

Metodą Western-blot przeanalizowano ekstrakty białkowe w kierunku wizualizacji wzoru prążków białka PARP1. W komórkach transfekowanych wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego oraz z mutacjami p.Gln218Glu i p.Glu222Lys wzór prążków był taki sam, zaobserwowano obecność prążka o masie powyżej 70 kDa. W komórkach transfekowanych pustym wektorem oraz z pozostałymi analizowanymi mutacjami genu *GDAP1* (p.His123Arg, p.Ala156Gly) nie zaobserwowano dodatkowego prążka o masie około 70 kDa (Rycina 29). Wśród badanych ekstraktów białkowych z komórek SH-SY5Y z mutacjami genu *GDAP1* nie zaobserwowano prążka na wysokości 24 kDa (dane niepokazane). Obserwowany wzór prążków nie odpowiada temu z procesu apoptozy. Podtrzymuje to wniosek wyciągnięty w poprzednim doświadczeniu, że w badanych komórkach nie dochodzi do aktywacji kaspazy-3.



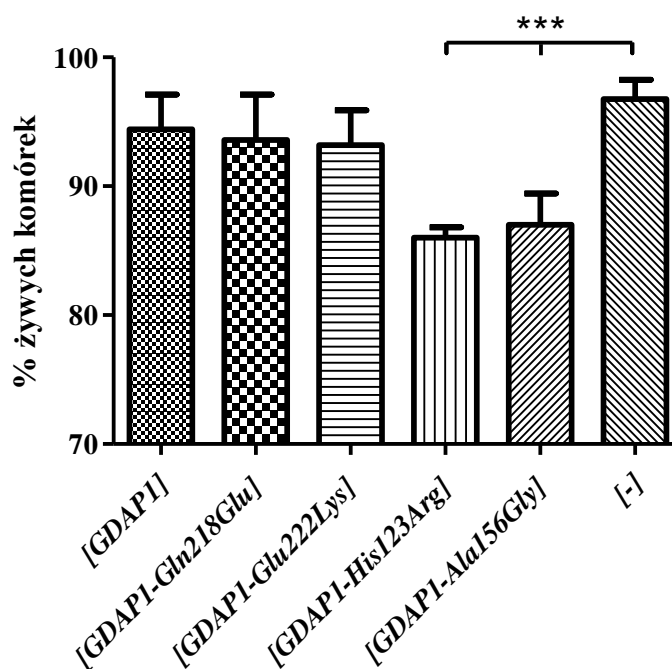
**Rycina 29.** Poziom białka PARP1 w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Analiza Western-blot całkowitych ekstraktów komórkowych transfekowanych pustym wektorem ([ -]), wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz wektorem zawierającym poszczególne warianty genu *GDAP1* z użyciem przeciwciała anti-PARP1. Poniżej przedstawiono membranę wybarwioną Ponceau S, z uwidocznionymi białkami w poszczególnych ścieżkach.

W przedstawionych powyżej wynikach zaobserwowano zmiany w poziomie analizowanych białek związanych z procesem apoptozy w komórkach transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego oraz z mutacjami (p.Gln218Glu, p.Glu222Lys, p.His123Arg, p.Ala156Gly). Pomimo tego, że poziom białek antyapoptotycznych Bcl2 i Bcl-x1 uległ obniżeniu, to poziom białka proapoptotycznego Bax również się obniżył. Dodatkowo nie zaobserwowano zwiększonego wypływu cytochromu c pod wpływem mutacji genu *GDAP1*, gdyż jego obecność w cytoplazmie była we wszystkich badanych komórkach podobna do tej, jaką obserwowano w cytoplazmie komórek kontrolnych. W żadnym z badanych przypadków nie zaobserwowano charakterystycznego dla apoptozy cięcia białka PARP1. Powyższe wyniki świadczą o tym, że w komórkach transfekowanych wektorem z cDNA genu *GDAP1* z poszczególnymi mutacjami, proces apoptozy nie został pobudzony.



#### 4.2.9 Badanie żywotności komórek SH-SY5Y

Wyniki poprzednich eksperymentów wykluczyły aktywację procesu apoptozy na skutek obniżenia poziomu białka GDAP1. Jednakże nie wyklucza to możliwości, że patogenność mutacji *GDAP1* wynika z obniżenia żywotności komórek. Poza apoptozą istnieją jeszcze inne ścieżki obumierania komórek np. ferroptoza. Określono, więc wpływ genu *GDAP1* z patogennymi mutacjami na żywotność komórek SH-SY5Y. Analizie poddano komórki transfekowane pustym wektorem, a także wektorem zawierającym cDNA *GDAP1* typu dzikiego oraz z mutacjami p.Gln218Glu, p.Glu222Lys, p.His123Arg i p.Ala156Gly. Zaobserwowano, że transfekcja komórek wektorem niosącym *GDAP1* z mutacjami p.His123Arg i p.Ala156Gly spowodowała wyraźne zmniejszenie żywotności komórek w porównaniu do żywotności komórek transfekowanych pustym wektorem. Natomiast transfekcja komórek wektorem z *GDAP1* p.Gln218Glu i p.Glu222Lys skutkowała nieistotną statystycznie redukcją żywotności komórek w porównaniu z kontrolą (Rycina 30).



**Rycina 30.** Żywotność komórek SH-SY5Y transfekowanych wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego ([*GDAP1*]) oraz poszczególne warianty genu *GDAP1* w porównaniu do komórek transfekowanych pustym wektorem ([-]). Ocenę żywotności komórek przeprowadzono za pomocą barwienia przyżyciowego błękitem trypanu. Wyniki wyrażono w odniesieniu do kontroli i przedstawiono, jako średnie z trzech niezależnych powtórzeń +/- odchylenia standardowe. Istotność statystyczną określono za pomocą jednokierunkowej analizy ANOVA z korektą Dunnetta z \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Zmodyfikowano, Kabzińska i wsp., 2022 [81].

Uzyskane wyniki wskazują na to, że mutacje genu *GDAP1* działają niekorzystnie na komórki SH-SY5Y, co skutkuje obniżoną żywotnością komórek. Co ciekawe, mutacja p.Ala156Gly skutkująca znacznie obniżoną żywotnością komórek, powoduje zmniejszenie stosunku białka proapoptotycznego do poziomu białek antyapoptotycznych (Rycina 25). Istotny jest również fakt, że największy spadek żywotności wykazały komórki, z mutacją p.His123Arg, która nie powodowała zmiany kształtu komórek HeLa. W związku z tym obserwowane zmiany kształtu komórek opisane w rozdziale 4.2.6 są najpewniej przejawem innego procesu zachodzącego w komórkach. Uzyskane wyniki sugerują, że mutacje w genie *GDAP1* mogą obniżać żywotność komórek, ale na ścieżce innej, niż apoptoza.

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Minęło już ponad 30 lat od odkrycia duplikacji genu *PMP22*, pierwszej mutacji sprawczej w chorobach kręgu Charcot-Marie-Tooth. Dotychczas opisano mutacje w ponad 100 genach w chorobach kręgu CMT. Jednak jak dotąd dla żadnej z nich nie pojawił się na rynku farmaceutycznym choćby jeden lek, który złagodziłby przebieg choroby [36]. Myślą przewodnią badań przeprowadzonych w niniejszej pracy było zidentyfikowanie potencjalnych celów dla przyszłej terapii eksperymentalnej choroby CMT wywołanej mutacjami w genie *GDAP1*. Wprowadzenie terapii eksperymentalnej w każdej z heterogennych chorób genetycznie uwarunkowanych wymaga spełnienia trzech warunków tj. poznania mutacji wiodącej – głównej i wpływu tła genetycznego; określenia patogenności mutacji i wreszcie identyfikacja „punktów uchwytu” potencjalnych leków w oparciu o poznanie patogenezy molekularnej choroby i jej biomarkerów. W związku z tym, w pracy postanowiono pochylić się nad trzema zagadnieniami. Po pierwsze, zbadano „tło genetyczne” choroby CMT-GDAP1 przez określenie wpływu dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT” na przebieg choroby. Po drugie, postanowiono poznać molekularne podłoże choroby, przez określenie nowych fenotypów molekularnych choroby CMT-GDAP1 i określenie patogenności mutacji. Aż wreszcie, po trzecie, zaproponowano fenotypy potencjalnie użyteczne do wyznaczenia kandydatów na biomarkery do badań klinicznych w chorobie CMT wywołanej mutacjami w genie *GDAP1*.

Pierwsza część pracy była dedykowana poznaniu „tła genetycznego” choroby CMT wywołanej mutacjami w genie *GDAP1*. W naszym ujęciu „tło genetyczne” oznacza warianty sekwencji w wybranych genach związanych z powstawaniem chorób kręgu CMT. Stwierdzono, że u badanych pacjentów oprócz wariantu sekwencji genu *GDAP1* opisanego, jako sprawczy, występują dodatkowe, rzadkie warianty sekwencji w innych genach zaangażowanych w patogenezę chorób kręgu CMT. U pacjentów z mutacjami w genie *GDAP1* dziedziczonymi w sposób autosomalny dominujący zidentyfikowano dwa razy więcej dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT” w porównaniu z pacjentami z mutacjami genu *GDAP1* dziedziczonymi w sposób autosomalny recesywny. Po zastosowaniu skali genotypowej i fenotypowej opracowanej na potrzeby badań wykazano również, że pacjenci z najcięższym fenotypem choroby CMT-GDAP1 i najszerszym spektrum objawów dodatkowych posiadali większą liczbę wariantów sekwencji w „genach CMT”. To może oznaczać, że liczba dodatkowych wariantów

sekwencji w „genach CMT” koreluje z nasileniem fenotypu u badanych pacjentów. Nasuwa się pytanie, czy określony fenotyp pacjentów dotkniętych CMT-GDAP1 jest wynikiem skumulowanego efektu mutacji o jednakowej „wadze”, czy też spowodowany jest działaniem jednej mutacji sprawczej i szeregu dodatkowych wariantów sekwencji w innych genach, których mutacje są zaangażowane w patogenezę chorób kręgu CMT. Dotychczas, w istniejącej literaturze wykazano wyraźny wpływ dodatkowych wariantów sekwencji na fenotyp pacjentów dotkniętych chorobą CMT [69]. Analiza danych w badaniach Gonzagi i współautorów (2015) wykazała znacznie zwiększoną liczbę rzadkich wariantów sekwencji w 58 genach związanych z chorobami kręgu CMT u pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki te sugerują, że sumaryczny efekt działania rzadkich wariantów sekwencji przyczynia się do wzrostu ciężkości przebiegu choroby CMT [69]. Inni badacze zaobserwowali skumulowany efekt wariantów sekwencji w dwóch genach związanych z chorobami kręgu CMT [86,87]. Opisano chłopca z mutacją sprawczą w genie *MFN2* z ciężkim fenotypem klinicznym choroby CMT, przejawiającym się problemami z samodzielny poruszaniem się. Analiza WES wykazała, że oprócz mutacji w genie *MFN2*, u pacjenta obecna jest również mutacja w genie *GDAP1* [86]. Jest to szczególnie ważne, gdyż białka GDAP1 oraz MFN2 biorą udział w tym samym procesie komórkowym, jakim jest tworzenie i fragmentacja sieci mitochondrialnej i może sugerować, że dziedziczenie dwu-, trzy-, czy nawet oligogenowe może dotyczyć genów kodujących białka zaangażowane w ten sam proces komórkowy. Dziedziczenie dwugenowe zostało udokumentowane także w przypadku mutacji w genach *PMP22* i *MFN2* [88] oraz *PMP22* i *MPZ* [89]. Doniesienia te sugerują, że istnieje możliwość współistnienia wariantów sekwencji w genach zaangażowanych w powstawanie chorób kręgu CMT i należy ją rozważyć w przypadku zaobserwowania znacznej wewnątrzrodzinnej zmienności klinicznej. Inni badacze sugerują natomiast udział niemendlowskich czynników w etiologii chorób kręgu CMT, spowodowanych mutacjami w różnych genach. Proponują oni, że do czynników zaangażowanych w powstawanie chorób kręgu CMT należą niepełna penetracja wariantów i modyfikatory genetyczne, przynajmniej u niektórych pacjentów [90]. Wyniki te świadczą o możliwości oligogenowego dziedziczenia choroby CMT, wcześniej uznawanej za chorobę monogenową. Być może tłumaczy to fakt, że pomimo dużego postępu w biologii molekularnej, diagnostyka genetyczna dla poszczególnych podtypów choroby CMT pozostaje zaskakująco niska [90]. Wykazano, że nawet przy zastosowaniu nowoczesnych narzędzi molekularnych tj., WES i NGS w diagnostyce chorób kręgu

CMT, wykrywalność mutacji nie przekracza 50%, a w niektórych przypadkach nawet 20%. Oznacza to, że aż około 80% pacjentów może pozostać bez diagnozy [91]. Może to wynikać z obecności mutacji w innych genach i dziedziczenia poligenowego choroby, niewykrywalnego tradycyjnym sekwencjonowaniem Sangera, czy też obecności wariantów w sekwencjach niekodujących, których znaczenia klinicznego nie jesteśmy w stanie na razie określić i które często są pomijane.

