

Polska Akademia Nauk  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego  
Pracownia Biologii Molekularnej



**Badanie komórkowych skutków mutacji w genie mitofuzyny 2.  
Próba zaproponowania testu patogenności mutacji.**

Praca doktorska

**Maria Małgorzata Kawalec**

Promotor:

Prof. dr hab. Barbara Zabłocka

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. Małgorzata Beręsewicz

Warszawa 2016

*Dziękuję przede wszystkim Prof. dr hab. Barbarze Zabłockiej za możliwość realizacji tak interesującej pracy badawczej, za pomoc i wsparcie na każdym etapie prowadzenia badań, za zaufanie i możliwość uczenia się na błędach oraz za ciągle motywowanie do rozwijania wiedzy naukowej i umiejętności badawczych.*

*Dziękuję Prof. dr hab. Krzysztofowi Zabłockiemu oraz dr Dorocie Dymkowskiej za pomoc merytoryczną oraz czas poświęcony na wprowadzenie mnie w badania bioenergetyczne.*

*Dziękuję dr Małgorzacie Beręsewicz, dr Annie Boratyńskiej-Jasińskiej oraz dr Dagmarze Kabzińskiej za pomoc w prowadzeniu badań i przygotowaniu rozprawy oraz przemiłą atmosferę w pracy.*

*Dziękuję Mężowi za wsparcie i zrozumienie dla wybranej przeze mnie ścieżki kariery.*

*Dziękuję Rodzicom, w szczególności Mamie, za zainspirowanie do pracy naukowej oraz za pomoc, dzięki której pracę naukową mogę łączyć z macierzyństwem.*

Badania finansowano ze środków:

**Narodowego Centrum Nauki** w ramach grantu badawczego MNiSW/NCN 4746/B/P01/2011/40

**Funduszu statutowego IMDiK PAN**

**Unii Europejskiej w ramach Śródków Europejskiego Funduszu Społecznego**, poprzez udział w projekcie systemowym Samorządu Województwa Mazowieckiego pt.:

**Rozwój nauki – rozwojem regionu - stypendia i wsparcie towarzyszące dla mazowieckich doktorantów** - Priorytet VIII: Regionalne kadry gospodarki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy zostały częściowo opublikowane w postaci dwóch artykułów w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

1. **Kawalec M**, Zabłocka B, Kabzińska D, Neska J, Beręsewicz M. Mitofusin 2 expression dominates over mitofusin 1 exclusively in mouse dorsal root ganglia - a possible explanation for peripheral nervous system involvement in Charcot-Marie-Tooth 2A. *Folia Neuropathol.* 2014;52(4): 436-42.
2. **Kawalec M**, Boratyńska-Jasińska A, Beręsewicz M, Dymkowska D, Zabłocki K, Zabłocka B. Mitofusin 2 Deficiency Affects Energy Metabolism and Mitochondrial Biogenesis in MEF Cells. *PLoS One.* 2015 Jul 31;10(7); eCollection 2015.

## SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów .....	6
Streszczenie .....	8
Abstract.....	11
1. Wstęp .....	14
1.1 Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth.....	14
1.2 Choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2A.....	16
1.3 Mitofuzyna 2 .....	17
1.4 Rola fuzji mitochondriów w utrzymaniu sieci mitochondrialnej i prawidłowej ilości mitochondrialnego DNA.....	19
1.5 Udział mitofuzyny 2 w fuzji mitochondriów .....	20
1.6 Udział mitofuzyny 2 w tworzeniu połączeń pomiędzy mitochondriami a siateczką śródplazmatyczną.....	21
1.7 Wpływ mitofuzyny 2 na tempo podziału i proces różnicowania komórek – oddziaływanie z białkami Ras .....	22
1.8 Rola mitofuzyny 2 w transporcie mitochondriów .....	23
1.9 Wpływ mitofuzyny 2 na metabolizm mitochondrialny.....	23
1.10 Mutacje w genie mitofuzyny 2 .....	24
1.11 Rozważania nad terapią chorób CMT .....	25
2. Założenia i cel pracy .....	28
3. Materiały i metody .....	29
3.1 Modele badawcze .....	29
3.1.1 Mysie Embrionalne Fibroblasty.....	29
3.1.2 Myszy szczepu C57BL/6.....	34
3.2 Metody badawcze .....	35
3.2.1 Pomiar tempa wzrostu komórek .....	35
3.2.2 Oznaczenia biochemiczne.....	35
3.2.3 Obserwacja w Transmisyjnym Mikroskopie Elektronowym .....	38
3.2.4 Elektroforeza BN-PAGE. Aktywność enzymatyczna kompleksu V.....	39
3.2.5 Elektroforeza SDS-PAGE i western blot.....	40
3.2.6 Ilość mitochondrialnego DNA.....	41

---

3.2.7	Stosunek ekspresji Mfn1 i Mfn2 w tkankach myszy.....	42
3.2.8	Oznaczanie białka.....	43
3.2.9	Statystyka.....	43
4.	Wyniki.....	44
4.1	Tempo podziału komórek MEF.....	44
4.2	Charakterystyka porównawcza komórek MEF.....	45
4.2.1	Oddychanie komórkowe.....	45
4.2.2	Potencjał błonowy mitochondriów.....	47
4.2.3	Wytwarzanie reaktywnych form tlenu.....	48
4.2.4	Wytwarzanie ATP.....	49
4.2.5	Wytwarzanie mleczanu.....	51
4.2.6	Obecność glikogenu.....	51
4.2.7	Immunoreaktywność Tom20 i Hsp60.....	53
4.2.8	Immunoreaktywność Tfam.....	54
4.2.9	Ilość mitochondrialnego DNA.....	55
4.2.10	Aktywność syntazy ATP.....	56
4.2.11	Immunoreaktywność wybranych białek kompleksów oddechowych i syntazy ATP.....	56
4.3	Porównanie ekspresji mitofuzyny 1 i mitofuzyny 2.....	57
4.3.1	Analiza porównawcza ilości mRNA kodującego Mfn1 i Mfn2.....	58
4.3.2	Analiza porównawcza immunoreaktywności Mfn1 i Mfn2.....	59
4.4	Wpływ Mfn2 prawidłowej oraz z mutacją na stosunek ilości mtDNA\ndDNA.....	60
5.	Podsumowanie wyników.....	62
6.	Dyskusja.....	64
7.	Wnioski końcowe.....	77
8.	Spis piśmiennictwa.....	78

## Wykaz skrótów

ADOA	zanik nerwów wzrokowych typu Kjera, ang. autosomal dominant optic atrophy
BN-PAGE	elektroforeza natywna, ang. Blue Native - PAGE
CCCP	m-chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu
CMT	choroba Charcot-Marie-Tooth
CMT2A	choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2A
DRG	zwoje czuciowe, ang. dorsal root ganglia
EDTA	kwask wersenowy, ang. ethylenediaminetetraacetic acid
ER	siateczka śródplazmatyczna, ang. endoplasmic reticulum
FBS	płodowa surowica bydłęca, ang. fetal bovine serum
GAPDh	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDAP1	białko GDAP1, ang. Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1
HIF-1 $\alpha$	czynnik indukowany hipoksją 1 $\alpha$ , ang. Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
HR1, HR2	domena hydrofobowa mitofuzyny 2, ang. heptads repeated region
Hsp60	białko szoku cieplnego o masie 60 kDa, ang. 60 kDa heat shock protein
JC-1	sonda fluorescencyjna JC-1, ang. 5,5',6,6-tetrachloro-1,1',3,3-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
MEF	mysie embrionalne fibroblasty, ang. mouse embryonic fibroblasts
MEF <sup>wt</sup>	mysie embrionalne fibroblasty typu dzikiego
MEF <sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>	mysie embrionalne fibroblasty z delecją genu mitofuzyny 2
MEF <sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>	mysie embrionalne fibroblasty z delecją genu mitofuzyny 1 i 2
Mfn1	mitofuzyna 1
Mfn2	mitofuzyna 2
MPZ	białko MPZ, ang. Myelin protein zero
mtDNA	mitochondrialne DNA, ang. mitochondrial DNA
nDNA	jądrowe DNA, ang. nuclear DNA
OMM	zewnętrzna błona mitochondrialna, ang. outer mitochondrial membrane

---

Opa1	białko Opa1, ang. Optic atrophy 1
PBS	buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej, ang. phosphate-buffered saline
PCNA	jądrowy antygen komórek proliferujących ang. proliferating cell nuclear antigen
PFA	paraformaldehyd
PMP22	białko PMP22, ang. Peripheral myelin protein 22
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu, inhibitor proteaz, ang. phenylmethylsulfonyl fluoride
ROS	reaktywne formy tlenu, ang. reactive oxygen species
SD	odchylenie standardowe, ang. standard deviation
SDS	siarczan dodecyłu sodu
SDS-PAGE	elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS
SR-SIM	technika super-rozdzielcza w mikroskopii z zastosowaniem siatek dyfrakcyjnych, ang. superresolution structured illumination microscopy
Tfam	transkrypcyjny czynnik mitochondrialny A, ang. mitochondrial transcription factor A
TM	domena przezbłonowa, ang. transmembrane domain
Tom20	białko zewnętrznej błony mitochondrialnej o masie 20 kDa współtworzące system transportujący białka z cytoplazmy do mitochondrium, ang. mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog

W niniejszej pracy skrótem „Mfn2” posługiwano się w odniesieniu do mitofuzyny 2 u ludzi i u zwierząt.

## Streszczenie

Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT) stanowią niejednorodną grupę schorzeń obwodowego układu nerwowego. Należą do nich polineuropatie uwarunkowane genetycznie charakteryzujące się postępującym zanikiem mięśni odsiebnych kończyn dolnych i niekiedy także kończyn górnych oraz zaburzeniami czucia. Częstość występowania chorób CMT szacuje się na 1 : 2500, co czyni je najczęstszymi chorobami obwodowego układu nerwowego o charakterze wrodzonym. Ze względu na charakter patologii choroby CMT dzieli się na przypadki o przeważającym charakterze demielinizacyjnym (CMT1) oraz formy, w których przeważa uszkodzenie aksonów nerwów obwodowych (CMT2). Wśród form aksonalnych choroby CMT do najczęstszych należy choroba CMT2A związana z mutacjami w genie mitochondrialnego białka, mitofuzyny 2 (Mfn2). Pomimo rosnącej wiedzy na temat CMT2A diagnostyka chorych wciąż stanowi duże wyzwanie. Wobec występowania licznych odmian polimorficznych genu Mfn2 oraz szerokiej różnorodności fenotypowej wśród chorych, diagnostyka oparta na badaniach neurologicznych i genetycznych nie zawsze jest wystarczająca do postawienia pełnej diagnozy.

Dlatego też, w niniejszym projekcie, wychodząc na przeciw potrzebom lekarzy, jak i samych chorych, podjęto próbę znalezienia parametru, który w sposób jednoznaczny wskazywałby na patogenny charakter badanej mutacji genu Mfn2.

W tym celu zaplanowano (1) wytypowanie parametru do stworzenia testu patogenności mutacji na podstawie analizy porównawczej trzech typów komórek: z delecją genu Mfn2, z delecją genów Mfn1 i Mfn2 oraz w komórkach typu dzikiego, w których ma miejsce ekspresja obu genów mitofuzyny, (2) wybór typu komórek do badania skutków mutacji na podstawie weryfikacji hipotezy o niskiej ekspresji Mfn1 w obwodowym układzie nerwowym, według której ilość Mfn1 w nerwach obwodowych jest zbyt mała, by kompensować skutki mutacji Mfn2 oraz (3) porównanie zmian wybranego parametru w komórkach, w których prowadzona będzie nadekspresja prawidłowego genu Mfn2 oraz genu Mfn2 z mutacją sprawczą CMT2A.

Badania zaplanowano w oparciu o założenie, że nadekspresja prawidłowego genu Mfn2 przywróci wartość wybranego parametru do wartości obserwowanej w komórkach kontrolnych MEFwt. Natomiast nadekspresja genu Mfn2 z mutacją nie będzie wpływać na wybrany parametr lub wpłynie w niewielkim stopniu.



Mitofuzyna 2 jest białkiem o aktywności GTPazy, kodowanym przez genom jądrowy, ale zlokalizowanym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, gdzie, wraz z Mfn1, uczestniczy w procesie fuzji mitochondriów. Mfn2 występuje także na powierzchni siateczki śródplazmatycznej (ER), umożliwiając tworzenie połączeń pomiędzy ER a mitochondriami, przez co wpływa na szereg procesów związanych z uwalnianiem lub pobieraniem jonów wapnia. Dotychczasowe badania wykazały, że zahamowaniu ekspresji genu Mfn2 towarzyszą zaburzenia morfologii i metabolizmu mitochondriów, objawiające się m.in. obniżeniem aktywności łańcucha oddechowego oraz nagromadzeniem mutacji w mitochondrialnym DNA (mtDNA).

Biorąc pod uwagę funkcję i lokalizację Mfn2 w komórce badano możliwości i sposoby tworzenia związków wysokoenergetycznych, a także parametry związane z ilością i jakością mitochondriów. Porównanie trzech linii komórkowych mysich embrjonalnych fibroblastów, typu dzikiego, z delecją genu Mfn2 oraz Mfn1 i Mfn2 wykazało zaburzenia struktury sieci mitochondrialnej oraz zmianę charakteru metabolizmu w kierunku glikolizy beztlenowej zarówno w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, jak i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Te zmiany były zdecydowanie bardziej wyraźne w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, o czym świadczył znaczny wzrost stężenia mleczanu oraz znaczące obniżenie syntezy ATP w obecności inhibitora glikolizy beztlenowej, jodooctanu sodu.

Dodatkowo, brak Mfn2 w komórkach MEF powodował wzrost tempa ich podziału, któremu towarzyszyło nasilenie oddychania komórkowego, zwiększenie ilości zmagazynowanego glikogenu oraz ilości wybranych białek mitochondrialnych. Natomiast na skutek braku obu mitofuzyn w komórkach MEF obserwowano zmniejszoną szybkością oddychania komórkowego, obniżone tempem podziałów komórkowych, jak również obniżeniem parametrów mitochondrialnych, m.in. masy mitochondrialnej, stosunku ilości mitochondrialnego i jądrowego DNA (mtDNA/nDNA) oraz ilości kompleksów oddechowych.

Na podstawie przeprowadzonej analizy porównawczej trzech typów komórek MEF zdecydowano, że ocena stosunku ilości mtDNA/nDNA zostanie wykorzystana do dalszych badań nad patogennością mutacji Mfn2. Decyzję oparto o spostrzeżenie, że stosunek mtDNA/nDNA był znacznie obniżony w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> w odniesieniu do MEF<sup>wt</sup>, a nadekspresja prawidłowego genu Mfn2 podnosiła istotnie wartość stosunku mtDNA/nDNA. Jednocześnie wykorzystanie mtDNA do oceny patogenności mutacji Mfn2 było podyktowane próbą wyboru parametru, który można

przedstawić w bezwzględnych wartościach liczbowych, nieobarczonych subiektywną oceną badacza.

W związku z pozytywną weryfikacją hipotezy o stosunkowo niskiej ekspresji Mfn1 w nerwach obwodowych stosunek ilości mtDNA/nDNA oceniano w komórkach, w których nie dochodzi do ekspresji genu Mfn1, mianowicie MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Zarówno analiza ilości mRNA, jak i immunoreaktywności białka Mfn1 i Mfn2 w wybranych narządach myszy wykazały, że stosunek Mfn1/Mfn2 był najniższy w zwojach czuciowych, reprezentujących obwodowy układ nerwowy w stosunku do pozostałych badanych struktur układu nerwowego (kora mózgu, mózdzek, rdzeń kręgowy), jak i narządów (serce, wątroba, nerka, mięsień szkieletowy, skóra).

Stosunek ilości mtDNA/nDNA oceniano po nadekspresji prawidłowego genu Mfn2, jak i z mutacjami rozpoznanymi u polskich chorych z CMT2A. Badano wpływ trzech mutacji: c.281G>A (Arg94Gln, R94Q), c.748C>T (Arg250Trp, R250W) oraz c.1198C>T (Arg400X, R400X). Pierwsza z nich występuje najczęściej wśród niespokrewnionych chorych z CMT2A i prowadzi do rozwinięcia objawów CMT2A. Skutkiem mutacji R94Q jest zamiana aminokwasu znajdującego się na skraju domeny GTPazowej Mfn2. W wyniku mutacji R250W dochodzi do zamiany argininy w pozycji 250, w rejonie tworzącym domenę GTPazową na tryptofan. Natomiast w przypadku mutacji R400X w miejscu argininy w pozycji 400 powstaje kodon stop. Produkt genu z mutacją R400X najprawdopodobniej nie zawiera domen przezbłonowych, które kotwiczą Mfn2 w błonie mitochondrialnej oraz na powierzchni siateczki śródplazmatycznej. Pacjent, u którego stwierdzono obie mutacje R400X/R250W w konfiguracji trans rozwinął objawy choroby CMT2A.

Nadekspresja genu Mfn2 w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> zwiększała stosunek mtDNA/nDNA z  $0,43 \pm 0,11$  do  $0,74 \pm 0,04$ , podczas gdy nadekspresja Mfn2<sup>R400X</sup>, Mfn2<sup>R94Q</sup> oraz Mfn2<sup>R250W</sup> zmieniały stosunek mtDNA/nDNA odpowiednio do wartości:  $0,48 \pm 0,13$ ,  $0,64 \pm 0,11$  oraz  $0,65 \pm 0,24$ .

Ponieważ nadekspresja genu Mfn2 z mutacją w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> nie zmieniła stosunku mtDNA/nDNA (Mfn2<sup>R400X</sup>) lub nie powodowała tak istotnej zmiany stosunku mtDNA/nDNA jak nadekspresja prawidłowego genu Mfn2 (Mfn2<sup>R94Q</sup>, Mfn2<sup>R250W</sup>), wnioskuje się, że ocena stosunku mtDNA/nDNA może być wykorzystana pomocniczo do oceny patogenności mutacji w genie Mfn2, a dalsze badania nad testem patogenności mutacji w oparciu o zmiany ilości mtDNA są uzasadnione i potrzebne.

## Abstract

Charcot Marie Tooth diseases (CMT) are heterogeneous group of inherited neuropathies characterized by progressive muscle weakness and atrophy affecting especially lower limbs and distal parts of the body. CMT neuropathies occur with the prevalence of 1 in 2500 patients, which makes them the most common inherited neurological disorders. In majority CMT neuropathies are caused by nerve demyelination (CMT1), however there is also a large group of polineuropathies caused by axonal degeneration (CMT2). Among axonal types of CMT, the most common form, CMT2A, is caused by mutations in mitofusin 2 gene (Mfn2). Although there are over a hundred known pathogenic mutation in mitofusin 2 gene, genetic examination may not be sufficient for precise diagnosis. Mfn2 gene variants with unrecognized pathogenic effect are still indentified. Different time of CMT2A onset and highly polymorphic character of Mfn2 gene complicate diagnosis based on genetic and neurological examination. Therefore, finding a biochemical method to estimate potential pathogenic effect of Mfn2 mutations seems crucial for CMT2A diagnosis and prognosis.