W badanych przez nas rodzinach zaobserwowano wpływ „tła genetycznego” na fenotyp pacjentów z CMT-GDAP1. Chorzy z Rodziny 9, rodzeństwo powyżej 70 roku życia, u których zidentyfikowano dziedziczącą się w sposób autosomalny dominujący mutację w genie *GDAP1* (c.664G>A, p.Glu222Lys), charakteryzują się niezwykle łagodnym fenotypem. Analiza WES wykazała u obojga pacjentów obecność tylko dwóch dodatkowych wariantów sekwencji w genach *DST* oraz *PRX*, których status patogenności nie został jak dotąd określony. W przeciwieństwie do rodziny 9, w Rodzinie 8, pacjentka charakteryzująca się najcięższym fenotypem, oprócz złożonej mutacji heterozygotycznej w genie *GDAP1* c.715C>T, p.Leu239Phe/c.664G>A, p.Glu222Lys posiada dodatkowo pięć wariantów sekwencji w genach (*DST*, *IGHMBP2*, *SPG11*, *PRX*, i *PRNP*) zaangażowanych w patogenezę CMT. Jeden z nich jest określany, jako łagodny, trzy, jako prawdopodobnie łagodne i jeden wariant o nieokreślonej patogenności. Podobnie, w Rodzinie 6 z główną mutacją patogenną w genie *GDAP1*, c.467C>G, p.Ala156Gly, najciężej chory pacjent posiada aż sześć dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT” (*DCTN1*, *SACS*, *CTDP1*, *SBF1*, *ARHGEF10*, *FBXO38*), z których trzy są prawdopodobnie łagodne, dwa o nieokreślonej patogenności, a jeden w przypadku którego w bazach danych opisana jest niezgodność statusu patogenności wariantu (łagodny/prawdopodobnie łagodny/o nieokreślonej patogenności). Z wyjątkiem genu *SBF1*, biologia pozostałych genów, w których wykryto dodatkowe warianty sekwencji, jest słabo poznana.

Bardzo interesującą hipotezę dotyczącą tzw. disease gene network (DGN) sformułowali Gonzaga-Jauregui i współautorzy (2015). Według tej koncepcji geny ulegające zsynchronizowanej ekspresji w obrębie jednej tkanki (np. geny ulegające jednoczasowej ekspresji w nerwie obwodowym) tworzą pewien system, który posiada zdolność „buforowania” pojedynczych mutacji. Jeśli jednak wspomniany system - „sieć” zostanie „osłabiony” szeregiem mutacji w obrębie np. „genów CMT” jego możliwości buforowania kolejnych mutacji znacznie słabną. Oznacza to, że dodanie choćby jednego

wariantu sekwencji o nieznacznej patogenności może doprowadzić do załamania się homeostazy w obrębie systemu, jakim jest nerw obwodowy [69]. Niewykluczone, zatem, że u niektórych chorych do wywołania CMT wystarczy obecność zaledwie kilku wariantów sekwencji o słabej sile działania bez konieczności wystąpienia mutacji głównej. To bardzo interesujące w świetle wyników badań osób zdrowych i osób chorujących na CMT. Nawet w przypadku słabych wariantów sekwencji w „genach CMT” u osób zdrowych ich liczba jest bardzo nieznaczna, natomiast obserwujemy ich wzrost u ludzi chorych. Innymi słowy, oznacza to, że „tło genetyczne” ograniczone nawet do „genów CMT” w znacznym stopniu decyduje o ujawnieniu się choroby niezależnie od działania mutacji głównej (sprawczej). Taka koncepcja wydaje się mieć bardzo duże znaczenie dla diagnostyki molekularnej CMT w przypadku chorych, u których, pomimo stwierdzenia niewątpliwego fenotypu neuropatii genetycznie uwarunkowanej, badania WES i WGS nie prowadzą do identyfikacji pojedynczej mutacji sprawczej, która być może w ogóle nie istnieje. Trudno obecnie ocenić, jaka część chorych z fenotypem CMT reprezentuje dziedziczenie wielogenowe (poligenowe)? W tym miejscu warto zwrócić uwagę na to, że w związku z rosnącym zakresem badań genetycznych, zwiększa się liczba rozpoznawanych wariantów sekwencji genetycznych. Mogą one być interpretowane, jako łagodne lub patogenne. Jednakże proces interpretacji często nie zapewnia jasnej klasyfikacji, w wyniku czego szereg wariantów otrzymuje status o nieznanym znaczeniu (ang., *Variants of Unknown Significance*, VUS), czy też występują warianty, których interpretacja patogenności dostarcza sprzecznych danych (ang., *Conflicting Interpretation of Pathogenicity*, CIP) [92,93]. Stanowią one poważny problem kliniczny, ponieważ nie dostarczają przydatnych informacji do podejmowania decyzji diagnostycznych powodując, że duża część chorób genetycznie uwarunkowanych pozostaje niezdiagnozowana. Należy pamiętać, że ustalenie prawidłowej diagnozy ma kluczowe znaczenie dla uzyskania skutecznej terapii. W związku z tym, potrzebne są lepsze metody interpretacji patogenności wariantów o niepewnym znaczeniu. Przykładowo, obecnie opracowuje się systemy klasyfikujące warianty sekwencji, wykorzystując model zwierzęcy *Caenorhabditis elegans* do interpretacji patogenności wariantów sekwencji w genie *STXBPI*, którego mutacje są jednymi z najczęstszych przyczyn padaczki genetycznej i zaburzeń neurorozwojowych [92], a także w genie *TMEM67*, którego mutacje są odpowiedzialne za powstawanie ciliopatii – wieloukładowych zaburzeń na skutek nieprawidłowej budowy rzęsek komórkowych [94]. Badania te pokazują, że *C. elegans* może być wykorzystywany

w zautomatyzowanej analizie fenotypowej, w celu odróżnienia wariantów łagodnych od chorobotwórczych, zapewniając w ten sposób model do szybkiej i opłacalnej interpretacji patogenności wariantów. Biorąc pod uwagę obecność różnych wariantów sekwencji genów wśród naszej grupy badanej, sugerujemy, że fenotyp pacjentów może wynikać z działania „głównej” mutacji patogennej oraz kilku pozostałych wariantów sekwencji genów, szczególnie w przypadku choroby CMT-GDAP1, dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący. Analiza WES przeprowadzona w celu określenia wpływu „tła genetycznego” na fenotyp pacjentów w Rodzinie 9 wykazała niewielką liczbę dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT”, co wydaje się potwierdzać, że wyłącznie mutacja c.664G>A, p.Glu222Lys może prowadzić do powstania pełnego fenotypu choroby CMT-GDAP1. Natomiast w Rodzinach 6 oraz 8 obciążenie innymi rzadkimi wariantami sekwencji w „genach CMT” może istotnie wpływać na fenotyp, przejawiając znaczną wewnątrzrodzinną heterogennością kliniczną. Wyraźny fenotyp obserwowany u badanych pacjentów może wynikać z działania addytywnego i/lub nawet synergistycznego dodatkowych wariantów sekwencji, a zrozumienie tych zależności powinno być przedmiotem dalszych badań. W naszej pracy przedstawiamy argumenty za udziałem dodatkowych mutacji w patogenezie choroby do tej pory uznawanej za chorobę monogenową. Podobne przesłanie płynie z pracy Gonzagi i współautorów (2015), którzy wykazali, że wśród pacjentów z chorobami kręgu CMT, obciążenie dodatkowymi wariantami sekwencji może wpływać na fenotyp pacjentów, przyczyniając się do klinicznej heterogenności i nasilenia objawów choroby [69]. W populacji europejskiej, w grupie 37 pacjentów z chorobą CMT zidentyfikowali oni średnio 2,3 dodatkowe rzadkie warianty sekwencji w 58 znanych genach związanych z chorobami kręgu CMT. Natomiast wśród populacji tureckiej, w grupie 32 pacjentów z kliniczną diagnozą choroby CMT zidentyfikowali 2,1 dodatkowe rzadkie warianty sekwencji w genach CMT [69]. Nasze badania, po raz pierwszy na świecie, dotyczyły badania „tła genetycznego” choroby CMT wywołanej mutacjami tylko w jednym genie - *GDAP1* i potwierdziły wstępne wyniki dla całej rodziny chorób kręgu CMT przedstawionych przez Gonzagę [69]. Dlatego wnioskujemy, że na fenotyp badanych pacjentów, oprócz mutacji sprawczej w genie *GDAP1* wpływają również mutacje w innych genach, a w związku z tym występuje dziedziczenie poligenowe choroby. Jest to ważne, z punktu widzenia poradnictwa genetycznego oraz diagnostyki molekularnej i sugeruje, że należy zachować szczególną ostrożność w interpretacji wyników badań genetycznych. Głównie dotyczy to rodzin, w których obserwuje

się znaczną wewnątrzrodzinną heterogenność kliniczną choroby, a wyniki badań genetycznych wskazują na obecność wielu wariantów sekwencji w „genach CMT”.

Wydaje się, że jedną z ważniejszych dróg prowadzących do uzyskania terapii chorób kręgu CMT jest poznanie patogenezy molekularnej – odrębnej jak się przypuszcza dla każdej z odmian CMT. Pomimo ponad dwóch dekad badań nad patogenezą molekularną choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth wywołanej mutacjami w genie *GDAP1*, patomechanizm mutacji *GDAP1* wciąż pozostaje nieznan. Liczne badania nad funkcją białka GDAP1 jak dotąd nie pozwoliły na zidentyfikowanie podstawowych zaburzeń skutkujących chorobą CMT-GDAP1 [29]. Wprawdzie, wiadomo, że mutacje w genie *GDAP1* mogą być dziedziczone zarówno w sposób autosomalny dominujący i autosomalny recesywny, i w przeciwieństwie do tych pierwszych, związanych na ogół ze stosunkowo łagodną formą choroby CMT, o późnym początku, mutacje dziedziczone w sposób autosomalny recesywny powodują zwykle ciężką postać choroby o wczesnym początku, prowadzącą do niepełnosprawności ruchowej już w pierwszej lub drugiej dekadzie życia, to wciąż nie poznano podstawowej funkcji biologicznej genu *GDAP1*. W związku z tym, druga część pracy dotyczyła próby identyfikacji procesów komórkowych zaburzonych w wyniku działania mutacji genu *GDAP1*, przy użyciu modeli *in vitro* choroby CMT-GDAP1 opartego na liniach komórkowych SH-SY5Y oraz HeLa. Przeanalizowano wpływ siedmiu wybranych mutacji genu *GDAP1* na wybrane fenotypy molekularne. Wykazano, że niektóre z badanych mutacji charakteryzują się zmienionym poziomem białka GDAP1 (podwyższony lub obniżony) w komórkach w stosunku do komórek kontrolnych oraz transfekowanych wektorem niosącym dziką formę cDNA genu *GDAP1*. Co ciekawe wyraźnie zauważalny jest inny poziom białka GDAP1 w przypadku badanych mutacji, w zależności od badanej linii komórkowej. Zauważono, że mutacje dziedziczone w sposób autosomalny recesywny, obniżające poziom białka GDAP1 w komórkach HeLa, np. takie jak c.715C>T, p.Leu237Phe, wpływają na morfologię aparatu Golgiego. Wykazano również, że niektóre z analizowanych przez nas mutacji genu *GDAP1* wpływają na obniżenie żywotności transfekowanych komórek. Nie stwierdzono jednak cech apoptozy w badanych komórkach. Obserwowane zmiany w poziomie markerów apoptozy tj. białek z rodziny Bcl2 (Bcl2, Bcl-x1, Bax) oraz innych białek (cytochromu c, kaspazy-3 oraz PARP1) nie korelują z obniżoną żywotnością komórek. Sugeruje to, że obecność zmian



w poziomie tych białek, nie świadczy w tym przypadku o aktywacji szlaku apoptozy w mutantach *GDAP1*.

Wstępne doniesienia sugerowały, że ekspresja genu *GDAP1* zachodzi tylko w linii komórek nerwowych Neuro2a [51]. Późniejsze badania wykazały jednak, że ludzkie fibroblasty wykazują ekspresję mRNA dla genu *GDAP1*, jednak na bardzo niskim poziomie [61]. Niektóre z mutacji genu *GDAP1* skutkują znaczącym zmniejszeniem ekspresji mRNA *GDAP1* w fibroblastach wyizolowanych z biopsji skóry pobranej od pacjentów dotkniętych chorobą kręgu CMT [61]. Co ciekawe, ten sam efekt, to znaczy bardzo niski poziom białka GDAP1, jest obserwowany w fibroblastach pacjentów ze złożoną heterozygotą w genie *GDAP1* c.715C>T, p.Leu239Phe/ c.817C>G, p.Arg273Gly [61] oraz w komórkach HeLa transfekowanych wektorem z cDNA *GDAP1* z mutacją c.715C>T, p.Leu239Phe. Podobne efekty molekularne mutacji c.715C>T, p.Leu239Phe zaobserwowane w dwóch liniach komórkowych tj., fibroblastach pacjentów oraz komórkach HeLa, skłoniły nas do wykorzystania w badaniach tej linii komórkowej. Dodatkowo linia komórkowa HeLa jest wykorzystywana do badania wpływu mutacji genu *GDAP1* przez innych badaczy, szczególnie w przypadku badań dotyczących wpływu na komórki mutacji o dziedziczeniu recesywnym [63]. Jednakże zmieniony poziom białka GDAP1 zaobserwowano również w komórkach linii SH-SY5Y transfekowanych wektorem zawierającym analizowane allele genu *GDAP1*. W porównaniu do poziomu białka GDAP1 w komórkach transfekowanych wektorem zawierającym *GDAP1* typu dzikiego, jego poziom w komórkach transfekowanych pozostałymi wariantami genu *GDAP1* uległ znacznemu obniżeniu. Zaobserwowano różnice w poziomie białka GDAP1 w liniach komórkowych HeLa oraz SH-SY5Y po transfekcji komórek wektorem z tymi samymi wariantami genu *GDAP1*, co można wytłumaczyć tym, że są to linie komórkowe różnego pochodzenia. Komórki linii HeLa charakteryzują się bardzo niskim poziomem endogennego białka GDAP1, podczas gdy komórki SH-SY5Y wywodzące się z komórek neuroblastomy, a więc znacznie „bliższe” komórkom nerwowym, charakteryzują się wysokim endogennym poziomem tego białka [54]. Różnice pomiędzy liniami komórkowymi, szczególnie mocno zauważalne są, w przypadku transfekcji wektorem zawierającym cDNA genu *GDAP1* typu dzikiego. W komórkach HeLa wprowadzenie dodatkowych kopii genu *GDAP1* skutkowało obniżeniem poziomu białka GDAP1, natomiast przypadku komórek SH-SY5Y obserwuje się bardzo duży wzrost poziomu białka w komórce. W związku z tym,

że linia komórkowa SH-SY5Y, jako model badawczy, jest „bliższa” ludzkim komórkom nerwowym, część badań prowadzono na komórkach tej linii komórkowej. Jednak, z uwagi na to, że nie posiadaliśmy komórek SH-SY5Y pozbawionych endogennego genu *GDAP1*, do dalszych badań w tej linii komórkowej wybrano mutacje dziedziczące się w sposób autosomalny dominujący. Mutacje w przypadku, których obserwuje się obniżenie poziomu białka GDAP1 w komórkach, w zależności od rodzaju mutacji oraz sposobu dziedziczenia, mogą wykazywać podobny efekt do mutacji utraty funkcji, lub nawet mutacji typu delecji.

Dotychczas opisano, że patogeneza molekularna choroby CMT-GDAP1 jest związana z zaburzeniami w obrębie kluczowych procesów komórkowych tj., tworzenie sieci mitochondrialnej [28,65], transport mitochondrialny [55,64], czy utrzymanie homeostazy bioenergetycznej mitochondriów [95]. Niektórzy z badaczy wiążą powstawanie choroby CMT-GDAP1 z zaburzeniami homeostazy jonów wapnia [52,55,64]. Inni z kolei wskazują na zaangażowanie stresu oksydacyjnego w rozwój choroby [61].

W niniejszej pracy oprócz tego, że potwierdzono, że nadekspersja genu *GDAP1* wpływa na rozmiar i kształt mitochondriów, zgodnie z wcześniejszymi ustaleniami [28], to po raz pierwszy pokazano, że mutacje genu *GDAP1* skutkują zaburzeniami strukturalnymi i funkcjonalnymi TGN. Jakie jest więc znaczenie wpływu mutacji genu *GDAP1* na zmiany w TGN i jak do nich dochodzi? Z uwagi na fakt, że w TGN zachodzi ciągle tworzenie pęcherzyków i cystern transportujących wyselekcjonowane białka, które następnie z TGN są transporowane wzdłuż mikrotubul m.in. w kierunku obrzeża komórki, to zaobserwowane zmiany wywołane mutacjami *GDAP1* mogą też przekładać się na zmiany we wspomnianym transporcie. Może to być istotne z punktu widzenia medycznego, analogicznie do tego, co sugerują niektórzy autorzy, że defekty w transporcie pęcherzykowym oraz organelli wzdłuż mikrotubul są odpowiedzialne za powstawanie chorób neurorozwojowych i neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, czy Stwardnienie Zanikowe Boczne (ang., *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, ALS) [96]. Warto zauważyć, że z zaburzeniami w obrębie mikrotubul wiąże się patogenezę choroby kręgu CMT typu 2Z, wywołaną mutacjami w genie *MORC2* [97]. Wiadomo też, że  $\beta$ -tubulina oddziałuje z białkiem GDAP1 [55,64], dlatego mutacje genu *GDAP1*, wpływające na interakcje między  $\beta$ -tubuliną, a GDAP1, mogą w efekcie rzutować na funkcjonowanie mikrotubul,

a w konsekwencji na transport pęcherzyków i organelli, szczególnie zaś mitochondriów wzdłuż aksonów, co jest istotne dla funkcjonowania komórek nerwowych.

Prowadzone przez nas badania wykazały, że niektóre z mutacji genu *GDAP1* (p.Leu239Phe) wpływają tylko na zaburzenia w obrębie TGN, w przeciwieństwie do tego co, obserwuje się w chorobie Alzheimera, chorobie Parkinsona oraz ALS, gdzie obserwowano fragmentację wszystkich subkompartamentów aparatu Golgiego (*cis*, *medial* i *trans*). Nie ma jednak zbyt wielu doniesień literaturowych opisujących fragmentację wyłącznie subkompartamentu aparatu Golgiego, jakim jest TGN [98]. Takie zmiany pokazano w 2018 roku w modelu choroby Parkinsona wywołanej wybranymi mutacjami genu *LRRK2* - była to fragmentacja TGN, przy czym części *cis* i *medial* pozostały nienaruszone [99]. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że zaburzenia architektury TGN mogą występować również w chorobach kręgu CMT, a przynajmniej w chorobie CMT wywołanej mutacjami w genie *GDAP1*. Analiza wyników uzyskanych metodą TME wykazała, że nawet częściowe obniżenie ekspresji *GDAP1* powodowało zmiany w morfologii aparatu Golgiego, który przybierał formę cystem i pęcherzyków, lub nawet wyłącznie pęcherzyków. Takie zmiany morfologiczne świadczyć mogą o zahamowaniu transportu z TGN. Jednakże wydaje się, że na skutek niektórych mutacji w genie *GDAP1* nie dochodzi do rozpadu sieci TGN, a jedynie do wybiórczej zmiany w glikozylacji i lokalizacji białka TGN46, natomiast lokalizacja białek GM130 (*cis*), GORASP2 (*medial*) oraz B4GALT3 (TGN), nie zmienia się i jest taka sama, jak w komórkach kontrolnych. Mechanizm, w jakim białko GDAP1 wpływa na lokalizację oraz potranslacyjną modyfikację białka TGN46, nie jest znany. Nie jest jasne, dlaczego tylko niektóre mutacje genu *GDAP1* mogą wybiórczo wpływać na wybrane białka TGN takie jak TGN46, pozostając bez wpływu na inne białka np. B4GALT3 oraz czy zmiany dotyczą wyłącznie białka TGN46, czy może i innych białek aparatu Golgiego. Ze względu na fakt, że glikozylacja białek jest modyfikacją znaczącą dla oddziaływań między białkami, rozpoznawania białek przez systemy selekcji i transportu białek to zaobserwowane zmiany wzorca glikozylacji białka TGN46, są najprawdopodobniej przyczyną zmian lokalizacji tego białka w komórce. Pokazanie, że TGN46 nie funkcjonuje w komórkach mutantów *GDAP1* poprawnie może mieć istotne znaczenie. W pracy Lujan i wsp. (2022), stwierdzono, że białko TGN46 należy do rodziny białek zwanych CARTS (ang., *Carriers of the TGN to the cell Surface*) i pełni kluczową rolę w eksporcie różnych białek z TGN na powierzchnię komórki,

a więc zmiany w jego modyfikacji i lokalizacji mogą mieć fundamentalny wpływ na transport z TGN [100]. Pewne światło na mechanizm w jaki GDAP1 może wpływać na lokalizację TGN46 rzuca praca z wynikami z laboratorium prof. Methnera, która ukazała się ostatnio. W pracy tej badacze sugerują, że ważnym elementem w patogenezie choroby CMT-GDAP1 może być oddziaływanie GDAP1 z kofiliną-1, białkiem uczestniczącym w depolimeryzacji filamentów aktynowych [101]. Wykazano też, że utrata białka GDAP1 powoduje zmniejszenie ilości filamentów aktynowych w sąsiedztwie mitochondriów. Filamenty aktynowe w tej lokalizacji uczestniczą w procesie fragmentacji sieci mitochondrialnej i ich obecność warunkuje rekrutację białka DRP1 (ang., *Dynamain Related Protein 1*), które tworzy polimer zaciskający się wokół mitochondrium, co prowadzi do jego podziału. Zmniejszenie ilości DRP1 na mitochondriach negatywnie wpływa, więc na podziały sieci mitochondrialnej [101]. Co ciekawe, kofilina-1 bierze udział w sortowaniu białek w TGN, w procesie, w który zaangażowane jest białko TGN46. Wykazano, że obniżenie poziomów kofiliny-1 oraz ADF (ang. *Actin-Depolymerizing Factor*) - jednej z izoform kofiliny hamuje eksport z błon aparatu Golgiego egzogennie ekspresjonowanego rozpuszczalnego białka wydzielniczego w hodowlach tkankowych komórek *Drosophila melanogaster* i komórek ssaków. Dodatkowo analiza obrazów TEM wykazała, że po obniżeniu poziomów kofiliny-1 i ADF, obok prawidłowych cystern aparatu Golgiego doszło do nagromadzenia się dużych spuchniętych struktur błonowych, które w dalszych badaniach okazały się być TGN [102]. Jest to ważne z punktu widzenia naszych wyników, które wykazały, że nawet nieznaczne obniżenie ekspresji *GDAP1* w komórkach SH-SY5Y wywołało nieregularny kształt cystern i większą gęstość zakończeń stosów cystern aparatu Golgiego. Z powyższych badań wynika, że zarówno GDAP1, jak i kofilina-1, są zaangażowane nie tylko w utrzymanie homeostazy sieci mitochondrialnej, ale również w utrzymanie prawidłowej morfologii aparatu Golgiego. Związek pomiędzy GDAP1, TGN46 i kofiliną-1 z pewnością jest istotnym kierunkiem dalszych badań w celu określenia patogeny choroby CMT-GDAP1.

W pracy wykazano, że niektóre analizowane przez nas mutacje genu *GDAP1* wpływają na obniżenie żywotności transfekowanych komórek SH-SY5Y. Wcześniej, Noack i wsp. (2012) wykazali, że nadekspresja *GDAP1* zwiększa komórkowy poziom GSH w komórkach HT22 i stabilizuje potencjał błony mitochondrialnej przez zmniejszenie produkcji ROS [61]. W świetle tych ustaleń mutacje patogenezy genu

*GDAP1* przez obniżenie poziomu białka GDAP1 mogą skutkować wysokimi poziomami ROS i w konsekwencji wpływać na zmniejszenie żywotności komórek [61]. Ponadto inni badacze w badaniach morfologicznych i funkcjonalnych neuronów ruchowych pacjentów dotkniętych chorobą kręgu CMT zaobserwowali zmniejszenie żywotności komórek, które było związane z rozwojem stresu oksydacyjnego [103]. W związku z tymi obserwacjami wydaje się, że patogenne mutacje genu *GDAP1*, skutkujące obniżonym poziomem białka GDAP1 mogą powodować obniżenie żywotności komórek. W niniejszej pracy zaobserwowano, że ekspresja dwóch wariantów c.368A>G, p.His123Arg i c.467C>G, p.Ala156Gly, w których obserwuje się obniżenie poziomu białka GDAP1 w stosunku do komórek z nadekspresją genu *GDAP1*, spowodowała wyraźne obniżenie żywotności komórek SH-SY5Y. Co ciekawe, analiza stosunku białek proapoptotycznych do antyapoptotycznych wykazała, że w przypadku wariantów c.368A>G, p.His123Arg i c.467C>G, p.Ala156Gly, poziom białka proapoptotycznego zmniejsza się w stosunku do poziomu białek antyapoptotycznych. Świadczy to o tym, że obniżona żywotność komórek nie wynika z procesu apoptozy w tych komórkach. Inni badacze natomiast zaobserwowali, że w komórkach z mutacją c.467C>G, p.Ala156Gly proces fuzji mitochondriów jest zaburzony. Upośledzenie tego procesu skutkowało fragmentacją mitochondriów i zwiększoną wrażliwością komórek na czynniki proapoptotyczne [48]. Podobnie, jak w przypadku tych wyników, komórki SH-SY5Y transfekowane wektorami niosącymi niektóre analizowane allele *GDAP1* miały zwiększoną wrażliwość na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [81].

Pomimo tego, że w niniejszym badaniu nie zaobserwowano cech charakterystycznych dla apoptozy (fragmentacja jądra komórkowego) w komórkach SH-SY5Y z nadekspresją genu *GDAP1* oraz jego wyciszeniem, to zaobserwowano, że transfekcja komórek wektorem z wybranymi allelami genu *GDAP1* skutkuje zmianą kształtu komórek HeLa. Dodatkowo zaobserwowano korelację między poziomami białek GDAP1, Bcl2 oraz kształtem komórek. W związku z tym postanowiono sprawdzić, czy mutacje genu *GDAP1* rzeczywiście nie prowadzą do zaindukowania procesu apoptozy. Wykazano, że poziom białek antyapoptotycznych tj., Bcl2 i Bcl-xl spadł w przypadku komórek transfekowanych zmutowanymi wariantami genu *GDAP1*, co mogłoby świadczyć o zaindukowaniu procesu apoptozy w komórkach SH-SY5Y. Jednak poziom białka proapoptotycznego Bax również uległ obniżeniu. Ponadto, w komórkach transfekowanych zmutowanymi wariantami genu *GDAP1*,

nie zaobserwowano wypływu cytochromu c do cytoplazmy, a także charakterystycznego dla apoptozy cięcia białka PARP1. W związku z tym wnioskujemy, że zmiany w poziomie analizowanych białek w mutantach genu *GDAP1* nie świadczą o pobudzeniu procesu apoptozy w transfekowanych komórkach SH-SY5Y. Jednakże wcześniejsze doniesienia wskazują, że mutacje dziedziczone w sposób autosomalny dominujący w genie *GDAP1* prowadzą do rozpadu mitochondriów i uwolnienia cytochromu c do cytoplazmy [63]. Wiadomo również, że rozpad mitochondriów następuje na skutek nadekspresji genu *GDAP1* [63]. Natomiast w przypadku komórek SH-SY5Y transfekowanych wektorem zawierającym cDNA z mutacjami c.652C>G, p.Gln218Glu, c.664G>A, p.Glu222Lys, c.368A>G, p.His123Arg lub c.467C>G, p.Ala156Gly miało miejsce obniżenie poziomu białka GDAP1 w porównaniu z komórkami transfekowanymi wektorem z cDNA *GDAP1* typu dzikiego. Może to tłumaczyć brak uwalniania cytochromu c do cytoplazmy w przypadku analizowanych mutacji genu *GDAP1*. W związku z tym w analizowanych przez nas komórkach nie doszło do zaindukowania procesu apoptozy. Być może, w komórkach SH-SY5Y na skutek mutacji genu *GDAP1* ma miejsce zapobieganie dysfunkcji mitochondriów i procesu apoptozy komórek. W pracy Shinji Tagami i współautorów (2000) opisano, że translokacja Bcl2 i Bcl-xl do mitochondriów może być zaangażowana właśnie w proces zapobiegania apoptozie [104]. Również inni autorzy donoszą, że zapobieganie fragmentacji mitochondriów ma działanie ochronne przed apoptozą komórki [63]. W analizowanych przez nas komórkach SH-SY5Y transfekowanych wektorem z poszczególnymi allelami genu *GDAP1* zaobserwowaliśmy wyższy poziom białka Bcl2 we frakcji mitochondrialnej w porównaniu z poziomem białka Bcl2 we frakcji cytozolowej (dane niepokazane). W związku z tym wnioskujemy, że w komórkach SH-SY5Y nie dochodzi do zaindukowania procesu apoptozy na skutek mutacji w genie *GDAP1*, a raczej obserwujemy proces zapobiegania apoptozie, w nieznanym nam jeszcze mechanizmie obronnym komórki. Natomiast zaobserwowana korelacja między zmianą kształtu komórek HeLa, tzn., ich rozpulchnieniem i obniżeniem poziomu białka Bcl2 w tych komórkach i/ lub prawidłowym kształtem komórek i podwyższonym poziomem białka Bcl2 może wynikać z funkcji białka Bcl2 związanej z regulacją objętości komórek. W pracy Meng-Ru Shen i współautorów (2002) wykazano, że wzrost poziomu Bcl2 skutkowało zwiększeniem zdolności do regulacji zmniejszania objętości (ang., *Regulatory Volume Decrease*, RVD) komórki, w odpowiedzi na stres hipotoniczny [105]. W świetle tych ustaleń, w przypadku analizowanych mutacji *GDAP1*, wzrost poziomu białka Bcl2