To achieve this aim the following steps were planned: (1) selection of potential parameter for Mfn2 mutation testing on the basis of comparative characteristic of three Mouse Embryonic Fibroblasts types: wild type MEFs (wtMEFs, ATCC-CRL-2991), Mfn2-null MEFs (ATCC-CRL-2993) and Mfn1/Mfn2-null MEFs (ATCC-CRL-2994); (2) selection of cell type for Mfn2 mutation testing after comparative Mfn1/Mfn2 expression studies in particular mouse tissues and organs and (3) evaluation of chosen parameter after over-expression of wild type Mfn2 and Mfn2 with CMT2A mutations, according to the assumption that over-expression of wild type Mfn2 (wtMfn2) will restore chosen parameter while re-expression of mutated Mfn2 gene will not influence the parameter as significantly as wtMfn2.

Mfn2 is nuclear-encoded GTPase, located mainly in mitochondria and together with its analogue, Mfn1, promotes fusion of the outer mitochondrial membrane. It was shown that the disturbances in Mfn2 expression cause fragmentation of the mitochondrial network, mitochondria aggregation, as well as metabolic changes. Mfn2 is also present on the endoplasmic reticulum (ER) surface, participating in mitochondria-ER tethering, calcium release/accumulation in the ER and influencing  $Ca^{2+}$ -dependent processes. Further studies shown Mfn2 participation in mitochondrial trafficking and cell cycle.

Considering Mfn2 function and localization in the cell, cellular bioenergetics as well as mitochondrial features were investigated. It was observed that both, Mfn2 and Mfn1/2 gene knockout in MEFs causes metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. However, this phenomenon was much more significant in Mfn1/2-null MEFs, which seem to synthesize ATP almost exclusively by glycolysis. This conclusion was based on the observation of the elevated lactate synthesis and significant ATP decrease in the presence of glycolysis inhibitor, sodium iodoacetate. Moreover Mfn1/2 gene knockout inhibited MEFs proliferation and decreased cellular respiration. Mitochondrial content and the expression of characteristic mitochondrial proteins in Mfn1/2-null MEFs were also reduced, as well as mtDNA/nDNA ratio. On the other hand, Mfn2 knockout alone resulted in increased proliferation MEFs rate, which was inhibited by re-expression of wild type Mfn2. Increased Mfn2-null MEFs proliferation was accompanied by increased cellular respiration. Elevated level of particular proteins: Tom20, Tfam and selected proteins of OXPHOS complexes indicated increased mitochondrial mass and activity in this cells.

As mtDNA/nDNA ratio was significantly reduced in Mfn1/2-null MEFs in comparison to wild type MEFs and restored by over-expression of wtMfn2 up to 75% of its value in MEFwt, mtDNA/nDNA ratio was chosen for further studies on Mfn2 gene mutation character. Moreover, a method for mtDNA/nDNA ratio measurement is well-established, quantitative and reproducible.

The mtDNA/nDNA ratio was measured in Mfn1/2-null MEFs, in the absence of Mfn1, due to positive verification of the hypothesis concerning low Mfn1 gene expression in peripheral nerves. Mfn1/Mfn2 ratio was measured in particular mouse organs. Peripheral nervous system was represented by dorsal root ganglia (DRG). Both, mRNA comparative analysis as well as protein immunoreactivity confirmed that Mfn1/Mfn2 ratio was the lowest in DRGs in comparison to other nervous system samples (brain cortex, cerebellum, spinal cord) and organs (heart, liver, kidney, skeletal muscle and skin). Low Mfn1/Mfn2 ratio observed for DRG supports the assumption, that effects of Mfn2 gene mutation are more severe in absence of Mfn1 and seems to support the thesis that peripheral nerves are more sensitive to Mfn2 mutation due to the lack of Mfn1 compensatory effect.

The mtDNA/nDNA ratio was investigated in MEFs after over-expression of wt-Mfn2 gene and Mfn2 with mutations recognized in Polish families with CMT2A: c.281G>A (Arg94Gln, R94Q), c.748C>T (Arg250Trp, R250W) and c.1198C>T

(Arg400X, R400X). R94Q is one of the most common Mfn2 gene mutations observed in unrelated CMT2A patients. R94Q and R250W are point mutations located close to the GTPase domain of Mfn2 and within, respectively. The R400X mutation is also a point mutation, however it results in premature stop-codon. Therefore Mfn2<sup>R400X</sup> lacks transmembrane motifs as well as HR2 domain, which participates in mitofusins tethering during mitochondrial fusion. Polish patient carrying both mutation R250W/R400X developed CMT2A symptoms, while his parents and sibling, who carry only one mutation, have no clinical symptoms so far.

Over-expression of wtMfn2 in Mfn1/2-null MEFs restored mtDNA/nDNA ratio from  $0.43 \pm 0.11$  to  $0.74 \pm 0.04$  and this result seems to confirm presumed connexion between Mfn2 and mtDNA in the cell. While over-expression of Mfn2<sup>R94Q</sup> and Mfn2<sup>R250W</sup> increased mtDNA/nDNA ratio to  $0.64 \pm 0.11$  and  $0.65 \pm 0.24$  respectively, Mfn2<sup>R400</sup> did not changed mtDNA/nDNA ratio in Mfn1/2-null MEFs.

As over-expression of mutated Mfn2 gene in Mfn1/2-null MEFs did not influenced mtDNA/nDNA ratio (Mfn2<sup>R400X</sup>) or not as significantly as wtMfn2 (Mfn2<sup>R94Q</sup>, Mfn2<sup>R250W</sup>), mtDNA/nDNA ratio seems to be a potential supplementary parameter for Mfn2 mutation pathogenicity testing and further studies on diagnostic test based on mtDNA measurements seem reasonable.

## 1. WSTĘP

Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT) stanowią niejednorodną grupę uwarunkowanych genetycznie chorób obwodowego układu nerwowego [1]. Częstość ich występowania szacuje się na 1 : 2500, co czyni je najczęstszymi neuropatiami wrodzonymi [2]. Wyróżnia się szereg typów choroby, zbliżonych obrazem klinicznym, ale spowodowanych mutacjami w różnych genach. Choroba objawia się w dzieciństwie albo wczesnej młodości i charakteryzuje się powolnym postępującym przebiegiem. Charakterystyczne są deformacje stóp, zanik mięśni odsiebnych kończyn dolnych i kończyn górnych. Chorzy zwykle zachowują zdolność chodzenia, ale poszczególne postaci mogą mieć cięższy przebieg, powodować poważne ograniczenie sprawności ruchowej, a niekiedy także objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego [3].

Jak dotąd zidentyfikowano ponad 75 genów, których mutacje są skorelowane z rozwojem różnych form chorób CMT. W 2004 roku Züchner powiązał rozwój choroby CMT typu 2A z mutacjami w genie białka zewnętrznej błony mitochondrialnej, mitofuzyny 2 (Mfn2) [4]. Od tamtej pory nastąpił znaczny postęp wiedzy o mutacjach sprawczych CMT2A oraz funkcjach Mfn2.

Sekwencjonowanie genu Mfn2 stanowi istotny krok w diagnostyce CMT2. Jednak ze względu na polimorficzny charakter tego genu oraz z uwagi na różny czas wystąpienia pierwszych objawów polineuropatii, rozpoznanie mutacji w genie Mfn2 może nie przesądzać o diagnozie. Dlatego też na całym świecie podejmowane są badania zmierzające do poznania kolejnych mutacji sprawczych oraz poznania roli Mfn2 w rozwoju uszkodzenia aksonalnego.

### 1.1 Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth

Pierwsze przypadki choroby CMT zostały opisane w XIX wieku [5,6] przez trzech badaczy, których upamiętnia nazwa choroby: Jeana-Martina Charcot, Pierra Marie oraz Howarda Tootha. Badacze zwrócili uwagę na postępujący zanik mięśni kończyn dolnych, któremu w miarę rozwoju choroby mogło towarzyszyć także uszkodzenie mięśni rąk oraz przeważający rodzinny charakter występowania polineuropatii.

Spostrzeżenia Charcota, Marie i Tootha są do dziś aktualne. Chociaż od czasu pierwszych publikacji nastąpił znaczny postęp wiedzy, choroby kręgu CMT wciąż tworzą

niejednorodną grupę schorzeń, zarówno pod kątem podłoża genetycznego, jak i obrazu klinicznego chorych [1,7].

Cechą charakterystyczną chorób CMT jest uszkodzenie nerwów obwodowych, któremu towarzyszy zanik mięśni kończyn dolnych. Charakterystyczne są postępujące zaburzenia ruchowe chorych, które nieraz prowadzą do inwalidztwa. Czas wystąpienia pierwszych objawów, do których najczęściej należą zaburzenia równowagi, sztywność mięśni i trudności w chodzeniu, również bywa różny. Zazwyczaj jest to pierwsza lub druga dekada życia [1,8]. Zaobserwowano prawidłowość, wedle której im wcześniej wystąpią pierwsze objawy polineuropatii tym poważniejszy jest przebieg i gorsze rokowanie dla chorego [9].

Ze względu na charakter patologii choroby kręgu CMT dzieli się na przypadki o przeważającym charakterze demielinizacyjnym (CMT1) oraz formy, w których przeważa uszkodzenie aksonów nerwów obwodowych (CMT2) [8]. Podział ten nie wyklucza istnienia form pośrednich o mieszanym, demielinizacyjno-aksonalnym charakterze. Przyjmuje się, że średnio 2/3 przypadków CMT to formy demielinizacyjne [8], jednak, jak pokazują liczne badania, zróżnicowanie postaci CMT jest zależne od lokalizacji geograficznej badanej grupy chorych [1].

Dzięki postępom w zakresie technik analizy genetycznej, ze szczególnym uwzględnieniem zaawansowanych technik sekwencjonowania, możliwym było zidentyfikowanie ponad 75 genów sprawczych CMT [10]. Pośród demielinizacyjnych typów CMT do najczęstszych przyczyn zalicza się mutacje genów kodujących białka budujące otoczkę mielinową, m.in. PMP22 i MPZ, jak również czynniki transkrypcyjne regulujące procesy mielinizacji nerwów (m.in. EGR2). Z kolei pośród form aksonalnych wydają się przeważać mutacje genów kodujących białka związane z transportem wewnątrzkomórkowym i strukturą cytoszkieletu. Wśród nich można wymienić laminy, dyneiny oraz białka fuzji i podziału mitochondriów (Mfn2, GDAP1). Rozwojowi aksonalnych postaci CMT towarzyszy uszkodzenie specyficznej grupy neuronów, których aksony nierzadko przekraczają 1 metr długości. Podejrzewa się, że ta specyficzność może wynikać z zależności pomiędzy efektywnością transportu wewnątrzkomórkowego a odległością od ciała komórki nerwowej [1].

Jak podaje Azzedine i wsp. określenie podłoża genetycznego jest możliwe w przypadku 50-70% chorych, co podkreśla potrzebę poszukiwania nowych mutacji i genów zaangażowanych w rozwój poszczególnych typów CMT [1]. Co więcej, mutacje w tym samym genie mogą być przyczyną zarówno polineuropatii demielinizacyjnej, jak i

aksonalnej. Również sposób dziedziczenia poszczególnych form CMT nie wykazuje ścisłych prawidłowości. Choć dziedziczenie autosomalne dominujące wydaje się przeważać, opisywane są liczne przypadki rodzin o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym i sprzężonym z chromosomem X. Mutacje sprawcze dla CMT nie rzadko pojawiają się w sposób spontaniczny [1].

W rozpoznaniu typu polineuropatii, obok kryteriów neurologicznych i genetycznych, wykorzystywany jest pomiar szybkości przewodzenia we włóknach ruchowych i czuciowych nerwów obwodowych. Polineuropatie o charakterze demielinizacyjnym charakteryzuje znaczne obniżenie tempa przewodzenia impulsów we włóknach ruchowych nerwu pośrodkowego (poniżej 38 m/s), podczas, gdy formom aksonalnym zazwyczaj nie towarzyszą zmiany prędkości przewodzenia lub są one niewielkie [8,11]. Choć zakres przewodzenia odpowiadający poszczególnym formom CMT (szczególnie rozgraniczenie form demielinizacyjnych i pośrednich aksonalno-demielinizacyjnych) wciąż pozostaje tematem dyskusji, stanowi istotne kryterium diagnostyczne.

## 1.2 Choroba Charcot-Marie-Tooth typu 2A

W grupie wrodzonych polineuropatii o charakterze aksonalnym za najczęstszą postać uznaje się polineuropatię związaną z mutacjami w genie mitochondrialnego białka mitofuzyny 2, który zmapowano w *locus* 1p36.22. Jak dowodzą badania Züchnera i Venca oraz Verhoeven i wsp. mutacje w genie *Mfn2* są odpowiedzialne za ponad 30% przypadków aksonalnych polineuropatii CMT [4,12]. Obecnie wiadomo, że częstość występowania mutacji chorobotwórczych w genie *Mfn2* jest różna w zależności od pochodzenia grupy chorych. Badania polskiej populacji chorych, u których stwierdzono wrodzoną polineuropatię o charakterze aksonalnym wykazały, że mutacje *Mfn2* są odpowiedzialne za 4,5% przypadków, podobnie, jak u chorych pochodzenia norweskiego i rosyjskiego [13]. Pojawiło się również doniesienie, że za rozwój CMT2A może odpowiadać mutacja w genie *KIF1B*, kodującym białko z grupy kinezyn [14]. Jednak mutacje w tym genie rozpoznano jedynie u jednej japońskiej rodziny. Nie zmienia to więc faktu, że mutacje w genie *Mfn2* stanowią główną przyczynę aksonalnych form CMT, a sekwencjonowanie genu *Mfn2* stanowi ważny element diagnostyki chorych z podejrzeniem wrodzonej polineuropatii aksonalnej.



Choroba CMT2A charakteryzuje się postępującym uszkodzeniem nerwów obwodowych, zarówno czuciowych, jak i ruchowych. Spektrum objawów może być bardzo szerokie – od bardzo łagodnego osłabienia odsiebnych mięśni kończyn, aż do unieruchomienia chorych [15]. Zwykle choroba CMT2A rozpoczyna się we wczesnym dzieciństwie, ale też zanotowano przypadki zachorowania po piątej dekadzie życia. Zaburzeniom czuciowo-ruchowym towarzyszą charakterystyczne deformacje stóp, zanik mięśni kończyn dolnych oraz postępujące osłabienie ruchowe [16]. U części chorych z mutacjami w genie *Mfn2* obserwuje się również objawy piramidowe [17]. Zazwyczaj towarzyszą one przypadkom CMT2A o wczesnym pojawieniu się pierwszych objawów polineuropatii. Zaobserwowano również przypadki CMT2A, którym towarzyszył zanik nerwu wzrokowego [18,19].

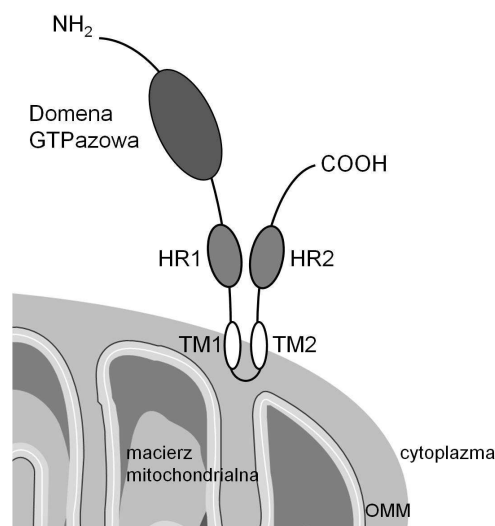
Ocena morfologiczna nerwów i mięśni chorych z CMT2A pozwoliła zaobserwować liczne zaburzenia struktury i rozmieszczenia mitochondriów. Zarówno w aksonach, jak i w mięśniach szkieletowych obserwowano obecność skupisk mitochondriów, z których wiele przejawiało nieprawidłowości w strukturze zewnętrznej błony mitochondrialnej i nie wykazywało oznak fuzji [12,19]. Obserwowano również oznaki powtarzających się procesów demielinizacji i remielinizacji nerwów obwodowych [12].

### 1.3 Mitofuzyna 2

Mitofuzyna 2 jest białkiem o aktywności GTPazy. U człowieka składa się z 757 aminokwasów budujących funkcjonalne domeny (Ryc. 1). Mitofuzyna 2 jest zakotwiczona w zewnętrznej błonie mitochondrialnej domeną przezbłonową złożoną z dwóch fragmentów: TM1 i TM2 [20]. Oba końce mitofuzyny 2, karboksylowy i aminowy, skierowane są do cytoplazmy. Domena o aktywności GTPazy znajduje się na końcu aminowym. Na obydwu końcach białka występują domeny superhelikalne CC1 i CC2 (ang. *coiled-coil regions*), zawierające powtórzenia 7 hydrofobowych aminokwasów, nazywane również domenami HR1 i HR2 (ang. *heptad repeats*) [21]. Domeny te odgrywają kluczową rolę w fuzji błon sąsiednich mitochondriów, umożliwiając tworzenie homo- i heterodimerów pomiędzy mitofuzynami [22,23], jak również umożliwiając ich oddziaływanie z innymi białkami, m.in. Opa-1 [24]. Szczególne znaczenie dla homeostazy wapniowej w komórce wykazuje obszar mitofuzyny 2 oddziałujący z białkami Ras. Jest on

konieczny m.in. do oddziaływań mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną (ER) oraz warunkuje prawidłową morfologię ER [25].

Domena GTPazowa ludzkiej mitofuzyny 2 jest współtworzona przez 250 aminokwasów w obszarze 93 - 342, natomiast aminokwasy w obszarze 391 - 434 oraz 695 - 738 tworzą domeny HR1 oraz HR2 (na podstawie danych z bazy UniProt, z datą ostatniej aktualizacji dn. 11.11.2015).



**Ryc. 1. Schemat budowy mitofuzyny 2**

Mitofuzyna 2 jest białkiem zlokalizowanym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (OMM; ang. *outer mitochondrial membrane*), w której jest zakotwiczona za pomocą domeny przezbłonowej złożonej z dwóch fragmentów TM; (ang. *transmembrane domain*). Oba końce białka, aminokwasowy i karboksylowy, zwrócone są do cytoplazmy. Szczególne znaczenie dla aktywności fuzyjnej białka ma domena o aktywności GTPazy. Zaznaczono także domeny superhelikalne o powtarzających się sekwencjach aminokwasów o charakterze hydrofobowym (HR1, HR2; ang. *heptads repeated region*), które najprawdopodobniej odpowiadają za tworzenie dimerów pomiędzy mitofuzynami.

Do stworzenia ryciny wykorzystano element Servier Medical Art.

Przewiduje się, że na skutek różnego składania mRNA Mfn2, u ludzi może również występować izoforma 2 białka Mfn2, złożona z 436 aminokwasów. Jedną z głównych różnic pomiędzy izoformami jest brak pierwszych 302 aminokwasów.