w komórkach HeLa może mieć działanie ochronne przed niekorzystnym wpływem mutacji genu *GDAP1*. Obserwowane zmiany w poziomach białek antyapoptotycznych i proapoptotycznych mogą również wynikać z wpływu mutacji genu *GDAP1* na inne procesy, w których mogą brać udział białka z rodziny Bcl2. Wprawdzie białka z rodziny Bcl2 znane są głównie ze swojej roli w regulacji procesu apoptozy, to, pełnią one również role niekanoniczne. Białka z rodziny Bcl2 biorą udział m.in. w procesie autofagii, regulacji procesów bioenergetycznych oraz utrzymaniu równowagi jonów  $Ca^{2+}$  w komórce i homeostazy redoks, procesach związanych ze starzeniem komórkowym, immunomodulacji i odpowiedzi na czynniki zapalne [106]. Ponadto wykazano, że białko Bcl-xl odgrywa ważną rolę w rozwoju neuronalnym [107]. Biorąc pod uwagę ten fakt oraz to, że cDNA genu *GDAP1* zostało opisane, jako jedno z 10 ulegających zwiększonej ekspresji podczas różnicowania neuronów [51] może to stanowić ciekawy kierunek dalszych badań.

Osobnym zagadnieniem poruszonym w pracy jest problem patogenności mutacji. Jak już wcześniej wspomniano, badania NGS oferowane obecnie wielu chorym dostarczają bardzo licznych, lecz często niejednoznacznych wyników. Większość wariantów sekwencji raportowanych w bazach danych to warianty o nieznanym znaczeniu, co stwarza bardzo duże trudności w interpretacji patogenności wariantów. Przykładowo, w szeroko stosowanej bazie wariantów sekwencji ClinVar 75% raportowanych zmian to tzw. VUS. W przełożeniu na język kliniczny oznacza to, że 75% danych zgromadzonych w bazie ClinVar nie nadaje się do zastosowania w celach diagnostycznych i terapeutycznych. Z roku na rok liczba VUS przyrasta, natomiast dramatycznie obniża się procent udziału mutacji patogennych wśród wszystkich opisanych wariantów. Proponowane coraz to nowsze algorytmy bioinformatyczne służące do oceny patogenności mutacji coraz częściej dostarczają sprzecznych wyników, co sprawia, że stopniowo diagnostyka molekularna pogrąża się w chaosie. Zaprowadzenie porządku w tej swoistej „stajni Augiasza” jest możliwe i wymaga powrotu do precyzyjnego fenotypowania chorych (ang., *deep-phenotyping*) i oceny funkcjonalnej skutków mutacji. W dobie NGS wiodącym problemem jest, więc ustalenie statusu patogennego wariantu sekwencji, a nie jego zidentyfikowanie. W związku z tym problem określenia patogenności mutacji jest obecnie jednym z największych wyzwań genetyki klinicznej. Warto w tym miejscu zatrzymać się, chociażby przy mutacji c.664G>A, Glu222Lys, która jak dotąd została

zidentyfikowana wyłącznie w dwóch polskich rodzinach [108]. Mutacja c.664G>A, p.Glu222Lys w genie *GDAP1* towarzyszy bardzo łagodnemu fenotypowi choroby CMT-GDAP1. Jednak w badaniach funkcjonalnych zauważamy, że mutacja c.664G>A, p.Glu222Lys prowadzi do znacznego obniżenia poziomu białka GDAP1 w komórkach SH-SY5Y i wykazuje podobną charakterystykę do innych znanych patogennych mutacji genu *GDAP1*, co przemawia za jej patogennym charakterem. Podobnie interesujące wyniki uzyskano podczas analizowania mutacji c.652C>G, p.Gln218Glu opisanej w jednej koreańskiej rodzinie [109,110]. U pacjentów z mutacją c.652C>G, p.Gln218Glu choroba CMT-GDAP1 charakteryzuje się łagodnym przebiegiem i zaczyna się w drugiej bądź trzeciej dekadzie życia. W badaniach funkcjonalnych zauważamy jednak, że mutacja c.652C>G, p.Gln218Glu, podobnie jak w przypadku mutacji c.664G>A, p.Glu222Lys, również prowadzi do obniżenia poziomu białka GDAP1 w komórkach SH-SY5Y. Analiza żywotności komórek wykazała, że obie te mutacje powodują nieistotne statystycznie obniżenie żywotności komórek, w przeciwieństwie do mutacji c.368A>G, p.His123Arg i c.467C>G, p.Ala156Gly, które skutkują wyraźnym obniżeniem żywotności komórek. Dopiero w teście analizy wrażliwości na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zaobserwowano różnice pomiędzy mutacjami c.664G>A, p.Glu222Lys oraz c.652C>G, p.Gln218Glu. Komórki z mutacją c.664G>A, p.Glu222Lys charakteryzują się wyższą wrażliwością na ekspozycję na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w porównaniu z komórkami transfekowanymi wektorem zawierającym cDNA *GDAP1* typu dzikiego. Natomiast komórki z mutacją p.Gln218Glu są prawie niewrażliwe na ekspozycję na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [81].

Brak korelacji pomiędzy efektami mutacji genu *GDAP1* obserwowanymi w modelu linii komórkowej choroby CMT-GDAP1, a fenotypem pacjentów staje się niezwykle trudnym problemem w diagnostyce molekularnej choroby CMT-GDAP1. Dodatkową trudność obok wspomnianych wyżej stanowi brak specyficznych biomarkerów progresji choroby, co ogranicza prowadzenie badań klinicznych, a w konsekwencji uniemożliwia powstanie skutecznej terapii. Dlatego, obecne badania nad chorobami neurologicznymi koncentrują się na identyfikacji biomarkerów, które pomogą w diagnozowaniu, monitorowaniu postępu choroby i ocenie skuteczności zastosowanych środków terapeutycznych [111,112]. W związku z powyższym, w pracy postanowiliśmy wyznaczyć potencjalne biomarkery do badań klinicznych choroby CMT-GDAP1. Przykładowo takim markerem mógłby być poziom GDAP1 i korelacja jego poziomu w komórkach z nasileniem objawów choroby u pacjentów. W przypadku



innej z chorób nerwowo-mięśniowych należących do rodziny dziedzicznych dystrofii obřęczowo - kończynowych - dysferlinopatii spowodowanej mutacjami w genie *DYSF*, w której obserwuje się korelację obniżonej ekspresji dysferliny z nasileniem choroby [113], wykazano, że dysferlina ulega ekspresji w monocytach krwi obwodowej. Dzięki temu udało się opracować strategię badań przesiewowych mutacji opartą na cDNA genu *DYSF* wyizolowanym z monocytów pacjentów. Związek pomiędzy ekspresją dysferliny w mięśniach szkieletowych i monocytach krwi obwodowej pozwolił na opracowanie alternatywy dla analizy genomowego DNA w diagnostyce molekularnej dysferlinopatii [113,114]. Podobnie, w niektórych chorobach kręgu CMT obserwuje się efekt dawki genów. Przykładem może być spowodowana mutacjami w genie *IGHMBP2* choroba CMT2S, w której występuje korelacja między nasileniem choroby, a poziomem białka IGHMBP2 [31] oraz wywołana duplikacją genu *PMP22* choroba CMT1A [14].

Jak wcześniej już wspomniano, w literaturze fachowej opisano obniżenie poziomu białka GDAP1, w komórkach z mutacją c.715C>T, p.Leu239Phe genu *GDAP1* [61]. W niniejszej pracy również zaobserwowano obniżony poziom białka GDAP1 w komórkach HeLa z mutacją c.715C>T, p.Leu239Phe, a wśród badanych chorych, pacjentka R5,III:6 z tą mutacją, charakteryzuje się ciężkim przebiegiem choroby CMT-GDAP1. Wyniki te wskazują na to, że w przypadku tej mutacji ma miejsce korelacja poziomu białka z nasileniem objawów choroby. Jednakże nasze wyniki sugerują, że tylko w przypadku niektórych mutacji genu *GDAP1* poziom białka mógłby być przydatnym biomarkerem. Analiza wyników badań wykazała, że transfekcja komórek SH-SY5Y wektorem zawierającym cDNA genu *GDAP1* z mutacjami patogennymi, jest także związana ze zmniejszonym poziomem białka GDAP1 względem dzikiej formy genu *GDAP1*. W związku z tym efekt mutacji c.664G>A, p.Glu222Lys obserwowany w linii komórkowej SH-SY5Y nie koreluje z nasileniem klinicznym choroby CMT-GDAP1, gdyż spośród czterech analizowanych mutacji dziedziczonych w sposób autosomalny dominujący, obniżenie poziomu GDAP1 w komórkach transfekowanych wektorem zawierającym cDNA *GDAP1* z mutacją c.664G>A, p.Glu222Lys jest największe. Jeśli mutacja ta miałaby działać w sposób zgodny z dawką genu, to fenotyp dla tej mutacji powinien być najsilniejszy. Jednak fenotyp pacjentów z mutacją c.664G>A, p.Glu222Lys jest niezwykle łagodny. Powyższe wyniki wskazują na brak korelacji poziomu białka z nasileniem objawów choroby w niektórych mutacjach

genu *GDAP1*. W ich przypadku bardziej prawdopodobnym mechanizmem działania wydaje się zmiana funkcji białka, bądź jego efekt toksyczny.

Jednakże biorąc pod uwagę to, że mutacje genu *GDAP1* działają w różnych mechanizmach, to określenie samego poziomu białka nie wydaje się wystarczające. W związku z tym konieczne jest poznanie mechanizmów molekularnych prowadzących do wystąpienia choroby CMT-GDAP1 dla poszczególnych mutacji i dalsze poszukiwanie odpowiedniego biomarkera. Bardzo potrzebne jest opracowanie szybkiego, taniego i powtarzalnego systemu do testowania patogenności zidentyfikowanych wariantów sekwencji. Nie wiemy, czy będzie to analiza żywotności komórek, wrażliwości komórek na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, czy właśnie badanie poziomu białka. Możemy spodziewać się, że jeżeli dany wariant sekwencji nie skutkuje zmniejszeniem poziomu białka, to najprawdopodobniej jest pozbawiony patogenności. Jednakże nasze wyniki wskazują na korelację poziomu białka z nasileniem objawów choroby tylko w przypadku niektórych mutacji genu *GDAP1*. Dlatego, pomimo tego, że poziom białka mógłby wydawać się obiecującym biomarkerem choroby CMT-GDAP1, podobnie jak w przypadku dysferlinopatii [114] to jak na razie nie jest on uniwersalnym biomarkerem, który korelowałby z ciężkością przebiegu choroby CMT-GDAP1. Z drugiej strony, to, że ekspresja genu *GDAP1* nie zachodzi w limfocytach krwi obwodowej, mogłoby spowodować trudności w rutynowej diagnostyce molekularnej. Ekspresja *GDAP1* zachodzi w wielu tkankach i narządach, jednak jest on wyrażany głównie w aksonach i komórkach Schwanna, a jego najwyższa ekspresja zachodzi w mózgu [52]. W związku z tym można byłoby oceniać morfologię i stopień mielinizacji nerwów skórnych pobranych w wyniku biopsji skóry od pacjentów. Jednak trzeba zaznaczyć, że jest to badanie inwazyjne, dlatego ważne jest opracowanie nieinwazyjnego, prostego testu określającego patogenność poszczególnych wariantów.

Spośród uzyskanych wyników, odkrycie, że białko GDAP1 jest związane ze zmianami w obrębie TGN, niewątpliwie rzuca nowe światło na patogenezę choroby CMT-GDAP1. Jednak opracowany system doświadczalny nie pozwala nam na testowanie wszystkich mutacji, chociażby ze względu na dużą czaso-, praco- i kosztochłonność. Wyjściem z tej sytuacji byłoby wcześniejsze zastosowanie badań opartych na prostym modelu drożdżowym wykorzystującym analizę biochemiczną humanizowanych drożdży, który jest szybką platformą do prowadzenia badań, szczególnie w przypadku grupy chorób kręgu CMT. Organizmy jednokomórkowe,

takie jak drożdże wykorzystywane są szeroko w badaniach chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, czy choroba Parkinsona [115,116]. W ostatnich pracach Rzepnikowskiej i wsp. (2020, 2022) wykazano przydatność modelu drożdżowego, także w badaniu chorób kręgu CMT, w przypadku nie tylko genów ludzkich, które posiadają swoje geny ortologiczne np. *IGHMBP2*, ale również nieposiadających swoich odpowiedników w drożdżach np. *GDAP1* [117,118].