U ssaków, w tym także u człowieka, występują dwa białka mitofuzyny, Mfn1 i Mfn2, wykazujące znaczny stopień podobieństwa budowy i funkcji [24]. Gen Mfn1 znajduje się na chromosomie trzecim w pozycji 3q25-q26, a pomiędzy białkiem Mfn1 i Mfn2 występuje ok. 60% homologii. Obie mitofuzyny uczestniczą w procesie fuzji mitochondriów, poprzez tworzenie homo- i heterodimerów na powierzchni sąsiadujących

mitochondriów. Jednak wiele badań *in vitro* dowodzi, że Mfn2 pełni też inne funkcje niezwiązane bezpośrednio z jej aktywnością fuzyjną, których nie wykazano dla Mfn1, co szerzej przedstawiono w kolejnych podrozdziałach.

#### **1.4 Rola fuzji mitochondriów w utrzymaniu sieci mitochondrialnej i prawidłowej ilości mitochondrialnego DNA**

Mitochondria w komórce tworzą funkcjonalną i dynamiczną sieć, zależną od względnych szybkości procesów ich fuzji i podziału [26]. O kluczowym znaczeniu procesu fuzji mitochondriów dla komórki świadczy fakt, że zaburzenie proporcji pomiędzy fuzją a podziałami mitochondriów prowadzi do fragmentacji sieci mitochondrialnej [22,26,27]. Z kolei fragmentacji sieci towarzyszą liczne zaburzenia metaboliczne [28-31], jak opisano w podrozdziale 1.9.

Proces fuzji mitochondriów wydaje się przeciwdziałać nagromadzeniu mutacji w mitochondrialnym DNA (mtDNA) oraz jego degradacji [15]. Podczas fuzji i podziału mitochondriów możliwe jest przekazywanie mitochondrialnego DNA pomiędzy mitochondriami, dzięki czemu dopiero znaczny stopień uszkodzenia mtDNA lub jego znaczny ubytek (60-90%) wpływa na metabolizm mitochondriów [32,33].

Mitochondrialne DNA stanowi stosunkowo niewielki kolisty fragment DNA zlokalizowany w macierzy mitochondrialnej. Pojedyncza cząsteczka mtDNA u ludzi składa się z 16569 par zasad, kodujących 37 genów, spośród których 13 odpowiada za biosyntezę białek wchodzących w skład kompleksów łańcucha oddechowego i syntazy ATP.

Zwiększenie liczby kopii mtDNA towarzyszy procesowi biogenezy mitochondriów i jest regulowane przez wiele czynników. Jednym z głównych białek zaangażowanych w regulację liczby kopii mtDNA jest kinaza AMPK (ang. AMP-activated kinase) [34]. Aktywność kinazy AMPK zmienia się w odpowiedzi na stan energetyczny komórki i za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego PGC-1 $\alpha$ , może pośrednio regulować ekspresję mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A (Tfam) [34]. Z kolei Tfam oddziałuje bezpośrednio z DNA mitochondrialnym oraz odpowiada za rozpoczęcie replikacji i transkrypcji genomu mitochondrialnego [35]. Wykazano bezpośredni związek pomiędzy Tfam a zwiększeniem ilości mtDNA w komórce, choć mechanizm tej zależności nie został w pełni poznany [36].

W badaniach *in vitro* wykazano, że nieprawidłowe procesy fuzji mitochondriów, związane z brakiem prawidłowej Mfn1 i/lub Mfn2 sprzyjają nagromadzeniu mutacji w mtDNA [15], a w badaniach na fibroblastach pacjentów z CMT2A wykazano dodatkowo obniżenie efektywności naprawy mtDNA [19]. W badaniach na fibroblastach pacjentów CMT2A zaobserwowano również związek pomiędzy zaburzeniami potencjału błonowego mitochondriów a obniżoną ilością mtDNA [37].

Oprócz Mfn2 w rozwój neuropatii wrodzonych zaangażowanych jest wiele innych genów kodujących białka fuzyjne. Mutacje w genie GDAP1, kodującym białko, które pośrednio uczestniczy w procesie podziału mitochondriów [38], są częstą przyczyną aksonalnych postaci CMT. Natomiast mutacje w genie OPA-1, kodującym białko fuzji wewnętrznej błony mitochondrialnej, są przyczyną wrodzonej neuropatii wzrokowej typu Kjera (ADOA) [39]. Postępujące uszkodzenie nerwu wzrokowego towarzyszy także przypadkom CMT2A [18,19], co dodatkowo wydaje się podkreślać rolę współdziałania białek fuzyjnych oraz zależność komórek nerwowych od prawidłowej dynamiki sieci mitochondrialnej.

Przyczyna specyficzności występowania objawów ze strony obwodowego układu nerwowego w związku z zaburzeniami fuzji nie została dotąd poznana. Przypuszcza się, że może wynikać ze stosunkowo niskiej ekspresji Mfn1 w nerwach obwodowych i nerwie wzrokowym, przez co są one bardziej narażone na skutki mutacji białek fuzyjnych [19,27].

## 1.5 Udział mitofuzyny 2 w fuzji mitochondriów

Podstawową funkcją Mfn2 jest udział w procesie fuzji mitochondriów. Na zjawisko fuzji mitochondriów składają się dwa procesy: fuzja wewnętrznej błony mitochondrialnej, w której uczestniczy białko Opa1, oraz fuzja błony zewnętrznej, w której pośredniczą Mfn1 i Mfn2. W procesie tym mitofuzyny obecne na powierzchni sąsiadujących mitochondriów tworzą homo- i heterodimery. Oddziaływania pomiędzy mitofuzynami mają charakter hydrofobowy i, jak wspomiano w podrozdziale 1.3, za ich wystąpienie odpowiadają domeny HR. Jednocześnie, aktywność GTPazowa mitofuzyny jest niezbędna do fuzji zewnętrznej błony mitochondrialnej [20,40].

Mfn1 wykazuje większą aktywność hydrolizy GTP niż Mfn2, a co za tym idzie, większą aktywność w procesie fuzji mitochondriów [41]. O większej aktywności fuzyjnej Mfn1 świadczy również fakt, że zmutowana Mfn2 może pośredniczyć w fuzji mitochondriów poprzez oddziaływanie z prawidłową Mfn1, ale nie Mfn2 [27].

Mitofuzyna 1 oddziałuje także z białkiem Opa1 odpowiedzialnym za fuzję wewnętrznej błony mitochondrialnej, uczestnicząc tym samym w koordynacji fuzji obu błon mitochondrialnych. Oddziaływanie Mfn1 z Opa1 jest konieczne zarówno do utrzymania prawidłowego kształtu mitochondriów, jak i tworzenia prawidłowej sieci mitochondrialnej [42]. Co więcej, wykazano, że zaburzenia fuzji i metabolizmu mitochondriów towarzyszące zahamowaniu ekspresji Opa1, jak i obu mitofuzyn jednocześnie [42] są bardzo zbliżone, co potwierdza rolę współdziałania tych białek.

## **1.6 Udział mitofuzyny 2 w tworzeniu połączeń pomiędzy mitochondriami a siateczką śródplazmatyczną**

Zjawisko tworzenia dimerów przez mitofuzyny ma również znaczenie dla współwystępowania i oddziaływania mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną. Wykazano, że na powierzchni siateczki śródplazmatycznej występuje jedynie Mfn2 [43]. Dlatego też Mfn2 ma większy udział w tym procesie niż Mfn1.

Mfn2 wydaje się niezbędna zarówno dla zachowania prawidłowej morfologii siateczki śródplazmatycznej, jak i jej umiejscowienia względem mitochondriów [25]. Zaobserwowano, że brak Mfn2 objawia się zaburzeniami struktury ER (agregaty i skupiska) oraz znacznym obniżeniem efektywności pobierania jonów wapnia przez mitochondria w odpowiedzi na aktywację receptora inozytolo-1,4,5-trisfosforanu w siateczce śródplazmatycznej [25]. Mutacje w genie Mfn2 prowadzą do zmiany odległości pomiędzy błonami ER i błonami mitochondriów [44], co może skutkować przedłużeniem czasu trwania lokalnego sygnału wapniowego w komórce [43].

W komórkach wątroby i mięśni szkieletowych o obniżonej ekspresji Mfn2 dochodzi do dysfunkcji mitochondriów, wzrostu stężenia  $H_2O_2$ , zaburzenia homeostazy wapniowej, co prowadzi do rozwoju stresu siateczkowego oraz aktywacji kinazy JNK [31]. Zaobserwowano również zależność pomiędzy obniżoną ekspresją genu Mfn2 w mięśniach szkieletowych a insulinoopornością [45]. Podejrzewa się, że zaburzenie kontaktu siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów może być przyczyną apoptozy, zaburzać syntezę lipidów, przekazywanie synaptyczne i inne procesy zależne od jonów wapnia [31,46]. Przytoczone prace wskazują na bardzo złożone relacje pomiędzy mitochondriami a ER w zachowaniu homeostazy wapniowej. Co więcej, wykazano, że obszar Mfn2 oddziałujący z białkami Ras jest niezbędny, aby Mfn2 mogła pośredniczyć w tworzeniu połączeń pomiędzy mitochondriami a ER [25].

## 1.7 Wpływ mitofuzyny 2 na tempo podziału i proces różnicowania komórek – oddziaływanie z białkami Ras

Obecność obszaru oddziałującego z białkami Ras w strukturze Mfn2 wskazuje na udział tego białka w szlakach sygnałowych związanych z cyklem komórkowym, co potwierdzają badania *in vitro* i *in vivo*. U szczurów szczepu SHR (ang. *spontaneously hypertensive rat*) zaobserwowano, że rozrostowi mięśni gładkich naczyń krwionośnych towarzyszyła zmniejszona ekspresja mitofuzyny 2. Pierwotnie, gen mitofuzyny 2 badany był w kontekście patologii nadciśnienia tętniczego i znany był pod nazwą HSG (ang. *hyperplasia suppressor gene*) [47]. Wykazano hamujący wpływ Mfn2 na podział komórek mięśni gładkich. Obniżoną ekspresję Mfn2 opisano także w mięśniach szkieletowych i w wątrobie w cukrzycy [45,48].

Antyproliferacyjne działanie mitofuzyny 2 odbywa się poprzez hamowanie szlaku kinaz ERK/MAPK i może być niezależne od aktywności fuzyjnej tego białka [47]. Co więcej, za oddziaływanie ze szlakiem kinaz odpowiada zarówno koniec aminowy, jak i karboksylowy mitofuzyny 2, z tym, że w różnym mechanizmie. Koniec aminowy mitofuzyny 2 może oddziaływać z białkiem Raf-1 i efekt ten wydaje się niezależny od lokalizacji białka w komórce. Natomiast koniec karboksylowy może zmieniać aktywność szlaku ERK/MAPK poprzez oddziaływanie z białkiem Ras [49].

Wykazano, że oddziaływanie Mfn2 z białkiem Ras odgrywa znaczącą rolę w miogenezie zależnej od insuliny. Na skutek aktywacji kinazy PI3-K dochodzi do wzmożonej aktywności mitochondriów i nasilenia ich fuzji. Insulina wydaje się stymulować ekspresję Mfn2, która poprzez związanie z białkiem Ras hamuje szlak sygnałowy zależny od kinazy MEK, co skutkuje zahamowaniem podziału mioblastów i ich ukierunkowaniem na różnicowanie [50].

Zmiany ekspresji Mfn2 towarzyszą także rozrostowi nowotworów. W 2010 roku wykazano, metodą analizy informatycznej sekwencji genu i białka popartej badaniami *in vitro* i *in vivo*, że białko p53 może oddziaływać na promotor genu mitofuzyny 2, wpływając na jego ekspresję [51]. W ostatnich latach zaobserwowano, że w komórkach nowotworowych ekspresja genu Mfn2 jest obniżona [52]. Przywrócenie ekspresji genu Mfn2 hamowało wzrost guzów w hodowlach *in vitro* [53] oraz w badaniach *in vivo* u myszy [54].

Badania ostatnich lat wykazały również udział mitofuzyny w procesie różnicowania komórek macierzystych. Wykazano, że zahamowanie ekspresji obu

mitofuzyn powoduje odróżnicowanie komórek somatycznych poprzez oddziaływanie ze szlakiem p53-p51. Zahamowaniu ekspresji obu mitofuzyn towarzyszy zmiana metabolizmu energetycznego komórki z oksydacyjnej fosforylacji na glikolityczny, co odbywa się za pośrednictwem zmian aktywności szlaku Ras-Raf oraz z udziałem czynnika HIF-1 $\alpha$  [55].

## 1.8 Rola mitofuzyny 2 w transporcie mitochondriów

Wykazano, że Mfn2 umożliwia kotwiczenie mitochondriów do komórkowego systemu transportującego opartego na białkach motoryczno-ruchowych: kinezyne i dyneinie. Zjawisko transportu mitochondriów wzdłuż neurofilamentów odbywa się poprzez oddziaływanie mitofuzyny z kompleksem białek Miro i Milton [56]. Wydaje się, że obie mitofuzyny mogą oddziaływać z białkami transportującymi, jednak w neuronach wykazano, że zaburzenia ekspresji Mfn2 w większym stopniu upośledzały ruchliwość mitochondriów. Podejrzewa się, że mniejsza rola Mfn1 w transporcie mitochondriów w aksonach może wynikać z jej stosunkowo niskiej ekspresji w nerwach obwodowych [27,56].

Zaburzenia transportu mitochondriów wykazano także *in vitro* w hodowli neuronów czuciowych obwodowego układu nerwowego, w których wywołano nadekspresję Mfn2 z mutacją sprawczą CMT2A [57]. Obserwowano obniżenie ruchliwości mitochondriów, ich agregację oraz zaburzenia w rozlokowaniu, zarówno w ciele komórki nerwowej, jak i w aksonie [57]. Nierównomierne rozmieszczenie mitochondriów obserwowano także w biopsjach nerwów chorych z CMT2A. Skupiska mitochondriów obserwowano we wszystkich obszarach komórek nerwowych, z tym, że najsilniej były one zaznaczone w miejscach tworzenia połączeń nerwowych [12].

## 1.9 Wpływ mitofuzyny 2 na metabolizm mitochondrialny

Pomimo dużej homologii w budowie pomiędzy Mfn1 i Mfn2, wykazano, że Mfn2 może pełnić dodatkowe funkcje, nie związane z jej funkcją fuzyjną [58].

Związek pomiędzy Mfn2 a metabolizmem zaproponował po raz pierwszy Zorzano w kontekście badań nad cukrzycą [28]. Obniżenie ekspresji Mfn2 opisano zarówno u otyłych szczurów, jak i u chorych z cukrzycą typu II. Zmianom ekspresji prawidłowej Mfn2 towarzyszyły liczne zaburzenia metaboliczne objawiające się m. in. zaburzeniem utleniania kwasów tłuszczowych oraz zmianami aktywności glukoneogenezy [31].

W komórkach, w których ekspresja Mfn2 była zahamowana obserwowano obniżenie wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz aktywności cyklu Krebsa, dodatkowo obserwowano zmniejszenie utleniania glukozy oraz wykorzystania tlenu [30]. W komórkach mięśni szkieletowych stan ten sprzyjał nasileniu beztlenowej glikolizy w odpowiedzi na energetyczne zapotrzebowanie komórki oraz znacznie upośledzał tworzenie glikogenu, co potęgowało beztlenowy charakter metabolizmu komórki w odpowiedzi na obniżone zużycie tlenu, wywołane brakiem Mfn2 [28].

Mitofuzyna 2 jest ważnym białkiem w procesach bioenergetycznych, o czym świadczy jej udział w tworzeniu prawidłowej sieci mitochondrialnej oraz pośredniczenie w oddziaływaniu mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną. Mfn2 może również wpływać na procesy bioenergetyczne niezależnie od udziału w fuzji mitochondriów, m.in. poprzez wpływ na ekspresję genów kodujących w genomie jądrowym białka łańcucha oddechowego [30]. Szczegółowe badania wykazały związek Mfn2 z ekspresją podjednostek łańcucha oddechowego. W badaniach *in vitro* wykazano, że brak Mfn2 znacząco obniża syntezę kodowanych jądrowo białek podjednostek kompleksów I, II, III i V, natomiast jej nadekspresja skutkuje zwiększoną syntezą białek kompleksu I, IV i V, pozostając bez wpływu na kompleks II i III [30]. Mechanizm tej zależności nie został dotąd poznany.

W badaniach na fibroblastach chorych z CMT2A również obserwowano zaburzenia aktywności kompleksów oddechowych oraz wynikające z tego zmiany potencjału błonowego mitochondriów [37]. Ponadto wiele badań potwierdza, że wpływ Mfn2 na metabolizm może być niezwiązany z jej aktywnością fuzyjną [30,59]. Wykazano to m. in. w badaniach z udziałem zmodyfikowanej Mfn2, pozbawionej domen kotwiczących to białko w błonie mitochondrium. Mitofuzyna 2 pozbawiona domeny przezbłonowej nie może pośredniczyć w fuzji mitochondriów, jednak wykazano związek pomiędzy ekspresją zmodyfikowanej mitofuzyny 2 a nasileniem metabolizmu komórkowego [59].

## 1.10 Mutacje w genie mitofuzyny 2

Gen Mfn2 u człowieka zmapowano w genomie jądrowym, na krótkim ramieniu chromosomu pierwszej pary (w pozycji 1p36.22). Zawiera on 19 obszarów kodujących (eksonów), których sekwencja nukleotydowa jest zachowana ewolucyjnie.

Mitofuzyna 2, wraz ze swoim analogiem, mitofuzyną 1, stanowią odpowiednik (ortolog) białka Fzo1 (ang. *Fuzzy Onion Protein*) drożdży oraz białka Fzo muszki



owocówki *Drosophila melanogaster* [20]. Stwierdzono także wysoki stopień podobieństwa genu Mfn2 u ludzi i gryzoni, wynoszący odpowiednio 95% w odniesieniu do genu Mfn2 szczura [28] oraz 90% w odniesieniu do genu Mfn2 myszy [4].

Dotychczas zidentyfikowano ponad 100 mutacji w genie Mfn2 o prawdopodobnym charakterze patogennym [60]. Większość z nich jest mutacjami punktowymi zmiany sensu, prowadzącymi do zamiany jednego z aminokwasów budujących białko Mfn2. Zdecydowana większość mutacji w genie Mfn2 lokalizuje się w domenie hydrolizującej GTP [24]. Najczęściej spotykaną mutacją wśród niespokrewnionych pacjentów z CMT2A jest mutacja 94-ego kodonu, czyli argininy. Kodon ten znajduje się na skraju domeny GTP-azowej, w regionie ewolucyjnie zachowanym.

Mutacje w genie Mfn2 są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący. Jednak w ostatnich latach opisano pojedyncze niespokrewnione rodziny, w których dziedziczenie mutacji Mfn2 odbywa się w sposób recesywny lub o domniemanym recesywnym charakterze [61].

Jak dotąd nie udało się stwierdzić prawidłowości pomiędzy rodzajem i miejscem wystąpienia mutacji a nasileniem objawów choroby CMT2A. Zaobserwowano, że formy CMT2A, w których na skutek mutacji w genie Mfn2 dochodzi także do uszkodzenia nerwu wzrokowego charakteryzuje cięższy przebieg [18]. Z kolei u wszystkich rodzin, u których zaobserwowano recesywny sposób dziedziczenia mutacji Mfn2, zaobserwowano wczesne pojawienie się pierwszych symptomów choroby [61].

Z uwagi na brak prawidłowości pomiędzy typem mutacji a obrazem klinicznym nie można wykluczyć, że do uszkodzenia aksonalnego towarzyszącego chorobie CMT2A przyczyniają się różne zjawiska, wynikające zarówno z zaburzenia sieci mitochondrialnej, metabolizmu mitochondriów, jak i ich transportu wzdłuż aksonów. Niemniej jednak, specyficzność objawów ograniczona do nerwów obwodowych skłania do poszukiwań wspólnego mechanizmu uszkodzenia.

## 1.11 Rozważania nad terapią chorób CMT

Z uwagi na brak dostatecznej wiedzy o mechanizmie uszkodzenia aksonalnego związanego z mutacjami Mfn2 jak dotąd nie zaproponowano skutecznej terapii choroby CMT2A. Opieka nad chorymi obejmuje łagodzenie objawów polineuropatii poprzez leczenie farmakologiczne, chirurgiczne oraz zajęcia rehabilitacyjne.

Postuluje się, że korzystnym działaniem terapeutycznym byłoby zwiększenie ekspresji genu *Mfn1* w nerwach obwodowych [56,62]. Rozważane są również terapie oparte na suplementacji chorych wysokimi dawkami witamin i substancji z grupy antyoksydantów. Dotychczas nie udało się potwierdzić skuteczności tego typu działań u ludzi [63].

Pozytywny efekt kliniczny u chorych z demielinizacyjną postacią polineuropatii (CMT1A) zaobserwowano w przypadku terapii neurotrofiną-3 (NT-3). Neurotrofiny pełnią rolę czynników wzrostu w procesach dojrzewania i różnicowania neuronów zarówno w centralnym jak i obwodowym układzie nerwowym. Skuteczność podawania neurotrofiny-3 na łagodzenie objawów potwierdzono w badaniach klinicznych z udziałem niewielkiej (10-osobowej) grupy chorych [64,65].

Z kolei w kontekście terapii aksonalnych form CMT badano zastosowanie inhibitorów deacetylazy histonowej-6 (HDAC6). Wykazano ich korzystny wpływ na transport aksonalny u myszy transgenicznych z mutacją w genie *HSPB1* [66]. Mutacje w genie *HSPB* stanowią przyczynę wybranych aksonalnych typów CMT. Ponieważ zaburzenia transportu wzdłuż aksonów nerwów obwodowych mogą przyczyniać się do rozwoju choroby CMT2A, zastosowanie inhibitorów HDAC6 może stanowić potencjalną ścieżkę terapeutyczną w tym schorzeniu [67].

Prowadzone są również badania nad farmakologiczną regeneracją nerwów ruchowych. Rozważa się wykorzystanie m.in. czynników wzrostu oraz cytokin [68]. Istotnym zagadnieniem związanym z bezpieczeństwem i skutecznością tego typu terapii jest właściwe ukierunkowanie wzrostu nerwów i właściwe uporządkowanie nowopowstałych połączeń nerwowych, co stanowi przedmiot badań w wielu ośrodkach. Nadekspresję genów związanych z regeneracją aksonów wykazano u chorych CMT2 [69], co wydaje się uzasadniać prowadzenie badań w tym kierunku.

W kilku krajach prowadzona jest strategia wykluczenia chorób mitochondrialnych poprzez wykorzystanie tzw. diagnostyki preimplantacyjnej. W myśl tej strategii, jądro komórkowe osoby chorej lub obciążonej ryzykiem choroby mitochondrialnej wprowadzane jest do oocyta zdrowego dawcy. Dzięki temu możliwe jest wyeliminowanie mitochondriów obciążonych mutacją w DNA mitochondrialnym. Strategia okazała się skuteczna w leczeniu wielu chorób wynikających z mutacji w genomie mitochondrialnym, m.in. w neuropatii Lebera [70]. Choć podejmowane są próby zastosowania tej metody także w kontekście chorób CMT, należy pamiętać, że gen mitofuzyny 2 zlokalizowany jest

w genomie jądrowym i zastosowanie tej metody w terapii CMT2A może wymagać bardziej złożonego podejścia.

Jak dotąd, choroba CMT2A jest nieuleczalna. Dlatego też prowadzone są liczne badania zmierzające ku poznaniu mechanizmu uszkodzenia aksonalnego, w celu zaproponowania ewentualnej terapii, jak i udoskonalenia dostępnych metod diagnostycznych.

## 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Pomimo ustalonego związku pomiędzy występowaniem mutacji w genie *Mfn2* a rozwojem choroby CMT2A, sekwencjonowanie tego genu może nie przesądzić o diagnozie. Występowanie licznych zmian o charakterze polimorficznym w genie *Mfn2* oraz identyfikowanie nowych wariantów genu o nieznanym charakterze znacznie utrudniają diagnostykę chorych z podejrzeniem CMT2A. Dlatego też, po konsultacji i we współpracy z zespołem lekarzy neurologów i genetyków, podjęto próbę stworzenia testu patogenności mutacji w genie *Mfn2* w oparciu o śledzenie funkcjonalnych skutków mutacji na poziomie komórkowym.

W tym celu zaplanowano:

- i. wytypowanie parametru do stworzenia testu patogenności mutacji na podstawie analizy porównawczej trzech typów komórek: z delecją genu *Mfn2*, z delecją genów *Mfn1* i *Mfn2* oraz w komórkach typu dzikiego, w których ma miejsce ekspresja obu genów mitofuzyny;
- ii. wybór typu komórek do badania skutków mutacji na podstawie weryfikacji hipotezy o niskiej ekspresji *Mfn1* w obwodowym układzie nerwowym;
- iii. porównanie zmian wybranego parametru w komórkach, w których prowadzona będzie nadekspresja prawidłowego genu *Mfn2* oraz genu *Mfn2* z mutacją sprawczą CMT2A.

Badania zaplanowano w oparciu o założenie, że nadekspresja prawidłowego genu *Mfn2* przywróci wartość wybranego parametru do wartości obserwowanej w komórkach kontrolnych MEFwt. Natomiast nadekspresja genu *Mfn2* z mutacją nie będzie wpływać na wybrany parametr lub wpłynie w niewielkim stopniu. Pozytywna weryfikacja hipotezy o niskiej ekspresji genu *Mfn1* w nerwach obwodowych byłaby wskazaniem do badania skutków mutacji w nieobecności białka *Mfn1*.

Realizowany projekt zaplanowano w celu uzupełnienia dostępnych metod diagnostycznych. Jednocześnie przeprowadzone badania stanowiły część większego projektu badawczego zaplanowanego w celu charakterystyki populacji polskich chorych z CMT2A. Dlatego też, badano skutki trzech mutacji rozpoznanych u polskich chorych.

### 3. MATERIAŁY I METODY

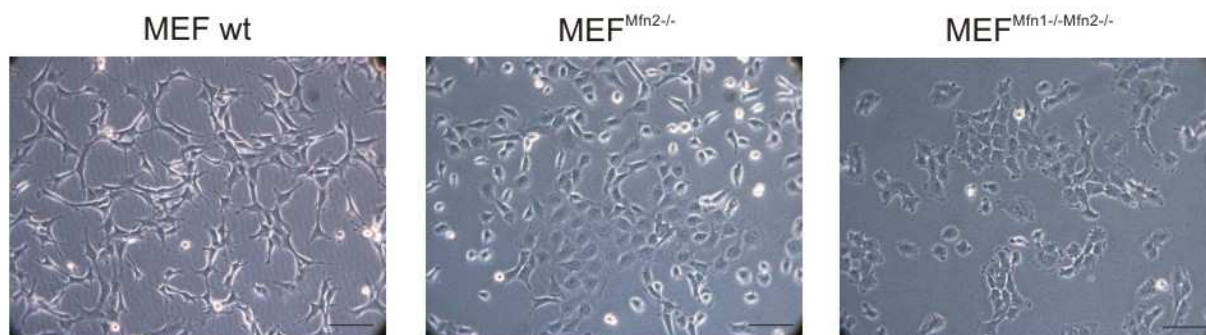
#### 3.1 Modele badawcze

##### 3.1.1 Mysie Embrionalne Fibroblasty

Badania mające na celu wybór parametru do testu patogenności mutacji *Mfn2* prowadzono z wykorzystaniem trzech typów mysich embrionalnych fibroblastów (MEF, Ryc. 2):

MEF <sup>wt</sup>	(ATCC-CRL-2991)
MEF <sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>	(ATCC-CRL-2993)
MEF <sup>Mfn1<sup>-/-</sup>-Mfn2<sup>-/-</sup></sup>	(ATCC-CRL-2994)

Komórki pochodziły ze zbiorów ATCC i zostały zakupione za pośrednictwem firmy LGS Standards.



**Ryc. 2.** Mysie embrionalne fibroblasty w hodowli *in vitro*

Przykładowe zdjęcia hodowli *in vitro* mysich embrionalnych fibroblastów typu dzikiego (MEF<sup>wt</sup>), z delecją genu mitofuzyny 2 (MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>) oraz delecją genów mitofuzyny 1 i 2 (MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>-Mfn2<sup>-/-</sup></sup>), wykonane w świetle przechodzącym z wykorzystaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego. Komórki hodowano w pożywce DMEM wzbogaconej 10% płodową surowicą bydlęcą i mieszaniną antybiotyków, w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> o wilgotności 95%. Skala: 100 µm.

##### 3.1.1.1 Hodowla komórek MEF

Mysie embrionalne fibroblasty hodowano w buforze DMEM (high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i antybiotyku (100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny), w 5% CO<sub>2</sub> w temperaturze 37°C.

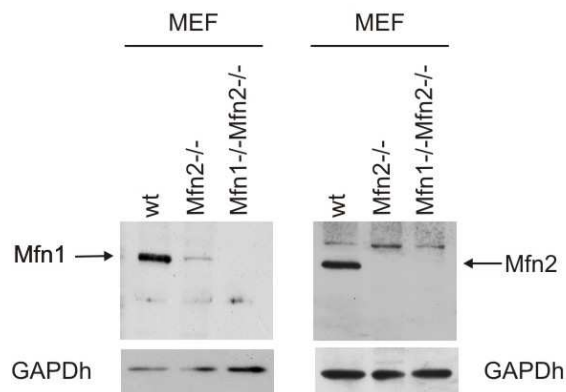
Komórki pasażowano co 3-4 dni. W tym celu usuwano pożywkę hodowlaną, komórki przepłukiwano roztworem PBS i inkubowano w 0,25% roztworze trypsyny w buforze HBSS z dodatkiem 0,53 mM EDTA. Po 3-4 min. dodawano pożywkę hodowlaną

w celu zatrzymania działania trypsyny. Zawiesinę komórek zbierano i wirowano z prędkością 125 x g przez 5 min. Nadsącz usuwano, komórki zawieszano w pożywce hodowlanej i wysiewano do dalszej hodowli. Odsetek komórek uszkodzonych oceniano po inkubacji z błękitem trypanu.

Do doświadczeń wykorzystywano komórki, które nie przekroczyły ósmego pasażu.

### 3.1.1.2 Charakterystyka komórek MEF

Komórki MEF stanowią unieśmiertelnioną linię otrzymaną metodami opisanymi przez Chen H. i wsp. [22]. Pochodzą z 10,5 dniowych mysich zarodków niemodyfikowanych genetycznie (MEFwt), z delecją genu *Mfn2* (MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>) oraz *Mfn1* i *Mfn2* (MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>). Brak *Mfn2* w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz obu mitofuzyn w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> potwierdzono wykonując analizę western blot ekstraktów komórkowych otrzymanych z trzech linii MEF rozdzielonych w żelu metodą elektroforezy SDS-PAGE (Ryc. 3). Komórki MEFwt stanowiły pozytywną kontrolę dla przeciwciała anty-*Mfn1* oraz anty-*Mfn2* (Sigma Aldrich).

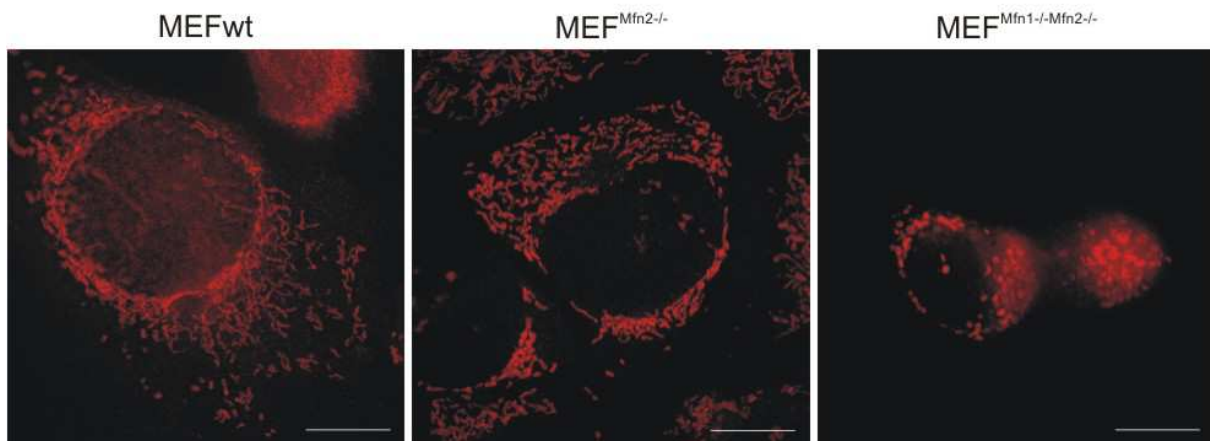


**Ryc. 3. Immunoreaktywność *Mfn1* i *Mfn2* w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.**

Obecność mitofuzyny badano za pomocą przeciwciała anty-*Mfn1* (Sigma Aldrich) i anty-*Mfn2* (Sigma Aldrich), w ekstraktach komórkowych MEF (20 µg białka), rozdzielonych na drodze elektroforezy SDS-PAGE w 10% żelu poliakryloamidowym. GAPDh przedstawiono jako kontrolę prawidłowego nałożenia próbek na żel.

Poprzez obserwację w mikroskopie świetlnym trzech typów komórek MEF potwierdzono opisane w literaturze różnice w ich morfologii i charakterze wzrostu. Jak przedstawiono na Ryc. 2, MEFwt charakteryzowały się wrzecionowatym, wydłużonym kształtem i były równomiernie rozproszone na powierzchni szalki. Natomiast komórki MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> przyjmowały nieregularny kształt i rosły w skupiskach bez względu na stopień zagęszczenia.

Techniką mikroskopii konfokalnej z wykorzystaniem specyficznych barwników fluorescencyjnych potwierdzono opisane w literaturze zaburzenia rozmieszczenia mitochondriów w związku z zahamowaniem ekspresji mitofuzyny [26, 27]. Mitochondria znakowano sondą fluorescencyjną MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, Invitrogen). W komórkach prawidłowych obserwowano równomiernie rozmieszczone mitochondria, obecne w całym ciele komórki. Natomiast w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, a tym bardziej MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, mitochondria wykazywały tendencję do okołojądrowej lokalizacji i tworzenia skupisk (Ryc. 4).



**Ryc. 4. Struktura sieci mitochondrialnej w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>**

Przykładowe zdjęcia komórek prawidłowych MEFwt oraz MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, w których mitochondria (widoczne na czerwono) znakowano za pomocą sondy fluorescencyjnej MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, Invitrogen). Brak ekspresji mitofuzyny powodował zmiany w rozmieszczeniu mitochondriów, w szczególności tendencję do okołojądrowej lokalizacji. W komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> obserwowano skupiska mitochondriów, podczas gdy w komórkach prawidłowych mitochondria rozmieszczone były równomiernie.

Zdjęcia wykonano w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDIK PAN z wykorzystaniem systemu konfokalnego z głowicą super rozdzielczą LSM 780/Elyra PS.1. (Zeiss). Do rejestracji obrazów zastosowano technikę SR-SIM.

Komórki hodowano na szkiełkach w 12-dołkowej szalce Petriego, w standardowych warunkach. Bezpośrednio przed barwieniem komórki płukano buforem PBS, inkubowano z 50 nM sondą w buforze PBS przez 20 min. w 37°C w ciemności, po czym utrwalano w 4% PFA przez 15 min. Preparaty zamykano za pomocą Fluorescence Mounting Medium (Dako). Skala: 10 µm.

### 3.1.1.3 Transfekcja komórek MEF

Skutki mutacji badano w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, w których miała miejsce nadekspresja prawidłowego genu mitofuzyny 2 lub z wybranymi mutacjami. W tym celu komórki MEF transfekowano plazmidem pCMV6-XL4 (OriGene Technologies, SC114726), zawierającym wstawkę cDNA dla ludzkiej mitofuzyny 2

(wariant transkrypcyjny 1; wielkość plazmidu: ok. 4,7 kb; wielkość wstawki: 3,8 kb). Plazmidy z genem *Mfn2* z mutacją zostały przygotowane za pomocą zestawu do punktowej mutagenyzy QuikChange II-E Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Efekt mutagenyzy potwierdzano metodą sekwencjonowania oraz z użyciem enzymów restrykcyjnych. Plazmidy przygotowała dr Dagmara Kabzińska z Zespołu Nerwowo-Mięśniowego IMDiK, w ramach współpracy przy realizacji projektu Narodowego Centrum Nauki.

Transfekcję komórek MEF prowadzono za pomocą zestawu JetPrime (Polyplus), zgodnie z wytycznymi producenta. Przeprowadzono serię kontrolnych transfekcji, na podstawie których wybrano optymalne warunki transfekcji. Ponadto, w pierwszych doświadczeniach komórki transfekowano plazmidem pEGFP (Clontech), a efektywność transfekcji oceniano wizualnie w mikroskopie fluorescencyjnym, poprzez ocenę ilości komórek zawierających białko GFP. Efektywność transfekcji komórek MEF plazmidem pEGFP oszacowano na 40%.

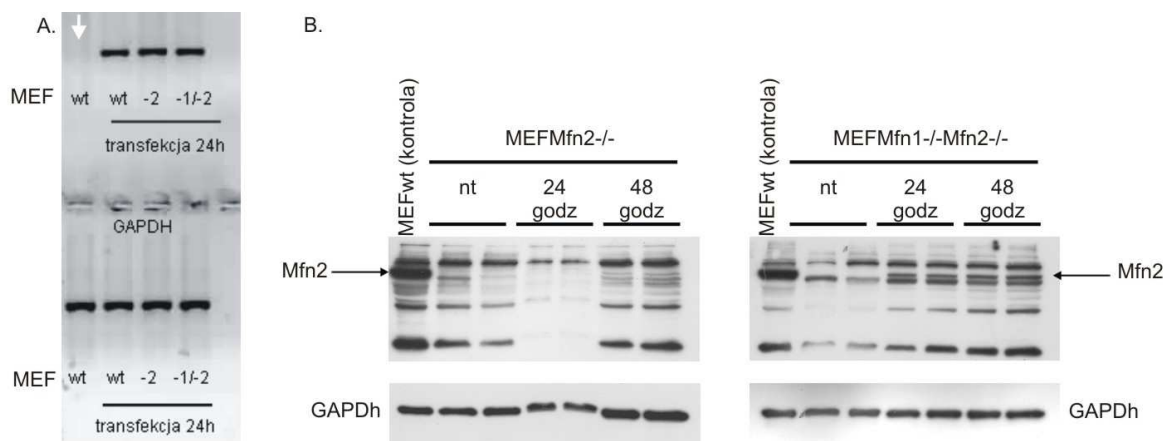
Badano wpływ trzech mutacji zidentyfikowanych u polskich chorych z CMT2A. Pierwsza z nich, c.281G>A (Arg94Gln, R94Q), to mutacja punktowa, najczęściej występująca u chorych z CMT2A a jej związek z rozwojem choroby CMT2A został potwierdzony i udokumentowany [4, 12, 71]. Dwie następne mutacje to również mutacje punktowe, ale wykryte po raz pierwszy w IMDiK: c.748C>T (Arg250Trp, R250W), w wyniku której dochodzi do zamiany argininy w pozycji 250 na tryptofan oraz mutacja c.1198C>T (Arg400X, R400X), w której w miejscu argininy w pozycji 400 powstaje kodon stop. Konsekwencją powstania kodonu stop może być biosynteza krótszego białka pozbawionego domeny przezbłonowej, kotwiczącej *Mfn2* w błonie mitochondrium i na powierzchni siateczki śródplazmatycznej oraz domeny HR2 (szczegółowy opis domen mitofuzyny 2 i ich funkcji znajduje się w podrozdziale 1.3). Pacjent, u którego stwierdzono obie mutacje R400X/R250W w konfiguracji trans rozwinął objawy choroby CMT2A. Natomiast u rodziców i brata, obarczonych pojedynczą mutacją dotąd nie zaobserwowano objawów polineuropatii [12].