Wydawać by się mogło, że wyniki przedstawione w niniejszej pracy sprawiają wrażenie rozproszonych. Jednak może to wynikać z poszukiwań biomarkerów dla choroby CMT-GDAP1. Dotychczas w większości chorób kręgu CMT nie ma dostępnych biomarkerów, zarówno klinicznych, jak i elektrofizjologicznych. Ze względu na to, że wiedza na temat patogenności poszczególnych wariantów genu *GDAP1* jest nadal fragmentaryczna, a w kwestii ustalenia podstawowej funkcji białka GDAP1 panuje dużo nieścisłości, nasze poszukiwania są wielokierunkowe. Mimo to nadal brak jest odpowiedzi, jak obserwowane zmiany korelują z nasileniem choroby CMT-GDAP1. Jest to problem z punktu widzenia wprowadzenia potencjalnych celów dla przyszłej terapii eksperymentalnej. Monitorowanie terapii na poziomie komórkowym mogłoby być przydatne do określenia poprawy stanu chorego. Dlatego istotne jest znalezienie związku obserwowanych zmian z nasileniem choroby u pacjentów. Jeśli spośród naszych testów molekularnych mielibyśmy wybrać potencjalny biomarker choroby CMT-GDAP1, to byłby to poziom białka GDAP1, ale jak już wspomniano, tylko dla wybranych mutacji genu *GDAP1*. Jednak niewykluczone, że zostaną odkryte lepsze biomarkery choroby CMT-GDAP1.

Podsumowując, w pierwszej części niniejszej pracy wykazano, że obraz kliniczny pacjentów cierpiących na chorobę kręgu Charcot-Marie-Tooth wywołaną mutacjami w genie *GDAP1* najprawdopodobniej zależy zarówno od głównej mutacji sprawczej, jak i wariantów sekwencji obecnych w innych genach CMT. W drugiej części pracy wykazano, że mitochondrialne białko GDAP1, którego mutacje powodują chorobę kręgu CMT, jest związane również ze zmianami w odrębnym subkompartmencie komórkowym, jakim jest TGN. Dodatkowo wykluczono zaindukowanie procesu apoptozy w komórkach na skutek mutacji genu *GDAP1*. Jednakże zaobserwowano, że niektóre analizowane mutacje skutkują obniżoną żywotnością komórek, a także odmiennym, zależnym od mutacji wzorem ekspresji badanych białek w komórce,

co sugeruje, iż różne mutacje genu *GDAP1*, najprawdopodobniej działają za pomocą różnych mechanizmów molekularnych. Pomimo tego, że mechanizm molekularny działania mutacji genu *GDAP1* wciąż pozostaje nieznany, mamy nadzieję, że wyniki naszych badań, przynajmniej w jakimś stopniu pozwolą zidentyfikować potencjalne cele dla przyszłej terapii choroby CMT-GDAP1.

## 6. WNIOSKI

1. Końcowy obraz kliniczny pacjentów dotkniętych chorobą kręgu Charcot-Marie-Tooth wywołaną mutacjami w genie *GDAP1* zależy zarówno od „siły”, jak i „obciążenia genetycznego” wariantów sekwencji obecnych w innych „genach CMT”. Im więcej dodatkowych wariantów sekwencji w innych „genach CMT”, tym cięższy przebieg kliniczny choroby CMT-GDAP1.
2. U pacjentów z mutacjami w genie *GDAP1* dziedziczonymi w sposób autosomalny dominujący występuje średnio dwa razy więcej dodatkowych wariantów sekwencji w „genach CMT” w porównaniu z pacjentami z mutacjami dziedziczonymi autosomalnie recesywnie.
3. Wybrane mutacje genu *GDAP1* kodującego białko zaangażowane w patogenezę choroby kręgu CMT wywołują zmiany morfologiczne i funkcjonalne w obrębie części *trans* aparatu Golgiego TGN.
4. Ocena patogenności mutacji w genie *GDAP1* wymaga zindywidualizowanego podejścia. Nie istnieje pojedynczy test (eksperyment), który pozwoliłby zweryfikować patogenność dowolnego wariantu sekwencji genu *GDAP1*.

## SUPPLEMENT

Pacjenci z główną mutacją *GDAP1* c.715C>T, p.Leu239Phe

Rodzina	Pacjent	Wariant sekwencji w genie CMT		Patogenność wariantu	Liczba punktów za wariant	Suma punktów
		Nazwa genu	Pozycja w sekwencji kodującej			
R1	III:6	<i>GDAP1</i>	hz c.715C>T, p.Leu239Phe rs104894080	patogenny	2(hz)*1(AR)*3	8
		<i>RYR1</i>	htz c.1244A>C, p.Lys415Thr rs202104274	b.d.	2(AD)*1(b.d)	
R2	III:11	<i>GDAP1</i>	hz c.715C>T, p.Leu239Phe rs104894080	patogenny	2(hz)*1(AR)*3	8
		<i>MYH14</i>	htz c.6032A>Cp.Asp2011Ala rs200291489	b.d.	2(AD)*1(b.d)	
R3	IV:7	<i>GDAP1</i>	hz c.715C>T, p.Leu239Phe rs104894080	patogenny	2(hz)*1(AR)*3	9
		<i>SCN9A</i>	htz c.3217G>A,p.Asp1073Asn rs201389358	prawdopodobnie łagodny	2(AD)*1,5	
R4	III:3	<i>GDAP1</i>	hz c.715C>T, p.Leu239Phe rs104894080	patogenny	2(hz)*1(AR)*3	8
		<i>DARS1</i>	htz c.388T>G, p.Ser130Gly rs1060499772	b.d.	1(AR)*1(b.d)	
		<i>ZNF106</i>	htz c.3901A>G, p.Asn1301Asp rs148601014	b.d.	1(AR)*1(b.d)	
R5	III:6	<i>GDAP1</i>	hz c.715C>T, p.Leu239Phe rs104894080	patogenny	2(hz)*1(AR)*3	15
		<i>SCN10A</i>	htz c.41G>T, p.Arg14Leu rs141207048	prawdopodobnie łagodny	2(AD)*1,5	

		<i>GNB4</i>	htz c.645T>G, p.Asp215Glu rs755596977	o nieznanym działaniu	2(AD)*2	
		<i>TUBB3</i>	htz c.61+211T>G rs1483625306	b.d.	2(AD)*1(b.d)	

**Tabela S1.** Warianty sekwencji w genach zaangażowanych w patogenezę choroby CMT: *RYR1* (ang., *Ryanodine Receptor 1*), *MYH14* (ang., *Myosin Heavy Chain 14*), *SCN9A* (ang., *Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 9*), *DARS1* (ang., *Aspartyl-TRNA Synthetase 1*), *ZNF106* (ang., *Zinc Finger Protein 106*), *SCN10A* (ang., *Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 10*), *GNB4* (ang., *G Protein Subunit Beta 4*), *TUBB3* (ang., *Tubulin Beta 3 Class III*) u pacjentów z patogenną mutacją *GDAP1* c.715C>T, p.Leu239Phe.

*Pacjenci z główną mutacją GDAP1 c.467C>G, p.Ala156Gly*

Rodzina	Pacjent	Wariant sekwencji w genie CMT		Patogenność wariantu	Liczba punktów za wariant	Suma punktów
		Nazwa genu	Pozycja w sekwencji kodującej			
R6	II:8	<i>GDAP1</i>	htz c.467C>G, p.Ala156Gly rs397515441	patogeny	2(AD)*3	12
		<i>DCTN1</i>	htz c.598G>C, p.Glu200Gln rs563898085	b.d.	2(AD)*1(b.d)	
		<i>SACS</i>	htz c.9778G>C, p.Asp3260His rs148545339	b.d.	1(AR)*1(b.d)	
		<i>CTDP1</i>	htz c.2323G>A, p.Asp775Asn rs145870152	prawdopodobnie łagodny	1(AR)*1,5	
		<i>SBF1</i>	htz c.5630C>T, p.Pro1877Leu rs200103683	prawdopodobnie łagodny	1(AR)*1,5	
R6	III:8	<i>GDAP1</i>	htz c.467C>G, p.Ala156Gly rs397515441	patogeny	2(AD)*3	18
		<i>DCTN1</i>	htz c.598G>C, p.Glu200Gln rs563898085	b.d.	2(AD)*1(b.d)	
		<i>SACS</i>	htz c.9778G>C, p.Asp3260His	b.d.	1(AR)*1(b.d)	

			rs148545339			
		<i>CTDPI</i>	htz c.2323G>A, p.Asp775Asn rs148545339	prawdopodobnie łagodny	1(AR)*1,5	
		<i>SBF1</i>	htz c.5630C>T, p.Pro1877Leu rs200103683	prawdopodobnie łagodny	1(AR)*1,5	
		<i>ARHGEF10</i>	htz c.2063G>A, p.Ser688Asn rs143290224	nieokreślona interpretacja	2(AD)*1,5	
		<i>FBXO38</i>	htz c.2341C>T, p.Pro781Ser rs116266000	prawdopodobnie łagodny	2(AD)*1,5	
R6	III:9	<i>GDAP1</i>	htz c.467C>G, p.Ala156Gly rs397515441	patogenny	2(AD)*3	12
		<i>SACS</i>	htz c.9778G>C, p.Asp3260His rs148545339	b.d.	1(AR)*1(b.d)	
		<i>ARHGEF10</i>	htz c.2063G>A, p.Ser688Asn rs143290224	nieokreślona interpretacja	2(AD)*1,5	
		<i>MYH14</i>	htz c.3737G>A, p.Arg1246His rs368918699	b.d.	2(AD)*1(b.d)	
R7	III:12	<i>GDAP1</i>	htz c.467C>G, p.Ala156Gly rs397515441	patogenny	2(AD)*3	10
		<i>ATP7A</i>	htz c.3396G>T, p.Lys1132Asn rs782548907	b.d.	1(XR)*1(b.d)	
		<i>ARSA</i>	htz c.465+1G>A rs80338815	patogenny	1(AR)*3	

**Tabela S2.** Warianty sekwencji w genach zaangażowanych w patogenezę choroby CMT: *DCTN1* (ang., *Dynactin Subunit 1*), *SACS* (ang., *Sacsin Molecular Chaperone*), *CTDPI* (ang., *CTD Phosphatase Subunit 1*), *SBF1* (ang., *SET Binding Factor 1*), *ARHGEF10* (ang., *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 10*), *FBXO38* (ang., *F-Box Protein 38*), *MYH14* (ang., *Myosin Heavy Chain 14*), *ATP7A* (ang., *ATPase Copper Transporting Alpha*), *ARSA* (ang., *Arylsulfatase A*) u pacjentów z patogenną mutacją *GDAP1* c.467C>G, p.Ala156Gly.



Pacjenci z główną mutacją *GDAP1* c.664G>A, p.Glu222Lys

Rodzina	Pacjent	Wariant sekwencji w genie CMT		Patogenność wariantu	Liczba punktów za wariant	Suma punktów
		Nazwa genu	Pozycja w sekwencji kodującej			
R9	III:9	<i>GDAP1</i>	htz c.664G>A, p.Glu222Lys		2(AD)	5
		<i>DST</i>	htz c.2705 C>G, p.Ser902Cys rs138553142	o nieznanym działaniu	1(AR)*2	
		<i>PEX1</i>	htz c.148G>A, p.Val50Ile rs768702189	b.d.	1(AR)	
R9	III:11	<i>GDAP1</i>	htz c.664G>A, p.Glu222Lys		2(AD)	5
		<i>DST</i>	htz c.2705 C>G, p.Ser902Cys rs138553142	o nieznanym działaniu	1(AR)*2	
		<i>PEX1</i>	htz c.148G>A, p.Val50Ile rs768702189	b.d.	1(AR)	

**Tabela S3.** Warianty sekwencji w genach zaangażowanych w patogenezę choroby CMT: *DST* (ang., *Dystonin*), *PEX1* (ang., *Peroxisomal Biogenesis Factor 1*) u pacjentów z patogenną mutacją *GDAP1* c.664G>A, p.Glu222Lys.

Pacjenci z mutacją *GDAP1* c.715C>T, p.Leu239Phe oraz c.664G>A, p.Glu222Lys

Rodzina	Pacjent	Wariant sekwencji w genie CMT		Patogenność wariantu	Liczba punktów za wariant	Suma punktów
		Nazwa genu	Pozycja w sekwencji kodującej			
R8	II:4	<i>GDAP1</i>	htz c.664G>A, p.Glu222Lys		2(AD)	6,25
		<i>SPG11</i>	htz c.808G>A, p.Val270Ile rs80338868	łagodny/ prawdopodobnie łagodny	1(AR)*1,25	
		<i>PRNP</i>	htz c.654C>T p.Tyr218= rs375057882	prawdopodobnie łagodny	2(AD)*1,5	
R8	III:2	<i>GDAP1</i>	htz c.664G>A, p.Glu222Lys		2(AD)	16
		<i>GDAP1</i>	hz c.715C>T, p.Leu239Phe rs104894080	patogeny	2(hz)*1(AR)*3	
		<i>DST</i>	htz c.16495 A>T, p.Ser5499Cys rs180765536	b.d.	1(AR)*1(b.d)	
		<i>IGHMBP2</i>	htz c.256+9G>A rs118015540	łagodny	1(AR)*1	
		<i>SPG11</i>	htz c.808G>A, p.Val270Ile rs80338868	łagodny/ prawdopodobnie łagodny	1(AR)*1,25	
		<i>PRX</i>	htz c.1574T>C, p.Val525Ala rs149715830	prawdopodobnie łagodny	1(AR)*1,75	
		<i>PRNP</i>	htz c.654C>T p.Tyr218= rs375057882	prawdopodobnie łagodny	2(AD)*1,5	
R8	III:3	<i>GDAP1</i>	htz c.664G>A, p.Glu222Lys		2(AD)	10,5

		<i>GDAP1</i>	hz c.715C>T, p.Leu239Phe rs104894080	patogeny	2(hz)*1(AR)*3
		<i>DST</i>	htz c.16495 A>T, p.Ser5499Cys rs180765536	b.d.	1(AR)*1(b.d)
		<i>PRX</i>	htz c.1574T>C, p.Val525Ala rs149715830	nieokreślona interpretacja	1(AR)*1,5

**Tabela S4.** Warianty sekwencji w genach zaangażowanych w patogenezę choroby CMT: *SPG11* (ang., *Spastic Paraplegia 11*), *PRNP* (ang., *Prion Protein*), *DST* (ang., *Dystonin*), *IGHMBP2* (ang., *Immunoglobulin Mu DNA Binding Protein 2*), *PRX* (ang., *Periaxin*) u pacjentów z mutacjami *GDAP1* c.664G>A p.Glu222Lys oraz c.715C>T, p.Leu239Phe.