Ekspresję genu ludzkiej *Mfn2* po transfekcji w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> potwierdzono poprzez analizę mRNA oraz immunoreaktywności białka. Obecność mRNA prawidłowej *Mfn2* wykazano po 24 godz. od transfekcji poprzez rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR (Ryc. 5A). Natomiast obecność białka *Mfn2* w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wykazano po 24 i 48 godz. od transfekcji metodą western blot (Ryc. 5B).



Obecność Mfn2 z mutacją również badano metodą western blot. Przebadano kilka serii plazmidów niosących gen Mfn2 z mutacją R400X. Przypuszcza się, że na skutek mutacji R400X powstaje krótsze białko, rozpoznawane przez przeciwciało anti-Mfn2 na wysokości 45 kDa, podczas, gdy prążek odpowiadający prawidłowej Mfn2 i Mfn2 z mutacją R250W lub R94Q znajduje się na wysokości odpowiadającej 84 kDa. Do dalszych badań wybrano te serie plazmidów, dla których po transfekcji komórek MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> plazmidem zawierającym gen Mfn2<sup>R400X</sup> obserwowano powstanie prążka rozpoznawanego przez przeciwciało anti-Mfn2 na wysokości ok. 45 kDa.

Skutki transfekcji badano po 48 godz. Zaobserwowano, że efektywność transfekcji, mierzona za pomocą plazmidu z GFP, osiągała maksimum po 48 godz. Z upływem czasu ilość komórek transfekowanych zmniejszała się, co mogłoby utrudniać śledzenie skutków transfekcji. Jednocześnie, jak wykazano metodą PCR i western blot, już okres 24 godz. był wystarczający, by ekspresja białka z plazmidu zachodziła na poziomie umożliwiającym jego wykrycie za pomocą metody western blot.



**Ryc. 5. Nadekspresja prawidłowego genu ludzkiej mitofuzyny 2 w komórkach MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup>.**

Komórki MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> transfekowano plazmidem z prawidłowym genem ludzkiej Mfn2. Obecność transkryptu dla Mfn2 zaobserwowano po 24 godz. od transfekcji, poprzez rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR poprzedzonej RT-PCR (A). Do reakcji wykorzystano startery specyficzne dla genu ludzkiej Mfn2, dlatego też produktu reakcji PCR nie obserwowano w nietransfekowanych komórkach MEFwt (kontrola negatywna wskazana białą strzałką). Obecność białka Mfn2 wykazano po 24 i 48 godz. na podstawie immunoreaktywności białka (B). Immunoreaktywność Mfn2 badano w ekstraktach komórkowych (po 20 µg białka na ścieżkę) otrzymanych za pomocą buforu Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology), rozdzielonych metodą elektroforezy SDS-PAGE w 10% żelu poliakrylamidowym. Immunoreaktywność Mfn2 badano za pomocą przeciwciała anti-Mfn2 (Sigma Aldrich). MEFwt, MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> nietransfekowane (nt) stanowiły odpowiednio pozytywną i negatywną kontrolę.

W związku z prowadzeniem transfekcji komórek MEF uzyskano zgodę Ministra Środowiska na zamknięte użycie organizmów modyfikowanych genetycznie (Decyzja nr 01-46/2010).

### **3.1.2 Myszy szczepu C57BL/6**

Ekspresję genów Mfn1 i Mfn2 oraz immunoreaktywność białka porównano w wybranych narządach dorosłych myszy (5 – 9 tygodni) szczepu C57BL/6. Myszy pochodziły z hodowli prowadzonej w zwierzętarni IMDiK PAN.

Na doświadczenia z udziałem zwierząt uzyskano pozwolenie Lokalnej Komisji Etycznej (Decyzja nr 32/2013).

## 3.2 Metody badawcze

### 3.2.1 Pomiar tempa wzrostu komórek

Tempo wzrostu mierzono w aparacie xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosystems), jak w metodzie Moniri i Young [72]. Aparat umożliwia ciągłe ilościowe śledzenie przyrostu komórek w specjalnej 16-dołkowej szalce hodowlanej w oparciu o pomiar impedancji. Komórki, które mają kontakt z siecią mikro-czujników wbudowanych w dno każdej studzienki zmieniają przepływ prądu w tym układzie. Pomiar impedancji dostarcza informacji na temat liczby komórek w każdym dołku płytki w czasie rzeczywistym. Zmiany impedancji są przeliczane automatycznie na indeks komórek w danym punkcie doświadczenia.

Tempo podziału komórek badano w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> przez co najmniej 48 godz. Komórki hodowane były w standardowych warunkach, jak opisano w podrozdziale 3.1.1.1.

Dla każdej linii MEF zarejestrowano krzywe wzrostu dla różnej początkowej liczby komórek (od 3,0 do 25,0 x 10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>).

### 3.2.2 Oznaczenia biochemiczne

#### 3.2.2.1 Oddychanie komórkowe

Oddychanie komórkowe mierzono metodą polarograficzną za pomocą urządzenia Oxygraph-2k (OROBOROS; INSTRUMENTS GmbH, Austria). Komórki hodowano na szalce Petriego o średnicy 10 cm, bezpośrednio przed pomiarem trypsynizowano i zawieszano w buforze PBS. Zużycie tlenu mierzono w 37°C, w buforze PBS wolnym od substratów oddechowych oraz po podaniu 1 mM pirogronianu, 5 mM glukozy, 0,1 mg/ml oligomycyny (inhibitor syntazy ATP) oraz 0,5-1,5 μM CCCP (protonofor, rozpręgacz oksydacyjnej fosforylacji). Po pomiarze zawiesinę komórek zbierano, łączono z 1,0 M NaOH w stosunku 1 :1, a w otrzymanych ekstraktach komórkowych oznaczano stężenie białka, jak opisano w podrozdziale 3.2.8. Wyniki przedstawiono jako wartości zużycia tlenu na miligram białka w jednostce czasu (pmol O<sub>2</sub>/mg x sek).

#### 3.2.2.2 Potencjał błonowy mitochondriów

Potencjał błonowy mitochondriów badano fluorymetrycznie, zgodnie z metodą Cossarizza i wsp. [73].

Komórki trypsynizowano, płukano buforem PBS, a następnie inkubowano w pożywce hodowlanej z dodatkiem 5  $\mu\text{M}$  sondy JC-1 (Molecular Probes, Invitrogen) przez 15 min. w 37°C w ciemności. Pomiaru fluorescencji sondy dokonano dla komórek nietraktowanych oraz po 10 min. inkubacji z 0,1  $\mu\text{g/ml}$  oligomycyną. W celu otrzymania kontroli negatywnej, komórki inkubowano przez 10 min. w buforze PBS z 3  $\mu\text{M}$  walinomycyną (jonofor) i 5  $\mu\text{M}$  CCCP.

Fluorescencję mierzono na cytometrze przepływowym FACSCalibur (BD Biosciences) wyposażonym w laser argonowy (488 nm). W pierwszej kolejności komórki analizowano pod kątem ich wielkości i struktury, by na tej podstawie do następnego etapu zakwalifikować tylko komórki nieuszkodzone (bramkowanie). Następnie w wybranej populacji komórek badano fluorescencję sondy JC-1. Wyniki przedstawiano jako procent komórek o wysokim potencjale błonowym mitochondriów w stosunku do wszystkich analizowanych komórek.

### 3.2.2.3 Wytwarzanie reaktywnych form tlenu

Powstawanie reaktywnych form tlenu badano fluorymetrycznie z zastosowaniem sondy DFFH<sub>2</sub>-DA (ang. *carboxy-2'7'-difluorodihydrofluorescein*, Invitrogen).

Komórki hodowano w 12-dołkowej szalce. Bezpośrednio przed pomiarem, komórki płukano i inkubowano przez 30 min. w 37°C w buforze PBS z dodatkiem 10  $\mu\text{M}$  sondy fluorescencyjnej, 5,6 mM glukozy i 1 mM pirogronianu. Pomiaru fluorescencji dokonano w aparacie SpectraMax Micro Plate Reader (Molecular Devices) przy długości fali 485 nm i 520 nm odpowiednio dla wzbudzenia i emisji. Po pomiarze komórki poddawano lizie w 0,5 M NaOH, a w otrzymanych ekstraktach komórkowych oznaczano stężenie białka zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 3.2.8. Przedstawiono wartości względne fluorescencji sondy w przeliczeniu na mg białka i w stosunku do MEFwt (100%).

### 3.2.2.4 Wytwarzanie ATP i mleczanu

Ilość ATP i mleczanu badano metodą enzymatyczną w zobojętnionych ekstraktach komórkowych, według metody Williamsona i Corkeya [74].

Pomiary wykonano za pomocą spektrofluorymetru Shimadzu RF-5301 PC mierząc stężenie odpowiednio NADPH<sup>+</sup> lub NAD<sup>+</sup> przy fali wzbudzenia 340 nm i emisji 465 nm.

Ilość ATP i mleczanu wyrażano w nanomolach w przeliczeniu na mg białka.

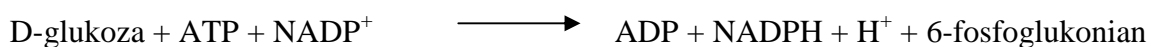
### Ekstrakcja i pomiar stężenia ATP

Ilość ATP produkowaną przez poszczególne typy MEF oznaczano w ekstraktach zebranych po 10 min. inkubacji w buforze Krebsa-Henseleita (10 mM HEPES, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 135 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM pirogronian, pH 7,4). W tym celu komórki MEF hodowano na szalkach Petriego do osiągnięcia ok. 80% zagęszczenia. Bezpośrednio przed ekstrakcją komórki przemywano trzykrotnie w celu usunięcia pożywki hodowlanej, a następnie inkubowano w buforze Krebsa-Henseleita bez glukozy lub zawierającego 5,6 mM glukozę, a gdzie wskazano także z dodatkiem 0,1 µg/ml oligomycyny lub 1 mM jodooctanu sodu (inhibitor dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego a zatem glikolizy). Po inkubacji bufor dokładnie usuwano. Komórki traktowano 4% kwasem nadchlorowym. Ekstrakcję ATP prowadzono przez 15 min. na lodzie, lekko kołyszając. Uzyskane ekstrakty zobojętniano za pomocą 2 M roztworu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Po ekstrakcji komórki poddawano lizie w 0,5 M roztworze NaOH. W otrzymanych ekstraktach komórkowych oznaczano stężenie białka, zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 3.2.8.

Przyjętą objętość zobojętnionego ekstraktu (500 µl) łączono z 2,5 ml buforu do reakcji (50 mM trietanolamina-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA). Ilość ATP oznaczano pośrednio, na podstawie zmian fluorescencji w związku z powstawaniem NADPH, w reakcji katalizowanej dehydrogenazą glukozo-6-fosforanową (G6PD) i heksokinazą:



Zbiorczo:



Stężenie ATP w ekstraktach obliczano w oparciu o zmianę fluorescencji mieszaniny reakcyjnej na skutek dodatku znanej ilości standardowego roztworu ATP o ściśle określonym stężeniu.

### Ekstrakcja i pomiar stężenia mleczanu

Ilość mleczanu wytwarzanego przez poszczególne typy MEF wyliczano na podstawie różnicy ilości mleczanu w ekstraktach zebranych po 30 min. inkubacji komórek w buforze Krebsa-Henseleita z dodatkiem 5,6 mM glukozy i 1 mM pirogronianu w 37°C

oraz bez inkubacji, w tzw. „czasie zero” (T30-T0). W tym celu komórki MEF hodowano na szalkach Petriego do osiągnięcia ok. 80% zagęszczenia. Bezpośrednio przed ekstrakcją komórki przemywano trzykrotnie w celu usunięcia pożywki hodowlanej, a następnie inkubowano w buforze Krebsa-Henseleita z dodatkiem 5,6 mM glukozy i 1 mM pirogronianu w 37°C, lekko kołysząc. Po tym czasie do buforu dodawano stężony kwas nadchlorowy tak, aby jego ostateczne stężenie wynosiło 5%. Ekstrakcję mleczanu prowadzono na lodzie przez 15 min., lekko kołysząc. Następnie ekstrakty zbierano i zobojętniano za pomocą 2 M roztworu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Analogicznie prowadzono ekstrakcję mleczanu bez 30 min. inkubacji w buforze Krebsa-Henseleita (po odpłukaniu pożywki komórki traktowano buforem Krebsa-Henseleita z pirogronianem i glukozą i natychmiast dodawano kwas nadchlorowy). Po zebraniu ekstraktów komórki poddawano lizie w 0,5 M roztworze NaOH. W otrzymanych ekstraktach komórkowych oznaczano stężenie białka, zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 3.2.8.

Stężenie mleczanu w ekstraktach oznaczano spektrofotometrycznie w buforze reakcyjnym (0,4 M siarczan hydrazyny, 0,5 M glicyna, 5 mM EDTA, pH 9,5), w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę mleczanową (LDH):



Stężenie mleczanu w ekstraktach obliczano w oparciu o zmianę fluorescencji mieszaniny reakcyjnej na skutek dodatku znanej ilości standardowego roztworu mleczanu o ściśle określonym stężeniu.

### 3.2.3 Obserwacja w Transmisyjnym Mikroskopie Elektronowym

Obserwację komórek MEF prowadzono w Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN.

Komórki trypsynizowano, płukano roztworem PBS i utrwalano przez 20 godz. w buforze kakodylowym o pH 7,4, zawierającym 1% paraformaldehyd i 1,25% glutaraldehyd. Następnie komórki inkubowano w buforze zawierającym 1% tlenek osmu (OsO<sub>4</sub>) i 0,8% żelazocyjanek potasu K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] oraz przygotowywano do obserwacji w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wedle standardowych procedur. Obserwację prowadzono za pomocą mikroskopu elektronowego JEOL 1011.

Występowanie glikogenu oceniano wizualnie poprzez rozpoznanie charakterystycznych ziaren o dużej gęstości optycznej, jak opisano w pracy Krystyny Kielan Rybickiej [75]. W celu ilościowego przedstawienia zmian w ilości glikogenu dla

każdego typu MEF obliczono liczbę komórek zawierających glikogen w stu oglądanych komórkach.

### 3.2.4 Elektroforeza BN-PAGE. Aktywność enzymatyczna kompleksu V

Aktywność kompleksów oddechowych badano we frakcji bogatej w mitochondria (P2) metodą elektroforezy natywnej Blue Native-PAGE. Elektroforezę prowadzono w żelu poliakryloamidowym, wg metody Więckowskiego i wsp. [76] z drobnymi modyfikacjami.

W celu otrzymania frakcji P2 komórki trypsynizowano, płukano zimnym roztworem PBS i homogenizowano w buforze o pH 7,4 i następującym składzie: 10 mM Tris-HCl, 0,25 M sacharoza, 2 mM EDTA, z dodatkiem 1 mM PMSF i mieszaniny inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich, P8340). W trakcie homogenizacji próbki trzymano w lodzie. Otrzymane homogenaty wirowano z prędkością 1 000 x g przez 5 min. w 4°C. Zebrane supernatanty wirowano w warunkach 10 000 x g przez 20 min. w 4°C, a otrzymany osad stanowił frakcję P2.

100 µg osadu P2 zawieszano w 10 µl buforu o pH 7,0 i następującym składzie: 1,5 M kwas aminokapronowy, 50 mM Bis-Tris z dodatkiem 1 mM PMSF oraz mieszaniny inhibitorów proteaz. Do każdej próbki dodawano 1 µl 10% roztworu dodecylomaltozydu. Po 30 min. inkubacji w lodzie, próbki wirowano w warunkach: 17 000 x g przez 20 min. w 4°C. Zebrany supernatant łączono z 0,4 µl buforu z dodatkiem kwasu aminokapronowego oraz barwnika Coomassie G-250 (Bio-Rad).

Elektroforezę natywną prowadzono w żelu gradientowym 5 - 12% w aparatach Mini PROTEAN 3 System (Bio-Rad) w 4°C nakładając 100 µg białka na ścieżkę. Początkowo stosowano napięcie 70 V oraz następujące bufor: katodowy (50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris/HCl z dodatkiem 0,02% Coomassie G-250) i anodowy (50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0). Po godzinie napięcie zwiększano do 200 V. Gdy czoło elektroforezy osiągnęło 2/3 żelu, bufor katodowy wymieniano na wolny od barwnika Coomassie G-250.

Po zakończeniu elektroforezy, w celu uwidocznienia aktywności enzymatycznej syntazy ATP żel z rozdzielonymi białkami inkubowano przez noc w buforze reakcyjnym o pH 8,3-8,6 i następującym składzie: 35 mM TrisHCl, 270 mM glicyna, 14 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 8 mM ATP, jak w metodzie Sabar i wsp. [77] oraz Yan i Forester [78].

### 3.2.5 Elektroforeza SDS-PAGE i western blot

Ekstrakty komórkowe przygotowywano przy użyciu buforu Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology), zgodnie z zaleceniami producenta.

Komórki (na szalce lub po trypsynizacji), płukano buforem PBS i zalewano zimnym buforem do lizy z dodatkiem 1 mM PMSF. Po 5 min. inkubacji w lodzie zawiesinę zbierano, poddawano sonikacji (4 x po 5 sek.) i wirowano z prędkością 14 000 x g przez 10 min. w 4°C. Nadsącz zbierano, oznaczano stężenie białka (zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale 3.2.8) oraz przygotowywano do elektroforezy SDS-PAGE. W tym celu ekstrakty komórkowe łączono z buforowanym roztworem o pH 6,8 i następującym składzie: 1 M Tris-HCl, 87% glicerol, 5% SDS, 0,1% błękit bromofenolowy, 5% merkaptoetanol w stosunku 4 : 1 i denaturowano w 100°C w łaźni wodnej przez 5 min.

#### 3.2.5.1 Immunoreaktywność białek mitochondrialnych: Hsp60, Tom20 i Tfam

Analizę immunoreaktywności białek mitochondrialnych prowadzono po uprzednim rozdzielaniu w żelu metodą SDS-PAGE. Białka poddawano hybrydyzacji z przeciwciałami: Tom20 (Santa Cruz Biotechnology, sc-11415), Hsp60 (Sigma Aldrich, H4149), Tfam (GenWay Biotech, GWB-22C6C2) oraz PCNA (Santa Cruz Biotechnology, sc-9857) stanowiącego kontrolę prawidłowego nałożenia próbek na żel.

Wybór PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) został podyktowany faktem, że pomiędzy poszczególnymi typami MEF zaobserwowano różnice w ilości i jakości mitochondriów oraz w strukturze cytoszkieletu (dane nie przedstawione w niniejszej pracy). Dlatego też, zrezygnowano z oznaczania immunoreaktywności GAPDh (będącego białkiem cytosolowym, związanym z metabolizmem glukozy) oraz beta-aktyny (budującej mikrofilamenty współtworzące cytoszkielet), wykorzystywanych standardowo, jako białka kontrolne, w metodzie western blot. Białko PCNA jest białkiem jądrowym zaangażowanym w replikację DNA, jego naprawę oraz regulację cyklu komórkowego [79].

Wyniki przedstawiono jako wartości względne immunoreaktywności poszczególnych białek w odniesieniu do ich immunoreaktywności w komórkach MEFwt (100%).

#### 3.2.5.2 Immunoreaktywność kompleksów łańcucha oddechowego

Ekstrakty komórkowe MEF zawieszano w roztworze denaturującym (bez inkubacji w 100°C, zgodnie z zaleceniem producenta) i rozdzielano w 12% żelu metodą SDS-PAGE,



po 30 µg białka w ścieżce. Analizę western blot przeprowadzono z użyciem zestawu przeciwciał MitoProfile Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (MitoScience) dla wybranych podjednostek kompleksów oddechowych: NDUF8 (kompleks I), CII-30 kD (FeS; kompleks II); białko CIII-Core 2 (kompleks III), podjednostka C-IV-I (kompleks IV); podjednostka C-V-α (kompleks V). Wyniki przedstawiono jako wartości względne immunoreaktywności poszczególnych białek w odniesieniu do ich immunoreaktywności w komórkach MEFwt.

### 3.2.6 Ilość mitochondrialnego DNA

Ilość mitochondrialnego DNA mierzono metodą PCR w czasie rzeczywistym, jak opisano w Myers i wsp. [80] i wyrażano w odniesieniu do DNA jądrowego. DNA całkowite otrzymywano za pomocą zestawu Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology). Ilość DNA mitochondrialnego oznaczano stosując specyficzne startery dla obszaru pętli D (ang. D-loop):

D-loop F: 5'-CCAAAAACACTAAGAAGACTTGAAAGACA-3'

D-loop R: 5'-GTCATATTTTGGGAAGACTACTAGAATTGATC-3'.

Ilość DNA jądrowego oznaczano stosując startery specyficzne do genu kinazy tymidynowej (TK) [80]:

TK F: 5'-GACTGTATTGAGCGGCTTCAGA-3'

TK R: 5'-CATGCTCGGTGTGAGCCATA-3'.

Do reakcji wykorzystano SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems). Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w termocyklerze Applied Biosystems 7500 stosując następujące warunki: 50°C przez 2 min. oraz 95°C przez 10 min., po których występowało 40 cykli 95°C przez 15 s i 60°C przez 1 min. Wyniki opracowano metodą porównawczą ( $\Delta\Delta C_t$ ), zgodnie z Livak i wsp. [81] i wyrażano jako względny stosunek ilości mitochondrialnego DNA do jądrowego DNA (mtDNA/nDNA vs MEFwt).

Stosunek mtDNA/nDNA badano w komórkach nietransferowanych MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, jak również po nadekspresji prawidłowego genu Mfn2 lub genu z mutacjami opisanymi w podrozdziale 3.1.1.3 w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.

### 3.2.7 Stosunek ekspresji Mfn1 i Mfn2 w tkankach myszy

#### 3.2.7.1 Przygotowanie próbek

Fragmety tkanek pobierano z dorosłych myszy (5 – 9 tygodni) szczepu C57BL/6. Myszy uśmiercano zgodnie z wytycznymi komisji bioetycznej, po czym niezwłocznie pobierano:

- zwoje czuciowe (DRG) reprezentujące obwodowy układ nerwowy,
- korę mózgową, mózdzek i rdzeń kręgowy reprezentujące ośrodkowy układ nerwowy
- serce, mięsień szkieletowy (czworogłowy uda), wątrobę, nerkę i fragment skóry.

Pobrane fragmenty tkanek zamrażano natychmiast po pobraniu, a następnie proszkowano w ciekłym azocie i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do późniejszego wykorzystania.

#### 3.2.7.2 Analiza mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym

RNA otrzymywano ze sproszkowanych tkanek. Wyjątek stanowiły zwoje czuciowe, których nie proszkowano ze względu na znikomą masę. Zwoje czuciowe przechowywano w buforze RNAlater (Sigma Aldrich) przez czas ich pobierania z myszy (1-3 godz.), po czym bufor był usuwany, zwoje czuciowe płukane wodą wolną od RNaz, a następnie homogenizowane w buforze izolacyjnym.

Wstępne doświadczenia wykazały, że zastosowanie buforu RNAlater nie zmieniało stosunku ilości mRNA Mfn1 i Mfn2, ale korzystnie wpływało na efektywność izolacji mRNA, co ułatwiało dalszą analizę.

Całkowite RNA otrzymywano za pomocą zestawu Qiagen RNeasy Micro Kit (DRG), Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (nerka, wątroba) lub Qiagen Trizol Reagent (pozostałe próbki). DNA genomowe usuwano za pomocą odczynnika DNase I (Thermo Scientific), po czym próbki RNA oczyszczano zestawem Thermo Scientific Gene Jet RNA Purification Kit.

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono z użyciem sond-starterów typu TaqMan firmy Life Technologies: Mm00612599\_m1 dla Mfn1, Mm00500120\_m1 dla Mfn2 oraz Mm03928990\_g1 dla 18S RNA, stanowiącego kontrolę wewnętrzną. Analizy wyników dokonano metodą  $\Delta\Delta\text{Ct}$  [81].

Wyniki przedstawiano jako średni stosunek ilości mRNA Mfn1 i Mfn2 w poszczególnych próbkach. Dla wybranych próbek układu nerwowego przedstawiono również wartości ekspresji mRNA Mfn1 i Mfn2.

### 3.2.7.3 Analiza immunoreaktywności białka metodą elektroforezy SDS-PAGE i western blot

Immunoreaktywność Mfn1 i Mfn2 badano w ekstraktach przygotowywanych z naważek sproszkowanych narządów myszy. Ekstrakty przygotowywano za pomocą roztworu Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology). Naważkę (ok. 10 mg) zalewano 500  $\mu$ l roztworu z dodatkiem 1 mM PMSF i homogenizowano za pomocą urządzenia Pellet Pestels Cordless Motor (Sigma Aldrich), utrzymując próbkę w lodzie. Otrzymany homogenat sonikowano i wirowano, jak opisano w rozdziale 3.2.5.

Ekstrakty rozdzielano metodą elektroforezy SDS-PAGE w 10% żelu poliakryloamidowym, po 20  $\mu$ g białka na ścieżkę. Immunoreaktywność wybranych białek badano w standardowej procedurze western blot z użyciem przeciwciał anti-Mfn1 i anti-Mfn2 (Sigma Aldrich) oraz anti-GAPDh (Chemicon), w celu kontroli prawidłowego nałożenia próbek na żel.

W celu potwierdzenia specyficzności przeciwciał anti-Mfn1 i anti-Mfn2, na każdym żelu znajdowały się ekstrakty komórkowe MEFwt (kontrola pozytywna) oraz odpowiednio MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> (kontrola negatywna).

Analizę densytometryczną prążków przeprowadzono w programie GelExpert (NucleoTech). Immunoreaktywność Mfn1 i Mfn2 dla poszczególnych narządów normalizowano względem immunoreaktywności MEFwt. Na podstawie uzyskanych wartości obliczano stosunek Mfn1/Mfn2.

### 3.2.8 Oznaczanie białka

Białko w ekstraktach komórkowych oznaczano za pomocą zestawu Modified Lowry Protein Assay Kit (Pierce).

### 3.2.9 Statystyka

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym. Istotność statystyczną wyliczano w oparciu o test Bonferroniego do jednoczesnej analizy wielu grup badanych, poprzedzony analizą wariancji ANOVA. Gdzie wskazano, stosowano test t-Studenta. Wyniki przedstawiano jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Wynik uznawano za istotny statystycznie gdy  $p < 0,05$ .

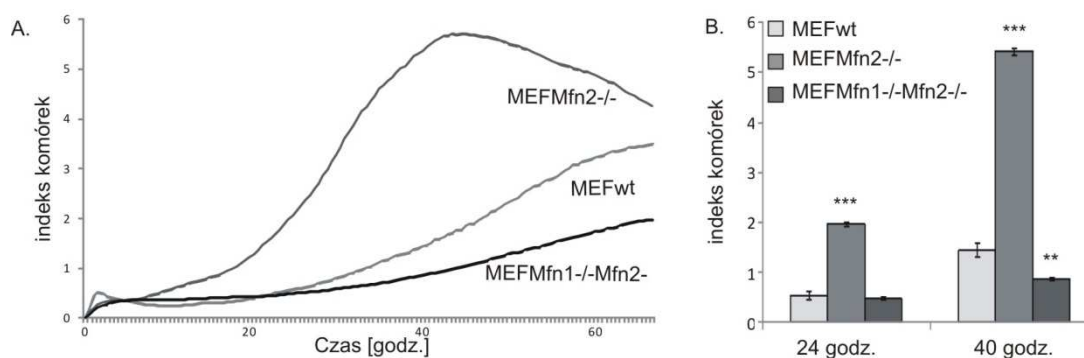
## 4. WYNIKI

### 4.1 Tempo podziału komórek MEF

Charakterystykę trzech linii MEF rozpoczęto od oceny tempa ich podziału, zgodnie z metodą Moniri i Young [72]. Zmiany liczby komórek obserwowano w czasie rzeczywistym w standardowych warunkach hodowlanych, opisanych w podrozdziale 3.1.1.1. Liczbie komórek w danym punkcie doświadczenia odpowiadał pomiar impedancji przeliczany automatycznie na indeks komórek.

Komórki wysiewano w kilku stężeniach ( $3 \times 10^3 - 25 \times 10^3/\text{cm}^2$ ), a ich wzrost rejestrowany był przez ponad dwie doby. Przeprowadzono szczegółową analizę krzywych wzrostu dla początkowej liczby komórek  $2,5 \times 10^3$  ( $1,25 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ).

Zaobserwowano różne tempo podziału komórek MEF w zależności od obecności lub braku mitofuzyny (Ryc. 6). Różnice w tempie podziału obserwowano niezależnie od początkowej liczby komórek. Komórki MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> charakteryzowało najwyższe tempo podziału, znacznie przewyższające tempo podziału komórek prawidłowych. Indeks komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> przewyższał ponad trzykrotnie MEFwt zarówno po 24 godz, jak i 40 godz. od wysiania. Indeks komórek MEFwt i MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> po 24 godz. wynosił odpowiednio  $0,55 \pm 0,09$  oraz  $1,97 \pm 0,05$ , a po 40 godz.:  $1,46 \pm 0,14$  oraz  $5,43 \pm 0,07$  (Ryc. 6B).



**Ryc. 6. Tempo podziału komórek MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>**

Przykładowe krzywe wzrostu MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> (A) oraz średni indeks komórek w 24 i 40 godz. doświadczenia. Liczba wysianych komórek dla każdej linii MEF wynosiła  $2,5 \times 10^3$  ( $1,25 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ). Tempo podziału mierzono w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> przez ponad dwie doby; n=3-4, \*\*p<0,01 oraz \*\*\*p<0,001 vs. MEFwt.

Natomiast komórki MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> dzieliły się najwolniej. Po 24 godz. liczba komórek MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> była zbliżona do MEFwt. Indeks komórek MEFwt i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> po 24 godz. wynosił odpowiednio:  $0,55 \pm 0,09$  oraz  $0,48 \pm 0,03$  dla MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Natomiast po 40 godz. indeks komórek MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> był o prawie połowę niższy od MEFwt i wynosił  $1,46 \pm 0,14$  dla MEFwt oraz  $0,87 \pm 0,03$  dla MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Na podstawie obserwacji krzywych wzrostu (Ryc. 6A) można przypuszczać, że komórki MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wchodziły w fazę intensywnego wzrostu po ok. 24 godz. od wysiania, znacznie później niż pozostałe typy MEF (Ryc. 6A).

Jak pokazały dalsze doświadczenia nadekspresja prawidłowego genu Mfn2 w MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> powodowała obniżeniem tempa podziału, upodabniając je tym samym do MEFwt (dane nie przedstawione).

Na podstawie uzyskanych krzywych wzrostu zdecydowano, że komórki MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> będą wysiewane do doświadczeń dobie wcześniej niż MEFwt i MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Ustalono także proporcje w liczbie wysiewanych komórek dla poszczególnych typów MEF, tak, by w momencie doświadczenia wszystkie komórki MEF znajdowały się w fazie logarytmicznego wzrostu i wykazywały podobną gęstość. Na tej podstawie komórki MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wysiewano w ilości dwukrotnie mniejszej niż MEFwt.

## 4.2 Charakterystyka porównawcza komórek MEF

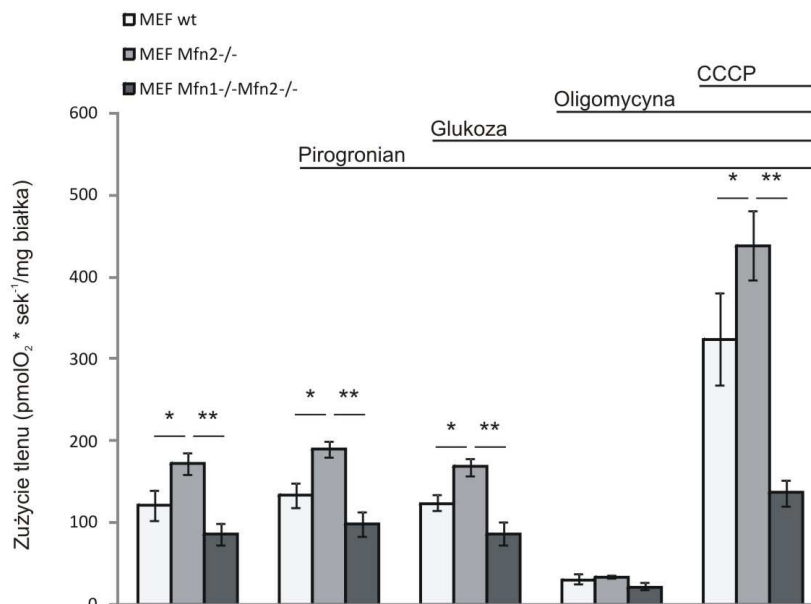
Ocenie poddano parametry, które w sposób ogólny opisują stan bioenergetyczny komórek. Zmierzono oddychanie komórkowe, potencjał błony mitochondrialnej, wytwarzanie reaktywnych form tlenu oraz zdolność komórek do tworzenia ATP w obecności inhibitorów oksydacyjnej fosforylacji i glikolizy.

### 4.2.1 Oddychanie komórkowe

Tempo oddychania komórek mierzono za pomocą oksygrafu Oxygraph-2k (OROBOROS; INSTRUMENTS GmbH, Austria), w buforze wolnym od substratów oddechowych (PBS) oraz w obecności 1 mM pirogronianu, 5 mM glukozy, 0,1 mg/ml oligomycyny oraz 0,5-1,5  $\mu$ M CCCP.

Oligomycyna jest inhibitorem oksydacyjnej fosforylacji, hamującym aktywność syntazy ATP. W komórkach, w których mitochondria są sprzężone, w obecności oligomycyny dochodzi do zahamowania zużycia tlenu.

CCCP jest jonoforem, rozprzegającym oksydacyjną fosforylację. W jego obecności reakcje katalizowane przez kompleksy oddechowe przebiegają z maksymalną szybkością właściwą dla danych warunków doświadczenia.



**Ryc. 7. Oddychanie komórkowe MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>**

Zużycie tlenu mierzono polarograficznie w temp. 37°C w roztworze PBS w nieobecności substratów oddechowych a następnie po dodaniu 1 mM pirogronianu i 5 mM glukozy, inhibitora oksydacyjnej fosforylacji (0,1 mg/ml oligomycyny) oraz protonoforu (0,5-1,5 μM CCCP). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie zużycia tlenu (pmol O<sub>2</sub> x sek<sup>-1</sup>/mg) z odchyleniem standardowym; \*p < 0,01, \*\*p < 0,001 vs. MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>; n = 4.

**Tabela 1. Średnie zużycie tlenu przez komórki MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> w buforze PBS oraz po dodaniu substratów oddechowych, oligomycyny i CCCP.**

	PBS	pirogronian	glukoza	oligomycyna	CCCP
MEFwt	120,5 ± 18,3	133,2 ± 14,3	123,8 ± 9,3	30,4 ± 5,9	323,5 ± 56,1
MEF <sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>	171,8 ± 13,6	189,5 ± 9,0	168,1 ± 10,5	33,8 ± 1,7	437,6 ± 42,3
MEF <sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>	85,5 ± 13,3	97,8 ± 14,8	87,0 ± 13,7	21,8 ± 4,1	136,4 ± 16,0

Przedstawiono wartości średnie zużycia tlenu w przeliczeniu na mg białka w jednostce czasu (pmol O<sub>2</sub> x sek<sup>-1</sup>/mg) wraz z odchyleniem standardowym (różnice istotne statystycznie jak na Ryc. 7).

Obniżenie tempa oddychania wszystkich trzech linii MEF po podaniu oligomycyny wskazuje, że we wszystkich badanych typach MEF mitochondria są sprzężone, a przepływ protonów przez błonę mitochondriów jest związany z syntezą ATP. Poprzez podawanie kolejnych porcji CCCP osiągnięto maksymalne tempo zużycia tlenu dla poszczególnych

typów MEF. Najwyższą wartość zaobserwowano dla MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i wynosiło ono  $437,6 \pm 42,3$  pmol O<sub>2</sub> \* sek<sup>-1</sup>/mg, podczas gdy  $323,5 \pm 56,1$  dla MEFwt oraz  $136,4 \pm 16,0$  dla MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> (Ryc. 7).

Zaobserwowano, że komórki MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> charakteryzuje podwyższone tempo zużycia tlenu także w nieobecności glukozy i pirogronianu. (Ryc. 7), co może oznaczać, że różnice w tempie oddychania w tych warunkach nie wynikają z ograniczonej dostępności substratów oddechowych. Z kolei w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> zaobserwowano obniżenie tempa oddychania w każdych warunkach doświadczenia tj. w obecności substratów oddechowych, jak i po podaniu CCCP (Ryc. 7). Poszczególne wartości zużycia tlenu przez komórki MEF w warunkach dostępności substratów oddechowych oraz po podaniu oligomycyny i CCCP przedstawiono w tabeli nr 1.