*Lista genów analizowanych w badaniu*

<i>AARS,</i>	<i>GDAP1,</i>	<i>PDK3,</i>	<i>VRK1,</i>
<i>ABHD12,</i>	<i>GJB1,</i>	<i>PEX1,</i>	<i>WNK1,</i>
<i>AIFM1,</i>	<i>GJB3,</i>	<i>PEX7,</i>	<i>YARS,</i>
<i>ARHGEF10,</i>	<i>GNB4,</i>	<i>PHYH,</i>	<i>MT-ATP6,</i>
<i>ARSA,</i>	<i>HADHB,</i>	<i>PLA2G6,</i>	<i>MT-ATP8,</i>
<i>ASAH,</i>	<i>HARS,</i>	<i>PLEKHG5,</i>	<i>MT-CO1,</i>
<i>ATL1,</i>	<i>HINT1,</i>	<i>PMM2,</i>	<i>MT-CO2,</i>
<i>ATL3,</i>	<i>HK1,</i>	<i>PMP22,</i>	<i>MT-CO3,</i>
<i>ATP7A,</i>	<i>HOXD10,</i>	<i>POLG,</i>	<i>MT-CYB,</i>
<i>BICD2,</i>	<i>HRNPA1</i>	<i>PRDM12,</i>	<i>MT-DLOOP,</i>
<i>BSCL2,</i>	<i>HSPB1,</i>	<i>PRNP,</i>	<i>MT-ND1,</i>
<i>C12ORF65,</i>	<i>HSPB3,</i>	<i>PRPS1,</i>	<i>MT-ND2,</i>
<i>CCT5,</i>	<i>HSPB8,</i>	<i>PRX,</i>	<i>MT-ND3,</i>
<i>CLTCL1,</i>	<i>IGHMBP2,</i>	<i>RAB7,</i>	<i>MT-ND4,</i>
<i>COX6A1,</i>	<i>IKBKAP,</i>	<i>RARS,</i>	<i>MT-ND5,</i>
<i>CTDP1,</i>	<i>INF2,</i>	<i>REEP1,</i>	<i>MT-ND6,</i>

<i>DARS,</i>	<i>IFRD1,</i>	<i>RFVT2,</i>	<i>MT-RYR1,</i>
<i>DCAF8,</i>	<i>KARS,</i>	<i>RNF170,</i>	<i>MT-RYR2,</i>
<i>DCTN1,</i>	<i>KCC3,</i>	<i>RYR1,</i>	<i>MT-TL1,</i>
<i>DHH,</i>	<i>SLC12A6,</i>	<i>SBF1,</i>	<i>MT-TM,</i>
<i>DHTKD1,</i>	<i>KIF1A/ATSV,</i>	<i>SBF2,</i>	<i>MT-TQ,</i>
<i>DNAJB2,</i>	<i>KIF1B,</i>	<i>SCN11A,</i>	<i>MT-TS1,</i>
<i>HSJ1,</i>	<i>KIF5A,</i>	<i>SCN9A,</i>	<i>MT-TS2,</i>
<i>DNAJC3,</i>	<i>LITAF,</i>	<i>SETX,</i>	<i>CARS2,</i>
<i>DNM2,</i>	<i>LMNA,</i>	<i>SH3TC2,</i>	<i>VAR2,</i>
<i>DNMT1,</i>	<i>LRSAM1,</i>	<i>SLC25A19,</i>	<i>ITPR1,</i>
<i>DRP2,</i>	<i>MARS,</i>	<i>SLC5A7,</i>	<i>ADCY6,</i>
<i>DST,</i>	<i>MED25,</i>	<i>SOX10,</i>	<i>SEPT9,</i>
<i>DYNC1H1,</i>	<i>MEN2B,</i>	<i>SPTLC1,</i>	<i>AIMP1,</i>
<i>EGR2,</i>	<i>MFN2,</i>	<i>SPTLC2,</i>	<i>DNAJB5,</i>
<i>FAM134B,</i>	<i>MORC2,</i>	<i>SPTLC3,</i>	<i>RARS2,</i>
<i>FBLN5,</i>	<i>MPZ,</i>	<i>SURF1,</i>	<i>FARSB,</i>
<i>FBXO38,</i>	<i>MTMR2,</i>	<i>TDPI,</i>	<i>NARS2,</i>
<i>FGD4,</i>	<i>MYH14,</i>	<i>TFG,</i>	<i>TARS,</i>
<i>FIG4,</i>	<i>NAGLU,</i>	<i>TRIM2,</i>	<i>PMP2,</i>
<i>FLVCRI,</i>	<i>NDRG1,</i>	<i>TRPV4,</i>	<i>HETX,</i>
<i>GALC,</i>	<i>NEFL,</i>	<i>TUBB3,</i>	<i>NOTCH3</i>
<i>GAN,</i>	<i>NGFB,</i>	<i>VABP,</i>	
<i>GARS,</i>	<i>NTRK1,</i>	<i>VCP,</i>	

**Tabela S5.** „Geny CMT” analizowane w badaniu.

## SPIS PIŚMIENICTWA

1. Skre, H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin. Genet.* **1974**, doi:10.1111/j.1399-0004.1974.tb00638.x.
2. Saporta, A.S.D.; Sottile, S.L.; Miller, L.J.; Feely, S.M.E.; Siskind, C.E.; Shy, M.E. Charcot-marie-tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann. Neurol.* **2011**, *69*, 22–33, doi:10.1002/ana.22166.
3. Barreto, L.C.L.S.; Oliveira, F.S.; Nunes, P.S.; De França Costa, I.M.P.; Garcez, C.A.; Goes, G.M.; Neves, E.L.A.; De Souza Siqueira Quintans, J.; De Souza Araújo, A.A. Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology* **2016**, *46*, 157–165, doi:10.1159/000443706.
4. Drac, H. Dziedziczne neuropatie ruchowe i czuciowo-autonomiczne. **2009**, 88–93.
5. Kochański, A.; Kabzińska, D.; Rzepnikowska, W.; Binięda, K.; Kiepusa, A. Perspektywy terapii w polineuropatiach genetycznie uwarunkowanych. *Postepy Biochem.* **2018**, *64*, 288–299, doi:10.18388/pb.2018\_142.
6. Pipis, M.; Rossor, A.M.; Laura, M.; Reilly, M.M. Next-generation sequencing in Charcot-Marie-Tooth disease: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 644–656, doi:10.1038/s41582-019-0254-5.
7. Morena, J.; Gupta, A.; Hoyle, J.C. Charcot-marie-tooth: From molecules to therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–15, doi:10.3390/ijms20143419.
8. Dyck, P.J. Lower Motor and Primary Sensory Neuron Diseases With Peroneal Muscular Atrophy. *Arch. Neurol.* **1968**, doi:10.1001/archneur.1968.00470360041003.
9. Van Paassen, B.W.; Van Der Kooi, A.J.; Van Spaendonck-Zwarts, K.Y.; Verhamme, C.; Baas, F.; De Visser, M. PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J. Rare Dis.* **2014**, *9*, 1–15, doi:10.1186/1750-1172-9-38.
10. Sancho, S.; Young, P.; Suter, U. Regulation of Schwann cell proliferation and apoptosis in PMP22-deficient mice and mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* **2001**, *124*, 2177–2187, doi:10.1093/brain/124.11.2177.

11. Li, J.; Parker, B.; Martyn, C.; Natarajan, C.; Guo, J.; Author, M.N. The PMP22 Gene and Its Related Diseases NIH Public Access Author Manuscript. *Mol Neurobiol* **2013**, *47*, 673–698, doi:10.1007/s12035-012-8370-x.The.
12. Schenone, A.; Nobbio, L.; Caponnetto, C.; Abbruzzese, M.; Mandich, P.; Bellone, E.; Ajmar, F.; Gherardi, G.; Windebank, A.J.; Mancardi, G. Correlation between PMP-22 messenger RNA expression and phenotype in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Ann. Neurol.* **1997**, *42*, 866–872, doi:10.1002/ana.410420607.
13. Leguern, E.; Tardieu, S.; Birouk, N.; Brice, A.; Patients, B.A. 17P 1 1.2. **1997**, *1*, 104–108.
14. Li, J.; Bai, Y.; Ghandour, K.; Qin, P.; Grandis, M.; Trostinskaia, A.; Ianakova, E.; Wu, X.; Schenone, A.; Vallat, J.M.; et al. Skin biopsies in myelin-related neuropathies: Bringing molecular pathology to the bedside. *Brain* **2005**, *128*, 1168–1177, doi:10.1093/brain/awh483.
15. Svaren, J.; Moran, J.J.; Wu, X.; Zuccarino, R.; Bacon, C.; Bai, Y.; Ramesh, R.; Gutmann, L.; Anderson, D.M.; Pavelec, D.; et al. Schwann cell transcript biomarkers for hereditary neuropathy skin biopsies. *Ann. Neurol.* **2019**, *85*, 887–898, doi:10.1002/ana.25480.
16. Sinkiewicz-Darol, E.; Lacerda, A.F.; Kostera-Pruszczyk, A.; Potulska-Chromik, A.; Sokołowska, B.; Kabzińska, D.; Brunetti, C.R.; Hausmanowa-Petrusewicz, I.; Kochoński, A. The LITAF/SIMPLE I92V sequence variant results in an earlier age of onset of CMT1A/HNPP diseases. *Neurogenetics* **2015**, doi:10.1007/s10048-014-0426-9.
17. Fridman, V.; Bundy, B.; Reilly, M.M.; Pareyson, D.; Bacon, C.; Burns, J.; Day, J.; Feely, S.; Finkel, R.S.; Grider, T.; et al. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: A cross-sectional analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2015**, *86*, 873–878, doi:10.1136/jnnp-2014-308826.
18. Pareyson, D.; Marchesi, C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot&#x2013;Marie&#x2013;Tooth disease. *Lancet Neurol.* **2009**, *8*, 654–

667, doi:10.1016/S1474-4422(09)70110-3.

19. Meier, C.; Dermietzel, R.; Davidson, K.G.V.; Yasumura, T.; Rash, J.E. Connexin32-Containing Gap Junctions in Schwann Cells at the Internodal Zone of Partial Myelin Compaction and in Schmidt-Lanterman Incisures. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 3186–3198, doi:10.1523/JNEUROSCI.5146-03.2004.
20. Hayasaka, K.; Himoro, M.; Sato, W.; Takada, G.; Uyemura, K.; Shimizu, N.; Bird, T.D.; Conneally, P.M.; Chance, P.F. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat. Genet.* **1993**, doi:10.1038/ng0993-31.
21. Züchner, S.; Mersiyanova, I. V.; Muglia, M.; Bissar-Tadmouri, N.; Rochelle, J.; Dadali, E.L.; Zappia, M.; Nelis, E.; Patitucci, A.; Senderek, J.; et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 449–451, doi:10.1038/ng1341.
22. Larrea, D.; Pera, M.; Gonnelli, A.; Quintana-Cabrera, R.; Akman, H.O.; Guardia-Laguarta, C.; Velasco, K.R.; Area-Gomez, E.; Dal Bello, F.; De Stefani, D.; et al. MFN2 mutations in charcot-marie-Tooth disease alter mitochondria-Associated er membrane function but do not impair bioenergetics. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 1782–1800, doi:10.1093/hmg/ddz008.
23. Natesan, V.; Kim, S.J. Lipid metabolism, disorders and therapeutic drugs – Review. *Biomol. Ther.* **2021**.
24. Lee, S.M.; Olzmann, J.A.; Chin, L.S.; Li, L. Mutations associated with Charcot-Marie-Tooth disease cause SIMPLE protein mislocalization and degradation by the proteasome and aggresome-autophagy pathways. *J. Cell Sci.* **2011**, doi:10.1242/jcs.087114.
25. Zhai, J.; Lin, H.; Julien, J.P.; Schlaepfer, W.W. Disruption of neurofilament network with aggregation of light neurofilament protein: A common pathway leading to motor neuron degeneration due to Charcot-Marie-Tooth disease-linked mutations in NFL and HSPB1. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 3103–3116, doi:10.1093/hmg/ddm272.
26. Evgrafov, O. V.; Mersiyanova, I.; Irobi, J.; Van Den Bosch, L. V.; Dierick, I;