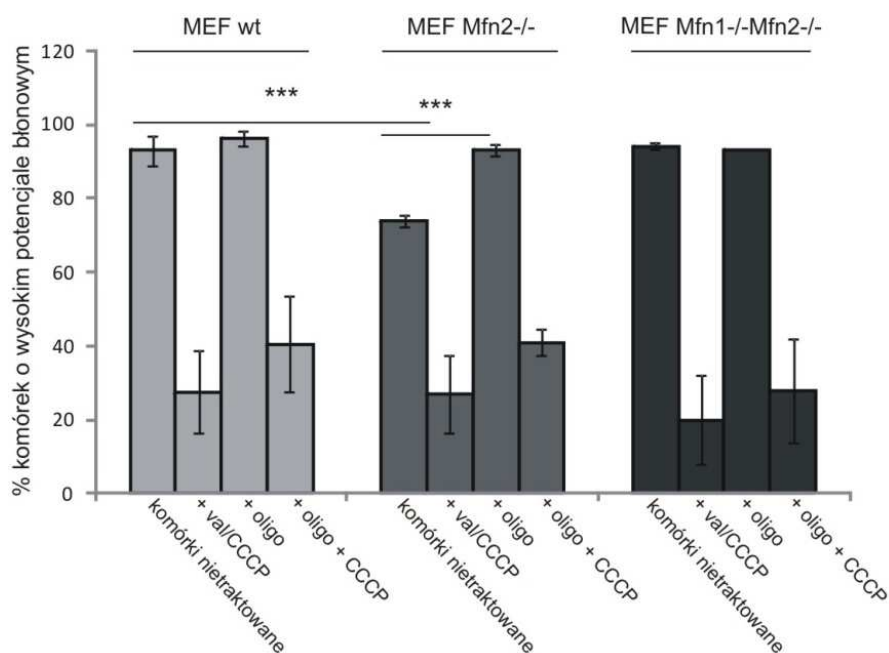
#### 4.2.2 Potencjał błonowy mitochondriów

Ocenę potencjału błonowego mitochondriów prowadzono z wykorzystaniem cytometru przepływowego po podaniu sondy fluorescencyjnej JC-1. W pierwszej kolejności, dla każdej linii MEF obserwowano rozkład populacji komórek w zależności od ich wielkości i kształtu, by na tej podstawie zakwalifikować do doświadczenia komórki nieuszkodzone (komórki bramkowane stanowiące 100%). Pomiar fluorescencji prowadzono dla komórek nietraktowanych oraz po podaniu inhibitora syntazy ATP, oligomycyny. Pomiar fluorescencji po inkubacji komórek z mieszaniną związków znoszących potencjał błonowy mitochondriów (CCCP i walinomycyna) stanowił kontrolę negatywną.

Wyniki przedstawiono jako procent komórek bramkowanych o wysokim potencjale błonowym mitochondriów (czemu odpowiadał wysoki stosunek fluorescencji JC-1).

Zaobserwowano, że udział komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> o wysokim potencjale błonowym mitochondriów był znacząco niższy ( $p < 0,001$ ) niż w przypadku komórek kontrolnych MEFwt oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> (Ryc. 8). Udział komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> o wysokim potencjale błonowym mitochondriów wynosił  $75,1\% \pm 0,8$ , podczas gdy  $90,3\% \pm 1,0$  w MEFwt oraz  $94,4\% \pm 1,1$  w MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.

Odsetek komórek MEFwt oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> o wysokim potencjale błonowym mitochondriów nie ulegał zmianie po inkubacji z oligomycyną i wynosił odpowiednio  $96,1\% \pm 2,1$  i  $93,6\% \pm 0,3$ . Natomiast dla komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> inkubowanych z oligomycyną obserwowano wzrost liczby komórek o wysokim potencjale błonowym mitochondriów do wartości  $93,0\% \pm 1,9$  ( $p < 0,001$ ).



**Ryc. 8. Potencjał błonowy mitochondriów w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>**

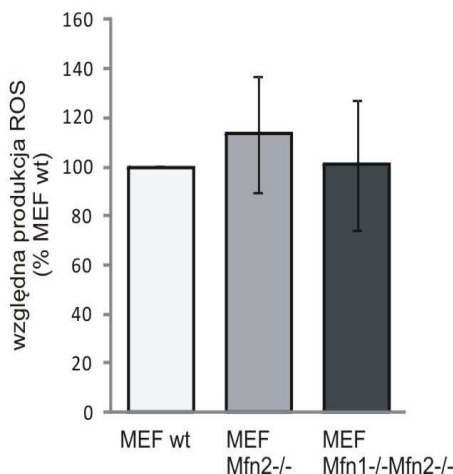
Potencjał błonowy mitochondriów mierzono na podstawie fluorescencji sondy JC-1, metodą cytometrii przepływowej. Pomiar fluorescencji poprzedzał wybór populacji komórek nieuszkodzonych (100%). W wybranej populacji komórek fluorescencją sondy mierzono w roztworze PBS oraz po inkubacji z oligomycyną. Pomiar fluorescencji w obecności związków znoszących potencjał błonowy (walinomycyna, CCCP) stanowił kontrolę negatywną. Wyniki przedstawiono jako procent komórek o wysokim potencjale błonowym mitochondriów w wybranej populacji komórek (wartości średnie z odchyleniem standardowym; n = 4). Val – walinomycyna, oligo – oligomycyna; \*\*\*p < 0,001; istotność statystyczną wyliczono w oparciu o test t-Studenta.

Wzrost liczby komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> o wysokim potencjale błonowym mitochondriów w obecności oligomycyny może sugerować, że w komórkach tych dochodzi do zaburzeń w tworzeniu (efektywność łańcucha oddechowego) lub wykorzystywaniu (efektywność fosforylacji ADP) gradientu protonów, raczej bez upośledzenia sprzężenia oksydacyjnej fosforylacji. W celu wyjaśnienia tego zjawiska, w dalszych etapach pracy, analizowano udział syntazy ATP w metabolizmie mitochondrialnym.

#### 4.2.3 Wytwarzanie reaktywnych form tlenu

Pomiędzy poszczególnymi typami MEF nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ilości reaktywnych form tlenu w przyjętych warunkach doświadczalnych (Ryc. 9). Ilość reaktywnych form tlenu w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wynosiła  $113,3 \pm 23,7\%$  w stosunku do MEFwt oraz  $88,3 \pm 11,4\%$  w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.





**Ryc. 9. Wytwarzanie reaktywnych form tlenu w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup>**

Tworzenie reaktywnych form tlenu (ROS) badano za pomocą sondy fluorescencyjnej DFFH2-DA. Pomiar fluorescencji miał miejsce po 30 min. inkubacji komórek w 37°C w buforze PBS z dodatkiem sondy i substratów oddechowych: 5,6 mM glukozy i 1 mM pirogronianu. Wyniki przedstawiono w stosunku do MEFwt; przedstawiono wartości średnie z odchyleniem standardowym, n = 4.

#### 4.2.4 Wytwarzanie ATP

Wytwarzanie ATP oceniano w warunkach dostępności glukozy (Ryc. 10 A), jak i dla komórek inkubowanych w środowisku nie zawierającym glukozy (Ryc. 10 B). Za pomocą inhibitora oksydacyjnej fosforylacji (0,1 µg/ml oligomycyny) oraz inhibitora glikolizy (1 mM jodooctanu sodu) zbadano, jaki jest udział tych procesów w syntezie ATP w każdym typie MEF.

Nie wykazano różnic w ilości ATP w komórkach inkubowanych w obecności glukozy. Zawartość ATP wyrażona w nanomolach na miligram białka w poszczególnych typach MEF wynosiła: 23,0 ± 4,1 dla MEFwt, 19,5 ± 3,6 dla MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz 20,7 ± 6,3 dla MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup>.

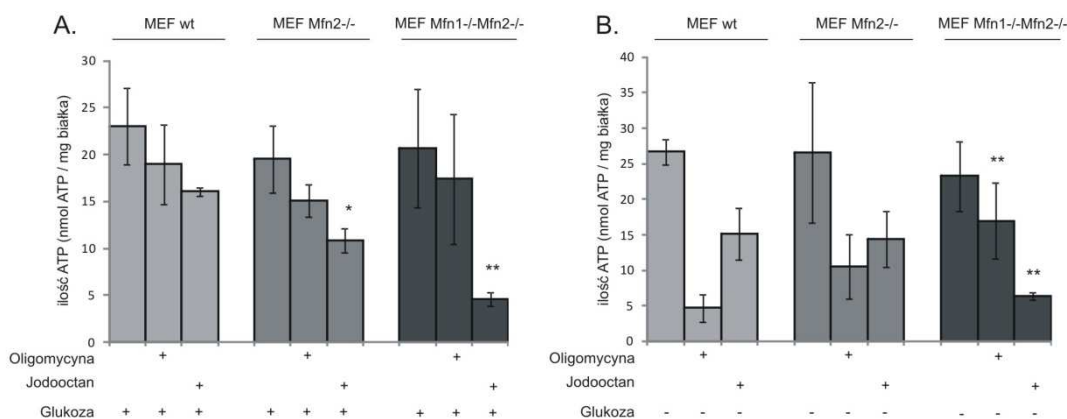
W obecności glukozy skutki podania oligomycyny na wytwarzanie ATP w poszczególnych typach MEF były podobne. Natomiast zaobserwowano różną wrażliwość komórek na jodooctanu sodu. Ilość ATP po inkubacji z jodooctanem sodu wynosiła 16,1 ± 0,5 dla MEFwt, 10,8 ± 1,3 dla MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz 4,6 ± 0,7 nmol/mg białka dla MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup>.

Synteza ATP przez komórki MEF w środowisku niezawierającym glukozy również była jednakowa i wynosiła: 26,6 ± 1,8 dla MEFwt, 26,5 ± 9,9 dla MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz

23,3 ± 4,9 nmol/mg białka dla MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Natomiast efekt działania inhibitorów oksydacyjnej fosforylacji i glikolizy był zdecydowanie różny w zależności od typu MEF.

W obecności oligomycyny ilość ATP wytwarzanego przez poszczególne typy MEF wynosiła: 4,7 ± 1,9 dla MEFwt, 10,5 ± 4,5 dla MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz 17,0 ± 5,4 dla MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Natomiast po inkubacji z jodoocetanem sodu: 15,2 ± 3,6 dla MEFwt, 14,4 ± 3,9 dla MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz 6,3 ± 0,6 nmol/mg dla MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.

Różnice w wytwarzaniu ATP w obecności inhibitorów oksydacyjnej fosforylacji i glikolizy sugerują różny udział tych procesów w metabolizmie poszczególnych typów MEF. W komórkach kontrolnych MEFwt oligomycyna znacznie bardziej upośledzała syntezę ATP niż jodoocetan sodu, co sugeruje, że produkcja ATP w komórkach prawidłowych odbywa się przede wszystkim w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Odwrotny efekt zaobserwowano dla MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, sugerując z kolei przeważający udział glikolizy w syntezie ATP. Natomiast w przypadku komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> efekt działania inhibitorów glikolizy i oksydacyjnej fosforylacji był podobny, co wskazuje na porównywalny udział tych procesów w syntezie ATP.



**Ryc. 10. Wytwarzanie ATP w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Udział oksydacyjnej fosforylacji i glikolizy w całkowitej produkcji ATP.**

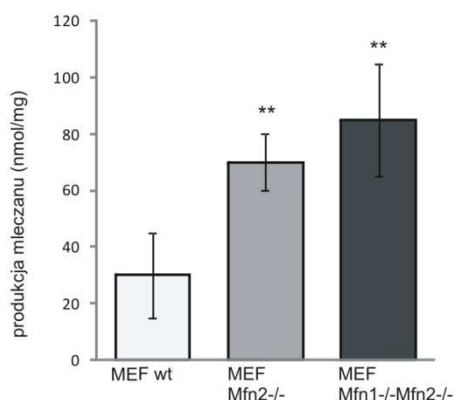
Stężenie ATP mierzono spektrofлуorymetrycznie, w reakcji enzymatycznej katalizowanej dehydrogenazą glukozo-6-fosforanową i heksokinazą, w ekstraktach komórkowych przygotowywanych poprzez inkubację komórek MEF z 4% kwasem nadchlorowym. Zebranie ekstraktów poprzedzała 10 min. inkubacja komórek w buforze Krebsa-Henseleita z 1 mM pirogronianem i 5,6 mM glukozą (A) oraz bez dodatku glukozy (B). Gdzie wskazano, zastosowano inhibitor oksydacyjnej fosforylacji (0,1 mg/ml oligomycyny) lub inhibitor glikolizy (1 mM jodoocetan sodu). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości stężenia ATP wraz z odchyleniem standardowym (nmol ATP/mg); n = 3-5, \*p<0,01 oraz \*\*p<0,005 vs. MEFwt.

Różnice w wytwarzaniu ATP pomiędzy typami MEF w obecności inhibitorów wskazują na zwiększony udział glikolizy beztlenowej w metabolizmie MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> w odniesieniu do MEFwt. Udział tego procesu w metabolizmie MEF potwierdzono na podstawie pomiarów szybkości wytwarzanie mleczanu.

#### 4.2.5 Wytwarzanie mleczanu

Wzrost stężenia mleczanu jest zjawiskiem wynikającym z nasilonej glikolizy i stanowi ważny parametr w ocenie charakteru metabolizmu energetycznego komórki.

Zaobserwowano ponad 2,5-krotny wzrost wytwarzania mleczanu przez komórki MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> w stosunku do MEFwt (Ryc. 11). Ilość mleczanu wytwarzanego przez MEFwt wynosiła  $28,7 \pm 18,7$  nmol/mg, podczas gdy  $65,6 \pm 11,5$  dla MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz  $84,5 \pm 19,1$  MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Zwiększona biosynteza mleczanu przez komórki MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> potwierdza zwiększony udział glikolizy beztlenowej w ich metabolizmie.



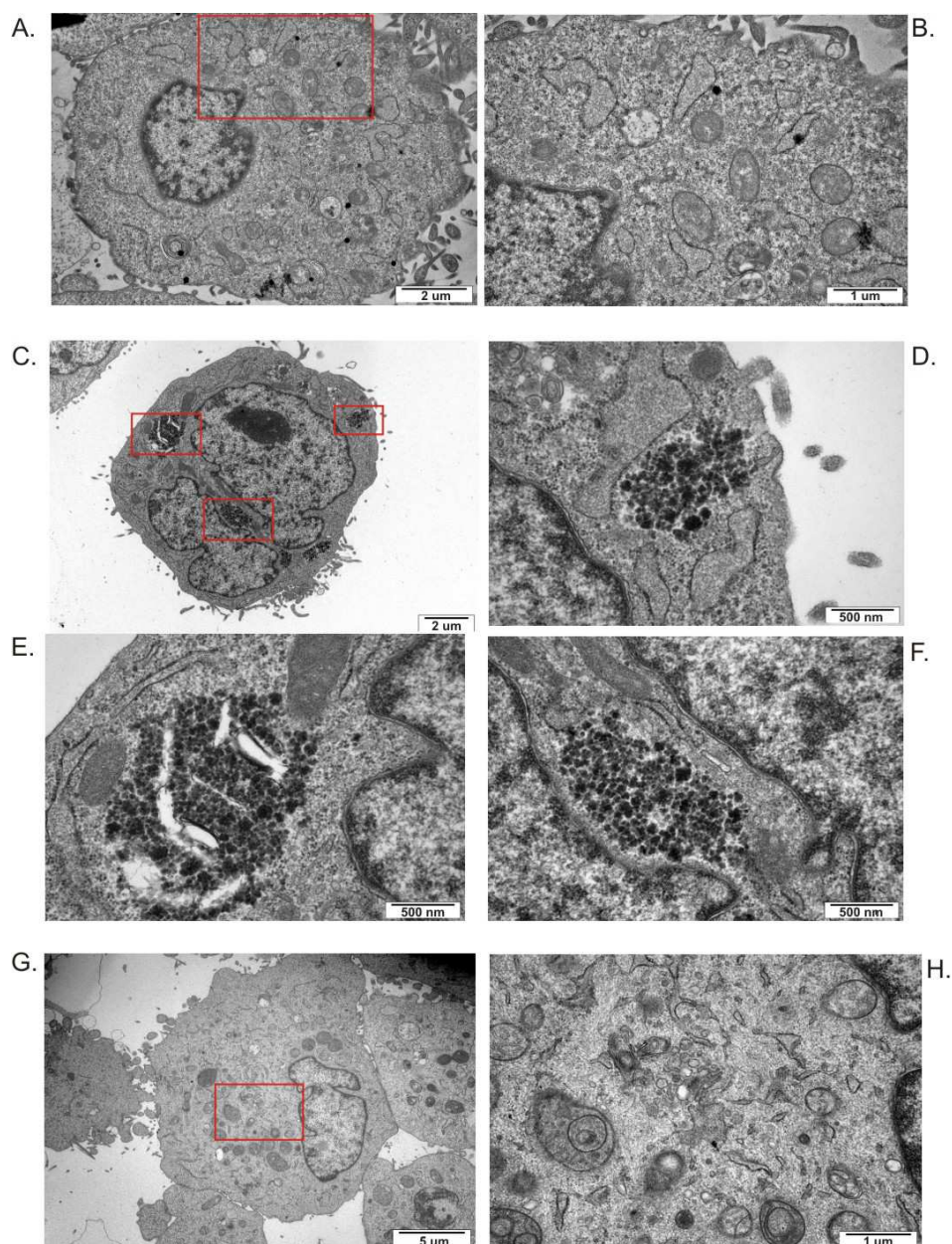
**Ryc. 11. Biosynteza mleczanu w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.**

Stężenie mleczanu mierzono spektrofotometrycznie, w reakcji enzymatycznej katalizowanej dehydrogenazą mleczanową, w ekstraktach komórkowych przygotowywanych poprzez inkubację komórek MEF z 4% kwasem nadchlorowym. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ilości mleczanu wraz z odchyleniem standardowym (nanomole/mg białka); n=6; \*\*p<0,005 vs. MEFwt.

#### 4.2.6 Obecność glikogenu

Obecność glikogenu oceniano na podstawie obserwacji komórek MEF w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (Ryc. 12). Dodatkowo dla każdego typu MEF obliczono odsetek komórek, w których zaobserwowano glikogen.

Ilość glikogenu w komórkach kontrolnych MEFwt była znikoma. Obecność glikogenu zaobserwowano tylko w 3% komórek MEFwt. Nieco więcej komórek zawierających glikogen, bo ok. 8%, zaobserwowano dla MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Natomiast liczba komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> zawierających glikogen była znacząca i wynosiła 27%. Ponadto w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> skupiska glikogenu obserwowano zarówno w cytoplazmie, jak i w mitochondriach (Ryc. 12).