- Leung, C.L.; Schagina, O.; Verpoorten, N.; Van Impe, K.; Fedotov, V.; et al. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat. Genet.* **2004**, doi:10.1038/ng1354.
27. Storkebaum, E. Peripheral neuropathy via mutant tRNA synthetases: Inhibition of protein translation provides a possible explanation. *BioEssays* **2016**, *38*, 818–829, doi:10.1002/bies.201600052.
28. Niemann, A.; Ruegg, M.; La Padula, V.; Schenone, A.; Suter, U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: New implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 1067–1078, doi:10.1083/jcb.200507087.
29. Rzepnikowska, W.; Kochański, A. A role for the GDAP1 gene in the molecular pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. **2018**, *78*, 1–13, doi:10.21307/ane-2018-002.
30. Pla-Martín, D.; Calpena, E.; Lupo, V.; Márquez, C.; Rivas, E.; Sivera, R.; Sevilla, T.; Palau, F.; Espinós, C. Junctophilin-1 is a modifier gene of GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, doi:10.1093/hmg/ddu440.
31. Cottenie, E.; Kochanski, A.; Jordanova, A.; Bansagi, B.; Zimon, M.; Horga, A.; Jaunmuktane, Z.; Saveri, P.; Rasic, V.M.; Baets, J.; et al. Truncating and missense mutations in IGHMBP2 cause Charcot-Marie Tooth disease type 2. *Am. J. Hum. Genet.* **2014**, *95*, 590–601, doi:10.1016/j.ajhg.2014.10.002.
32. Rzepnikowska, W.; Kochański, A. Models for IGHMBP2-associated diseases: an overview and a roadmap for the future. *Neuromuscul. Disord.* **2021**, *31*, 1266–1278, doi:10.1016/j.nmd.2021.08.001.
33. Surrey, V.; Zöllner, C.; Lork, A.A.; Moradi, M.; Balk, S.; Dombert, B.; Saal-Bauernschubert, L.; Briese, M.; Appenzeller, S.; Fischer, U.; et al. Impaired Local Translation of  $\beta$ -actin mRNA in Ighmbp2-Deficient Motoneurons: Implications for Spinal Muscular Atrophy with respiratory Distress (SMARD1). *Neuroscience* **2018**, *386*, 24–40, doi:10.1016/j.neuroscience.2018.06.019.
34. Penno, A.; Reilly, M.M.; Houlden, H.; Laurá, M.; Rentsch, K.; Niederkofler, V.; Stoeckli, E.T.; Nicholson, G.; Eichler, F.; Brown, R.H.; et al. Hereditary sensory



- neuropathy type 1 is caused by the accumulation of two neurotoxic sphingolipids. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11178–11187, doi:10.1074/jbc.M109.092973.
35. Gantner, M.L.; Eade, K.; Wallace, M.; Handzlik, M.K.; Fallon, R.; Trombley, J.; Bonelli, R.; Giles, S.; Harkins-Perry, S.; Heeren, T.F.C.; et al. Serine and Lipid Metabolism in Macular Disease and Peripheral Neuropathy. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1422–1433, doi:10.1056/nejmoa1815111.
  36. Stavrou, M.; Sargiannidou, I.; Georgiou, E.; Kagiava, A.; Kleopa, K.A. Emerging therapies for charcot-marie-tooth inherited neuropathies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22116048.
  37. Zu Horste, G.M.; Prukop, T.; Liebetanz, D.; Mobius, W.; Nave, K.A.; Sereda, M.W. Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann. Neurol.* **2007**, *61*, 61–72, doi:10.1002/ana.21026.
  38. Pareyson, D.; Reilly, M.M.; Schenone, A.; Fabrizi, G.M.; Cavallaro, T.; Manganelli, L.; Vita, G.; Quattrone, A.; Padua, L.; Gemignani, F.; et al. Ascorbic acid in charcot-marie-tooth disease type 1A (CMTTRIAAL and CMT-TRAUK): A double-blind randomised trial. *Lancet Neurol.* **2011**, *10*, 320–328, doi:10.1016/S1474-4422(11)70025-4.
  39. Kiepusa, A.J.; Kochoński, A. Charcot-marie-tooth type 1a drug therapies: Role of adenylyl cyclase activity and g-protein coupled receptors in disease pathomechanism. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. **2018**, doi:10.21307/ane-2018-018.
  40. Attarian, S.; Young, P.; Brannagan, T.H.; Adams, D.; Van Damme, P.; Thomas, F.P.; Casanovas, C.; Tard, C.; Walter, M.C.; Péréon, Y.; et al. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of PXT3003 for the treatment of Charcot–Marie–Tooth type 1A. *Orphanet J. Rare Dis.* **2021**, *16*, 1–12, doi:10.1186/s13023-021-02040-8.
  41. Boutary, S.; Caillaud, M.; El Madani, M.; Vallat, J.M.; Loisel-Duwattez, J.; Rouyer, A.; Richard, L.; Gracia, C.; Urbinati, G.; Desmaële, D.; et al. Squalenoyl siRNA PMP22 nanoparticles are effective in treating mouse models of Charcot–Marie–Tooth disease type 1 A. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 1–14, doi:10.1038/s42003-

021-01839-2.

42. Shababi, M.; Feng, Z.; Villalon, E.; Sibigtroth, C.M.; Osman, E.Y.; Miller, M.R.; Williams-Simon, P.A.; Lombardi, A.; Sass, T.H.; Atkinson, A.K.; et al. Rescue of a mouse model of spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 by AAV9-IGHMBP2 is dose dependent. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 855–866, doi:10.1038/mt.2016.33.
43. Schiza, N.; Georgiou, E.; Kagiava, A.; Médard, J.J.; Richter, J.; Tryfonos, C.; Sargiannidou, I.; Heslegrave, A.J.; Rossor, A.M.; Zetterberg, H.; et al. Gene replacement therapy in a model of Charcot-Marie-Tooth 4C neuropathy. *Brain* **2019**, *142*, 1227–1241, doi:10.1093/brain/awz064.
44. Khajavi, M.; Inoue, K.; Wiszniewski, W.; Ohyama, T.; Snipes, G.J.; Lupski, J.R. Curcumin treatment abrogates endoplasmic reticulum retention and aggregation-induced apoptosis associated with neuropathy-causing myelin protein zero-truncating mutants. *Am. J. Hum. Genet.* **2005**, *77*, 841–850, doi:10.1086/497541.
45. Garofalo, K.; Penno, A.; Schmidt, B.P.; Lee, H.J.; Frosch, M.P.; Von Eckardstein, A.; Brown, R.H.; Hornemann, T.; Eichler, F.S. Oral L-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1. *J. Clin. Invest.* **2011**, doi:10.1172/JCI57549.
46. Fridman, V.; Suriyanarayanan, S.; Novak, P.; David, W.; Macklin, E.A.; McKenna-Yasek, D.; Walsh, K.; Aziz-Bose, R.; Oaklander, A.L.; Brown, R.; et al. Randomized trial of L-serine in patients with hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1. *Neurology* **2019**, *92*, E359–E370, doi:10.1212/WNL.0000000000006811.
47. Cassereau, J.; Chevrollier, A.; Gueguen, N.; Desquiret, V.; Verny, C.; Nicolas, G.; Dubas, F.; Amati-Bonneau, P.; Reynier, P.; Bonneau, D.; et al. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Exp. Neurol.* **2011**, *227*, 31–41, doi:10.1016/j.expneurol.2010.09.006.
48. Zimoń, M.; Baets, J.; Fabrizi, G.M.; Jaakkola, E.; Kabzińska, D.; Pilch, J.;

- Schindler, A.B.; Cornblath, D.R.; Fischbeck, K.H.; Auer-Grumbach, M.; et al. Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology* **2011**, doi:10.1212/WNL.0b013e318228fc70.
49. Kabzińska, D.; Kochański, A.; Drac, H.; Rowińska-Marcińska, K.; Ryniewicz, B.; Pedrola, L.; Palau, F.; Hausmanowa-Petrusewicz, I. A novel Met116Thr mutation in the GDAP1 gene in a Polish family with the axonal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4 disease. *J. Neurol. Sci.* **2006**, doi:10.1016/j.jns.2005.10.002.
50. Kabzińska, D.; Saifi, G.M.; Drac, H.; Rowińska-Marcińska, K.; Hausmanowa-Petrusewicz, I.; Kochański, A.; Lupski, J.R. Charcot-Marie-Tooth disease type 4C4 caused by a novel Pro153Leu substitution in the GDAP1 gene. *Acta Myol.* **2007**.
51. Liu, H.; Nakagawa, T.; Kanematsu, T.; Uchida, T.; Tsuji, S. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 1781–1790, doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0721781.x.
52. González-Sánchez, P.; Satrustegui, J.; Palau, F.; Del Arco, A. Calcium deregulation and mitochondrial bioenergetics in GDAP1-related CMT disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–17, doi:10.3390/ijms20020403.
53. Ratajewski, M.; Pulaski, L. YY1-dependent transcriptional regulation of the human GDAP1 gene. *Genomics* **2009**, *94*, 407–413, doi:10.1016/j.ygeno.2009.08.014.
54. Pedrola, L.; Espert, A.; Wu, X.; Claramunt, R.; Shy, M.E.; Palau, F. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1087–1094, doi:10.1093/hmg/ddi121.
55. Pla-Martín, D.; Rueda, C.B.; Estela, A.; Sánchez-Piris, M.; González-Sánchez, P.; Traba, J.; de la Fuente, S.; Scorrano, L.; Renau-Piqueras, J.; Alvarez, J.; et al. Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca<sup>2+</sup> homeostasis by reducing store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Neurobiol. Dis.* **2013**, doi:10.1016/j.nbd.2013.03.010.

56. Fan, J.; Li, X.; Issop, L.; Culty, M.; Papadopoulos, V. ACBD2/ECI2-mediated peroxisome-mitochondria interactions in leydig cell steroid biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* **2016**, *30*, 763–782, doi:10.1210/me.2016-1008.
57. Cantarero, L.; Juárez-Escoto, E.; Civera-Tregón, A.; Rodríguez-Sanz, M.; Roldán, M.; Benítez, R.; Hoenicka, J.; Palau, F. Mitochondria-lysosome membrane contacts are defective in GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum. Mol. Genet.* **2020**, *29*, 3589–3605, doi:10.1093/hmg/ddaa243.
58. Cuesta, A.; Pedrola, L.; Sevilla, T.; García-Planells, J.; Chumillas, M.J.; Mayordomo, F.; LeGuern, E.; Marín, I.; Vilchez, J.J.; Palau, F. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 22–25, doi:10.1038/ng798.
59. Marco, A.; Cuesta, A.; Pedrola, L.; Palau, F.; Marín, I. Evolutionary and Structural Analyses of GDAP1, Involved in Charcot-Marie-Tooth Disease, Characterize a Novel Class of Glutathione Transferase-Related Genes. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21*, 176–187, doi:10.1093/molbev/msh013.
60. Shield, A.J.; Murray, T.P.; Board, P.G. Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 859–866, doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.189.
61. Noack, R.; Frede, S.; Albrecht, P.; Henke, N.; Pfeiffer, A.; Knoll, K.; Dehmel, T.; Meyer zu Hörste, G.; Stettner, M.; Kieseier, B.C.; et al. Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 150–162, doi:10.1093/hmg/ddr450.
62. Del Amo, V.L.; Seco-Cervera, M.; García-Giménez, J.L.; Whitworth, A.J.; Pallardó, F. V.; Galindo, M.I. Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of Drosophila Gdap1: Implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 21–36, doi:10.1093/hmg/ddu416.
63. Niemann, A.; Wagner, K.M.; Ruegg, M.; Suter, U. GDAP1 mutations differ in

- their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *36*, 509–520, doi:10.1016/j.nbd.2009.09.011.
64. Barneo-Muñoz, M.; Juárez, P.; Civera-Tregón, A.; Yndriago, L.; Pla-Martin, D.; Zenker, J.; Cuevas-Martín, C.; Estela, A.; Sánchez-Aragó, M.; Forteza-Vila, J.; et al. Lack of GDAP1 Induces Neuronal Calcium and Mitochondrial Defects in a Knockout Mouse Model of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, 1–27, doi:10.1371/journal.pgen.1005115.
65. Huber, N.; Guimaraes, S.; Schrader, M.; Suter, U.; Niemann, A. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 545–552, doi:10.1038/embor.2013.56.
66. Pijuan, J.; Cantarero, L.; Natera-de Benito, D.; Altimir, A.; Altisent-Huguet, A.; Díaz-Osorio, Y.; Carrera-García, L.; Expósito-Escudero, J.; Ortez, C.; Nascimento, A.; et al. Mitochondrial Dynamics and Mitochondria-Lysosome Contacts in Neurogenetic Diseases. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, doi:10.3389/fnins.2022.784880.
67. Fernandez-Lizarbe, S.; Civera-Tregón, A.; Cantarero, L.; Herrer, I.; Juárez, P.; Hoenicka, J.; Palau, F. Neuroinflammation in the pathogenesis of axonal Charcot-Marie-Tooth disease caused by lack of GDAP1. *Exp. Neurol.* **2019**, *320*, 113004, doi:10.1016/j.expneurol.2019.113004.
68. Eijkenboom, I.; Sopacua, M.; Otten, A.B.C.; Gerrits, M.M.; Hoeijmakers, J.G.J.; Waxman, S.G.; Lombardi, R.; Lauria, G.; Merkies, I.S.J.; Smeets, H.J.M.; et al. Expression of pathogenic SCN9A mutations in the zebrafish: A model to study small-fiber neuropathy. *Exp. Neurol.* **2019**, doi:10.1016/j.expneurol.2018.10.008.
69. Gonzaga-Jauregui, C.; Harel, T.; Gambin, T.; Kousi, M.; Griffin, L.B.; Francescatto, L.; Ozes, B.; Karaca, E.; Jhangiani, S.N.; Bainbridge, M.N.; et al. Exome Sequence Analysis Suggests that Genetic Burden Contributes to Phenotypic Variability and Complex Neuropathy. *Cell Rep.* **2015**, *12*, 1169–1183, doi:10.1016/j.celrep.2015.07.023.
70. Xicoy, H.; Wieringa, B.; Martens, G.J.M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's

- disease research: a systematic review. *Mol. Neurodegener.* 2017.
71. Bell, M.; Zempel, H. SH-SY5Y-derived Neurons: A Neuronal Model System for Investigating TAU Sorting Mechanisms and Neuronal Subtype-specific TAU Vulnerability. *Preprints.org* **2020**.
  72. Sivera, R.; Frassetto, M.; Lupo, V.; García-Sobrino, T.; Blanco-Arias, P.; Pardo, J.; Fernández-Torrón, R.; De Munain, A.L.; Márquez-Infante, C.; Villarreal, L.; et al. Distribution and genotype-phenotype correlation of GDAP1 mutations in Spain. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10, doi:10.1038/s41598-017-06894-6.
  73. Googins, M.R.; Woghiren-Afegbua, A.O.; Calderon, M.; St. Croix, C.M.; Kiselyov, K.I.; VanDemark, A.P. Structural and functional divergence of GDAP1 from the glutathione S-transferase superfamily. *FASEB J.* **2020**, *34*, 7192–7207, doi:10.1096/fj.202000110R.
  74. Beręsewicz, M.; Charzewski, Ł.; Krzyśko, K.A.; Kochański, A.; Zabłocka, B. Molecular modelling of mitofusin 2 for a prediction for Charcot-Marie-Tooth 2A clinical severity. *Sci. Rep.* **2018**, doi:10.1038/s41598-018-35133-9.
  75. Binięda, K.; Rzepnikowska, W.; Kolakowski, D.; Kaminska, J.; Szczepankiewicz, A.A.; Nieznańska, H.; Kochański, A.; Kabzińska, D. Mutations in gdap1 influence structure and function of the trans-golgi network. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, doi:10.3390/ijms22020914.
  76. van Galen, J.; Campelo, F.; Martínez-Alonso, E.; Scarpa, M.; Martínez-Menárguez, J.Á.; Malhotra, V. Sphingomyelin homeostasis is required to form functional enzymatic domains at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **2014**, doi:10.1083/jcb.201405009.
  77. Pedrola, L.; Espert, A.; Valdés-Sánchez, T.; Sánchez-Piris, M.; Sirkowski, E.E.; Scherer, S.S.; Fariñas, I.; Palau, F. Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 679–689, doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00158.x.
  78. Ricci, J.E.; Muñoz-Pinedo, C.; Fitzgerald, P.; Bailly-Maitre, B.; Perkins, G.A.; Yadava, N.; Scheffler, I.E.; Ellisman, M.H.; Green, D.R. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the

- p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* **2004**, doi:10.1016/j.cell.2004.05.008.
79. Ben-Hail, D.; Shoshan-Barmatz, V. VDAC1-interacting anion transport inhibitors inhibit VDAC1 oligomerization and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2016**, doi:10.1016/j.bbamcr.2016.04.002.
  80. Youle, R.J.; Strasser, A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008.
  81. Kabzińska, D.; Chabros, K.; Kamińska, J.; Andrzej, K. Cumulative Effect of Weak Sequence Variants , or Synergy of Both Factors ? *Genes (Basel)*. **2022**, *13*.
  82. Ravi, B.; Kanwar, P.; Sanyal, S.K.; Bheri, M.; Pandey, G.K. VDACs: An Outlook on Biochemical Regulation and Function in Animal and Plant Systems. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 1–15, doi:10.3389/fphys.2021.683920.
  83. Chen, M.; Wang, J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* **2002**.
  84. Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 2002.
  85. Gobeil, S.; Boucher, C.C.; Nadeau, D.; Poirier, G.G. Characterization of the necrotic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1): Implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ.* **2001**, *8*, 588–594, doi:10.1038/sj.cdd.4400851.
  86. Kostera-Pruszczyk, A.; Kosinska, J.; Pollak, A.; Stawinski, P.; Walczak, A.; Wasilewska, K.; Potulska-Chromik, A.; Szczudlik, P.; Kaminska, A.; Ploski, R. Exome sequencing reveals mutations in MFN2 and GDAP1 in severe Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2014**, doi:10.1111/jns.12088.
  87. Barreda Fierro, R.; Herrera Mora, P.; Zenteno, J.C.; Villarroel Cortés, C.E. Clinical and molecular evidence of possible digenic inheritance for MFN2/GDAP1 genes in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul. Disord.* **2020**, *30*, 986–990, doi:10.1016/j.nmd.2020.10.003.
  88. Yoshimura, A.; Yuan, J.H.; Hashiguchi, A.; Ando, M.; Higuchi, Y.; Nakamura, T.;

- Okamoto, Y.; Nakagawa, M.; Takashima, H. Genetic profile and onset features of 1005 patients with Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2019**, doi:10.1136/jnnp-2018-318839.
89. Xie, Y.; Lin, Z.; Li, X.; Liu, L.; Huang, S.; Zhao, H.; Wang, B.; Cao, W.; Hu, Z.; Guo, J.; et al. One PMP22/MPZ and Three MFN2/GDAP1 Concomitant Variants Occurred in a Cohort of 189 Chinese Charcot-Marie-Tooth Families. *Front. Neurol.* **2022**, *12*, 1–8, doi:10.3389/fneur.2021.736704.
90. Bis-Brewer, D.M.; Gan-Or, Z.; Sleiman, P.; Rodriguez, A.; Bacha, A.; Kosikowski, A.; Wood, B.; McCray, B.; Blume, B.; Siskind, C.; et al. Assessing non-Mendelian inheritance in inherited axonopathies. *Genet. Med.* **2020**, doi:10.1038/s41436-020-0924-0.
91. Cortese, A.; Wilcox, J.E.; Polke, J.M.; Poh, R.; Skorupinska, M.; Rossor, A.M.; Laura, M.; Tomaselli, P.J.; Houlden, H.; Shy, M.E.; et al. Targeted next-generation sequencing panels in the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* **2020**, doi:10.1212/WNL.00000000000008672.
92. McCormick, K.; Brock, T.; Wood, M.; Guo, L.; McBride, K.; Kim, C.; Resch, L.; Pop, S.; Bradford, C.; Kendrick, P.; et al. A Gene Replacement Humanization Platform for Rapid Functional Testing of Clinical Variants in Epilepsy-associated STXBP1. *bioRxiv* **2021**, 2021.08.13.453827.
93. Favalli, V.; Tini, G.; Bonetti, E.; Voza, G.; Guida, A.; Gandini, S.; Pelicci, P.G.; Mazarella, L. Machine learning-based reclassification of germline variants of unknown significance: The RENOVO algorithm. *Am. J. Hum. Genet.* **2021**, doi:10.1016/j.ajhg.2021.03.010.
94. Lange, K.I.; Best, S.; Tsiropoulou, S.; Berry, I.; Johnson, C.A.; Blacque, O.E. Interpreting ciliopathy-associated missense variants of uncertain significance (VUS) in *Caenorhabditis elegans*. *Hum. Mol. Genet.* **2022**, doi:10.1093/hmg/ddab344.
95. González-Sánchez, P.; Pla-Martín, D.; Martínez-Valero, P.; Rueda, C.B.; Calpena, E.; Del Arco, A.; Palau, F.; Satrústegui, J. CMT-linked loss-of-function mutations in GDAP1 impair store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-stimulated respiration. *Sci. Rep.*



- 2017**, 7, 1–12, doi:10.1038/srep42993.
96. Brunden, K.R.; Lee, V.M.Y.; Smith, A.B.; Trojanowski, J.Q.; Ballatore, C. Altered microtubule dynamics in neurodegenerative disease: Therapeutic potential of microtubule-stabilizing drugs. *Neurobiol. Dis.* **2017**, doi:10.1016/j.nbd.2016.12.021.
97. Sancho, P.; Bartesaghi, L.; Miossec, O.; García-García, F.; Ramírez-Jiménez, L.; Siddell, A.; Åkesson, E.; Hedlund, E.; Laššuthová, P.; Pascual-Pascual, S.I.; et al. Characterization of molecular mechanisms underlying the axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by MORC2 mutations. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, doi:10.1093/hmg/ddz006.
98. Martínez-Menárguez, J.Á.; Tomás, M.; Martínez-Martínez, N.; Martínez-Alonso, E. Golgi Fragmentation in Neurodegenerative Diseases: Is There a Common Cause? *Cells* **2019**, 8, 748, doi:10.3390/cells8070748.
99. Fujimoto, T.; Kuwahara, T.; Eguchi, T.; Sakurai, M.; Komori, T.; Iwatsubo, T. Parkinson's disease-associated mutant LRRK2 phosphorylates Rab7L1 and modifies trans-Golgi morphology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 495, 1708–1715, doi:10.1016/j.bbrc.2017.12.024.
100. Lujan, P.; Garcia-Cabau, C.; Wakana, Y.; Rodilla-Ramirez, C.; Malhotra, V.; Salvatella, X.; Garcia-Parajo, M.F.; Campelo, F. Sorting of secretory proteins at the trans-Golgi network by TGN46. *bioRxiv* **2022**, 2022.04.20.488883.
101. Wolf, C.; Pouya, A.; Bitar, S.; Pfeiffer, A.; Bueno, D.; Rojas-Charry, L.; Arndt, S.; Gomez-Zepeda, D.; Tenzer, S.; Bello, F.D.; et al. GDAP1 loss of function inhibits the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex by altering the actin cytoskeleton. *Commun. Biol.* **2022**, 5, 1–15, doi:10.1038/s42003-022-03487-6.
102. Von Blume, J.; Duran, J.M.; Forlanelli, E.; Alleaume, A.M.; Egorov, M.; Polishchuk, R.; Molina, H.; Malhotra, V. Actin remodeling by ADF/cofilin is required for cargo sorting at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **2009**, doi:10.1083/jcb.200908040.
103. Miressi, F.; Benslimane, N.; Favreau, F.; Rassat, M.; Richard, L.; Bourthoumieu, S.; Laroche, C.; Magy, L.; Magdelaine, C.; Sturtz, F.; et al. Gdap1 involvement in

- mitochondrial function and oxidative stress, investigated in a charcot-marie-tooth model of hipsocs-derived motor neurons. *Biomedicines* **2021**, doi:10.3390/biomedicines9080945.
104. Tagami, S.; Eguchi, Y.; Kinoshita, M.; Takeda, M.; Tsujimoto, Y. A novel protein, RTN-x(s), interacts with both Bcl-x(L) and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* **2000**, *19*, 5736–5746, doi:10.1038/sj.onc.1203948.
105. Shen, M.R.; Yang, T.P.; Tang, M.J. A novel function of BCL-2 overexpression in regulatory volume decrease. Enhancing swelling-activated Ca<sup>2+</sup> entry and Cl<sup>-</sup> channel activity. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15592–15599, doi:10.1074/jbc.M111043200.
106. Chong, S.J.F.; Marchi, S.; Petroni, G.; Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Pervaiz, S. Noncanonical Cell Fate Regulation by Bcl-2 Proteins. *Trends Cell Biol.* **2020**.
107. Bas, J.; Nguyen, T.; Gillet, G. Involvement of bcl-xl in neuronal function and development. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–11, doi:10.3390/ijms22063202.
108. Kabzińska, D.; Kotruchow, K.; Cegielska, J.; Hausmanowa-Petrusewicz, I.; Kochański, A. A severe recessive and a mild dominant form of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a newly identified Glu222Lys GDAP1 gene mutation. *Acta Biochim. Pol.* **2014**, doi:10.18388/abp.2014\_1839.
109. Chung, K.W.; Suh, B.C.; Shy, M.E.; Cho, S.Y.; Yoo, J.H.; Park, S.W.; Moon, H.; Park, K.D.; Choi, K.G.; Kim, S.; et al. Different clinical and magnetic resonance imaging features between Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and 2A. *Neuromuscul. Disord.* **2008**, doi:10.1016/j.nmd.2008.05.012.
110. Kim, H.S.; Kim, H.J.; Nam, S.H.; Kim, S.B.; Choi, Y.J.; Lee, K.S.; Chung, K.W.; Yoon, Y.C.; Choi, B.O. Clinical and neuroimaging features in charcot-marie-tooth patients with gdap1 mutations. *J. Clin. Neurol.* **2021**, doi:10.3988/jcn.2021.17.1.52.
111. Fledrich, R.; Mannil, M.; Leha, A.; Ehbrecht, C.; Solari, A.; Pelayo-Negro, A.L.; Berciano, J.; Schlotter-Weigel, B.; Schnizer, T.J.; Prukop, T.; et al. Biomarkers predict outcome in Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *J. Neurol. Neurosurg.*

*Psychiatry* **2017**, doi:10.1136/jnnp-2017-315721.

112. Millere, E.; Rots, D.; Simrén, J.; Ashton, N.J.; Kupats, E.; Micule, I.; Priedite, V.; Kurjane, N.; Blennow, K.; Gailite, L.; et al. Plasma neurofilament light chain as a potential biomarker in Charcot-Marie-Tooth disease. *Eur. J. Neurol.* **2021**, doi:10.1111/ene.14689.
113. Gallardo, E.; de Luna, N.; Diaz-Manera, J.; Rojas-García, R.; Gonzalez-Quereda, L.; Flix, B.; de Morrée, A.; van der Maarel, S.; Illa, I. Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy. *PLoS One* **2011**, doi:10.1371/journal.pone.0029061.
114. De Luna, N.; Freixas, A.; Gallano, P.; Caselles, L.; Rojas-García, R.; Paradas, C.; Nogales, G.; Dominguez-Perles, R.; Gonzalez-Quereda, L.; Vílchez, J.J.; et al. Dysferlin expression in monocytes: A source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscul. Disord.* **2007**, doi:10.1016/j.nmd.2006.09.006.
115. Franssens, V.; Bynens, T.; Van Den Brande, J.; Vandermeeren, K.; Verduyckt, M.; Winderickx, J. The benefits of humanized yeast models to study Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**.
116. Verduyckt, M.; Vignaud, H.; Bynens, T.; Van Den Brande, J.; Franssens, V.; Cullin, C.; Winderickx, J. Yeast as a model for Alzheimer's disease: Latest studies and advanced strategies. *Methods Mol. Biol.* **2016**, doi:10.1007/978-1-4939-2627-5\_11.
117. Rzepnikowska, W.; Kaminska, J.; Kabzińska, D.; Kochański, A. Pathogenic effect of GDAP1 gene mutations in a yeast model. *Genes (Basel)*. **2020**, *11*, doi:10.3390/genes11030310.
118. Rzepnikowska, W.; Kaminska, J. Validation of the Pathogenic Effect of IGHMBP2 Gene Mutations Based on Yeast *S. cerevisiae* Model. **2022**.