**Ryc. 12. Ocena występowania glikogenu w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> na podstawie obserwacji mikroskopowej**

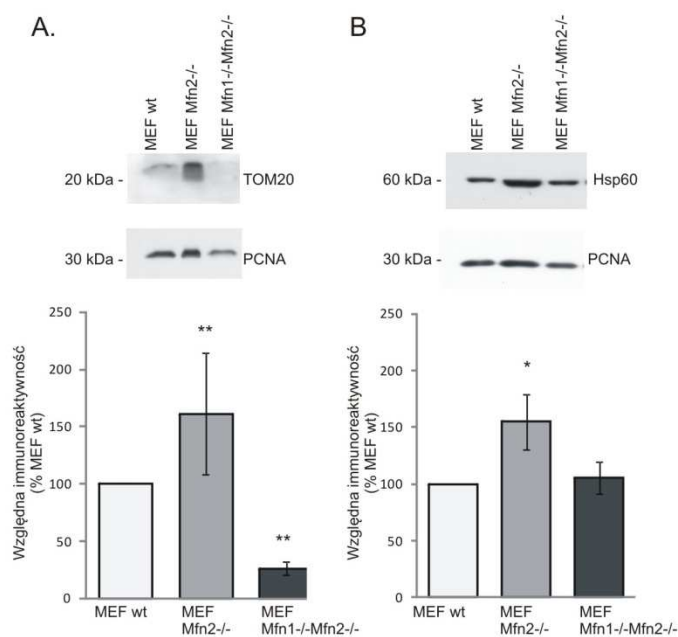
Wybrane zdjęcia komórek MEFwt (A, B), MEF<sup>Mfn2-/-</sup> (C, D, E, F) oraz MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> (G, H) wykonane techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Czerwona ramka wskazuje obszar widoczny w powiększeniu (B, D, E, F oraz H). Komórki MEFwt charakteryzowało równomierne rozproszenie organelli w cytoplazmie (A). Mitochondria wykazywały regularny kształt z widocznymi grzebieniami mitochondrialnymi (B). Nie zaobserwowano obecności glikogenu. Skupiska glikogenu w postaci ziaren o dużej gęstości optycznej obserwowano w komórkach MEF<sup>Mfn2-/-</sup> (C, D, E, F). Ziarna glikogenu obserwowano zarówno w cytoplazmie komórki (D, F), jak i w zmienionych mitochondriach (E). Natomiast w komórkach MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> ilość glikogenu była znikoma (G, H). Dodatkowo zaobserwowano zaburzenia rozmieszczenia i kształtu mitochondriów (G), a w samych mitochondriach liczne zaburzenia formowania grzebieni (H). fot. dr hab. n. med. Małgorzata Frontczak-Baniewicz.

Zwiększenie ilości zmagazynowanego glikogenu może wskazywać na adaptację komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> do beztlenowego przekształcania glukozy i zaspokajanie zapotrzebowania energetycznego na drodze fosforylacji substratowej. Niewielka ilość glikogenu w MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> może wynikać z bardziej kompleksowych zmian dotyczących metabolizmu tych komórek, m.in. bardzo nasilonej glikolizy.

#### 4.2.7 Immunoreaktywność Tom20 i Hsp60

Zwiększenie szybkości oddychania komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> (Ryc. 7) może, jak wspomniano wcześniej, sugerować zwiększenie ilości mitochondriów na skutek ich zwiększonej biogenezy. W celu weryfikacji tej koncepcji wykonano szereg doświadczeń, których wyniki przedstawione są w tym i w kolejnych podrozdziałach.

Ilość mitochondriów oceniano na podstawie immunoreaktywności białka Tom20 w ekstraktach komórkowych rozdzielonych metodą elektroforezy SDS-PAGE (Ryc. 13 A).



**Ryc. 13. Ilość mitochondriów w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oceniana na podstawie immunoreaktywności białek mitochondrialnych: Tom20 i Hsp60**

Immunoreaktywność białek mitochondrialnych: Tom20 (A) oraz Hsp60 (B) analizowano metodą western blot po uprzednim rozdzieleniu elektroforetycznym metodą SDS-PAGE ekstraktów komórkowych MEF. Przedstawiono reprezentatywny western blot (wraz z jądrowym białkiem, PCNA, stanowiącym kontrolę prawidłowego nałożenia próbek na żel) oraz względną immunoreaktywność, wyliczoną w stosunku do MEFwt; przedstawiono średnie wartości immunoreaktywności wraz z odchyleniem standardowym, n=4; \*p<0,05 oraz \*\*p<0,01 vs. MEFwt.

W komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> zaobserwowano wzrost immunoreaktywności białka Tom20 do wartości 161,4% ± 53,0 w stosunku do jego immunoreaktywności w komórkach MEFwt. Natomiast w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> względna immunoreaktywność Tom20 wynosiła 26,3% ± 6,0 (Ryc. 13 A). Istotny wzrost immunoreaktywności Tom20 w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> może wskazywać na zwiększoną ilość mitochondriów w tych komórkach. Analogicznie, można przypuszczać, że w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> ilość mitochondriów jest zmniejszona w stosunku do MEFwt.

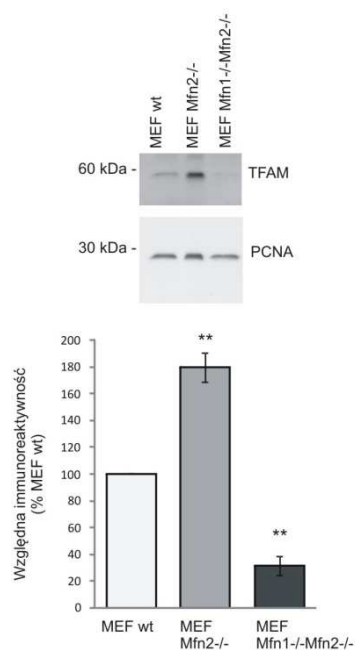
Ocenę ilości mitochondriów poprzez pomiar immunoreaktywności Tom20 uzupełniono oceną immunoreaktywności białka Hsp60. Podobnie, jak Tom20, immunoreaktywność Hsp60 w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> była zwiększona w stosunku do MEFwt i wynosiła 154,7% ± 23,9. Natomiast charakter zmian immunoreaktywności Tom20 i Hsp60 w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> był różny. Względna immunoreaktywność Hsp60 w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, w przeciwieństwie do Tom20, była zbliżona do MEFwt i wynosiła 105,4% ± 13,8 (Ryc. 13 B).

#### 4.2.8 Immunoreaktywność Tfam

Aktywność procesu biogenezy mitochondriów oceniano w ekstraktach komórkowych rozdzielonych metodą elektroforezy SDS-PAGE, na podstawie immunoreaktywności mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A (Tfam). Immunoreaktywność Tfam w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wynosiła 179,7% ± 11,1, podczas gdy 31,3% ± 7,1 w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> (Ryc. 14).

Wzrost immunoreaktywności Tfam w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> może wskazywać na aktywację procesu biogenezy mitochondriów w tych komórkach. Natomiast obniżenie immunoreaktywności obu białek mitochondrialnych, Tom20 i Tfam, w ekstraktach komórkowych MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wydaje się wskazywać na obniżoną (w odniesieniu do MEFwt) ilość mitochondriów w tych komórkach.

Czynnik transkrypcyjny Tfam oddziałuje z mitochondrialnym DNA, zwiększając jego replikację i transkrypcję. Wobec zaobserwowanych różnic immunoreaktywności czynnika Tfam ocenie poddano ilość DNA mitochondrialnego w poszczególnych typach MEF.



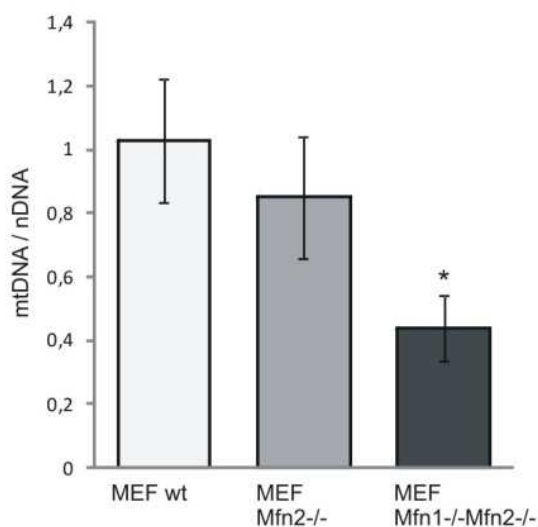
**Ryc. 14. Biogeneza mitochondriów w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> na podstawie immunoreaktywności mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego Tfam**

Immunoreaktywność mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego Tfam badano metodą western blot po uprzednim rozdziale elektroforetycznym metodą SDS-PAGE. Przedstawiono reprezentatywny western blot wraz z jądrowym białkiem PCNA, stanowiącym kontrolę prawidłowego nałożenia próbek na żel. Względna immunoreaktywność Tfam wyliczono w stosunku do MEFwt. Przedstawiono wartości średnie immunoreaktywności Tfam z odchyleniem standardowym, n= 4; \*\*p<0,01 vs. MEFwt.

#### 4.2.9 Ilość mitochondrialnego DNA

Ilość mitochondrialnego DNA oceniano metodą PCR w czasie rzeczywistym i przedstawiono w odniesieniu do jądrowego DNA (mtDNA/nDNA).

Zaobserwowano, że stosunek mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> był nieznacznie obniżony w odniesieniu do komórek prawidłowych i wynosił  $0,85 \pm 0,19$  (Ryc. 15). Natomiast znaczne obniżenie stosunku mtDNA/nDNA obserwowano w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Stosunek mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wynosił  $0,44 \pm 0,10$ .



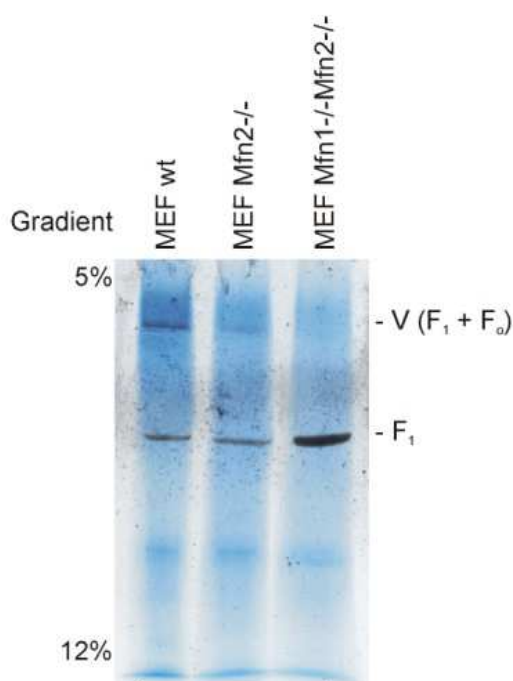
**Ryc. 15. Względna ilość mitochondrialnego DNA wyrażona jako stosunek ilości mtDNA/nDNA w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.**

Ilość mitochondrialnego DNA oznaczono metodą PCR w czasie rzeczywistym i wyrażono w stosunku do jądrowego DNA (mtDNA/nDNA). Ilość DNA mitochondrialnego oznaczano poprzez użycie specyficznych starterów rozpoznających rejon pętli D w genomie mitochondrialnym. Natomiast ilość DNA jądrowego oceniano na podstawie ekspresji genu kinazy tymidynowej. Przedstawiono wartości średnie stosunku mtDNA/nDNA z odchyleniem standardowym; n=6, \*p<0,05 vs. MEFwt.

#### 4.2.10 Aktywność syntazy ATP

Aktywność syntazy ATP oceniano w żelu po rozdziale elektroforetycznym metodą Blue Native – PAGE.

W komórkach prawidłowych MEFwt w reakcji enzymatycznej specyficznej dla syntazy ATP wykazano powstanie dwóch prążków i stwierdzono znaczną przewagę prążka o większej masie molekularnej, odpowiadającego złożonemu kompleksowi syntazy ATP ( $F_1 + F_0$ ). Natomiast w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, a tym bardziej MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> obserwowano przewagę prążka o mniejszej masie molekularnej, odpowiadającego wolnej podjednostce  $F_1$ . Zjawisku temu towarzyszyło ubywanie prążka odpowiadającego kompletnemu kompleksowi syntazy ATP (Ryc. 16).



**Ryc. 16. Aktywność syntazy ATP w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.**

Aktywność syntazy ATP badano we frakcji bogatej w mitochondria (P2) po rozdziale metodą elektroforezy natywnej Blue Native PAGE w gradientowym żelu poliakrylamidowym. Aktywność syntazy ATP analizowano na podstawie reakcji enzymatycznej w buforze reakcyjnym: 35 mM TrisHCl, 270 mM glicyna o pH 8,3-8,6, 14 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 8 mM ATP. Obserwowano powstanie dwóch prążków o aktywności enzymatycznej, odpowiadających kompletnemu kompleksowi syntazy ATP oraz wolnej podjednostce  $F_1$ . Przedstawiono obraz żelu po reakcji enzymatycznej, reprezentatywny dla trzech niezależnych doświadczeń.

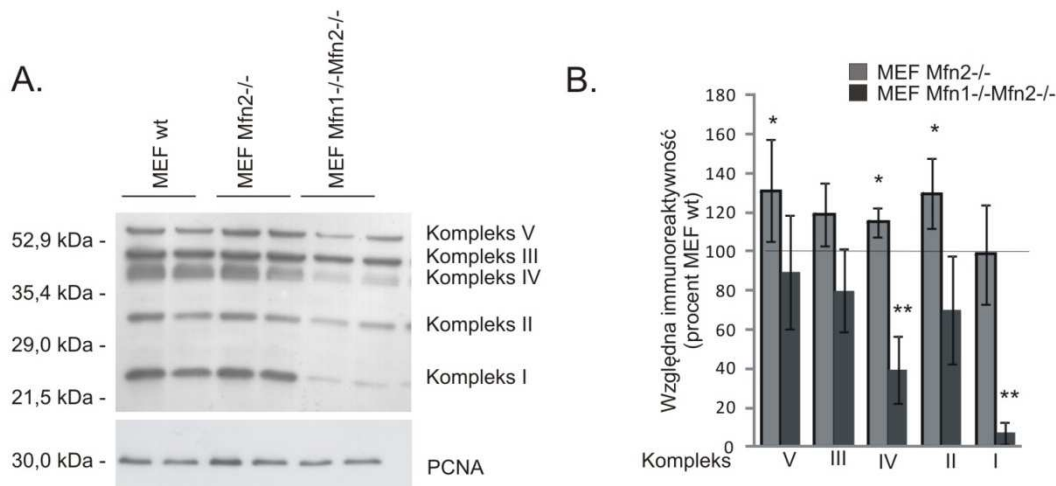
#### 4.2.11 Immunoreaktywność wybranych białek kompleksów oddechowych i syntazy ATP

Doświadczenia wykonano za pomocą metody western blot z wykorzystaniem zestawu przeciwciał, umożliwiającego jednoczesną analizę białek reprezentujących wszystkie kompleksy oddechowe oraz syntazę ATP.

Wykazano, że w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> dochodzi do wzrostu immunoreaktywności białek kompleksów oddechowych, w szczególności drugiego, czwartego i piątego.



Natomiast w przypadku MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> immunoreaktywność białek reprezentujących poszczególne kompleksy oddechowe była niższa niż w komórkach prawidłowych. Istotne obniżenie immunoreaktywności w tych komórkach wykazano dla kompleksu pierwszego i czwartego (Ryc. 17).



**Ryc. 17. Immunoreaktywność wybranych białek kompleksów oddechowych w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.**

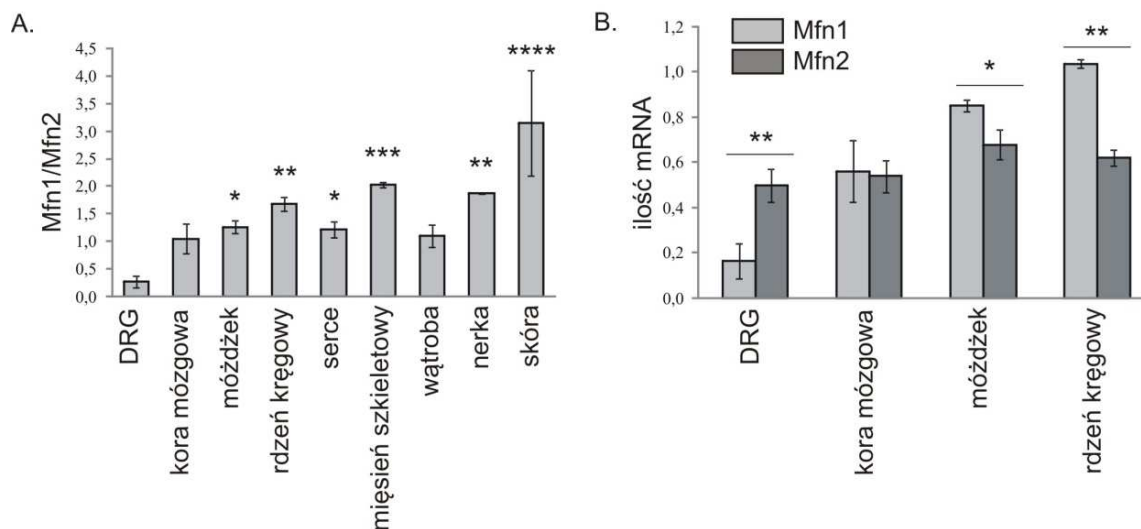
Ekstrakty komórkowe MEF rozdzielano metodą elektroforezy SDS-PAGE, w 12% żelu poliakrylamidowym, po 30 µg białka na ścieżkę. Analizę western blot prowadzono z wykorzystaniem zestawu przeciwciał Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (Abcam), rozpoznających następujące białka: NDUFB8 (kompleks I), CII-30 kD (FeS; kompleks II), białko CIII-Core 2 (kompleks III), podjednostka C-IV-I (kompleks IV); podjednostka C-V-α (kompleks V). Białko jądrowe PCNA (Santa Cruz) stanowiło kontrolę prawidłowego nałożenia próbek na żel. Przedstawiono reprezentatywny western blot (A) oraz wynik analizy densytometrycznej (B). Dane dla każdego kompleksu przedstawiono jako wartości względne immunoreaktywności w stosunku do MEFwt (średnia immunoreaktywność wraz z odchyleniem standardowym, n=6-12, \*p<0,05, \*\*p<0,01).

### 4.3 Porównanie ekspresji mitofuzyny 1 i mitofuzyny 2

Stosunek mitofuzyny 1 i mitofuzyny 2 porównano na poziomie transkryptu (Ryc. 18) oraz białka (Ryc. 19) w wybranych narządach myszy. Zwoje czuciowe (DRG) stanowiły reprezentację obwodowego układu nerwowego. Do badań porównawczych włączono także korę mózgu, mózdzek, rdzeń kręgowy, a także wybrane narządy: nerki, serce, wątrobę, mięsień szkieletowy i skórę. Stosowano odpowiednio technikę PCR w czasie rzeczywistym oraz western blot po uprzednim rozdziale elektroforetycznym SDS-PAGE.

### 4.3.1 Analiza porównawcza ilości mRNA kodującego Mfn1 i Mfn2

Stosunek ilości mRNA dla Mfn1 i Mfn2 w zwojach czuciowych wynosił  $0,27 \pm 0,08$  i był najniższy zarówno pośród struktur układu nerwowego, jak i pośród pozostałych badanych narządów (Ryc. 18).



**Ryc. 18. Porównanie ilości mRNA dla Mfn1 i Mfn2 w wybranych narządach myszy**

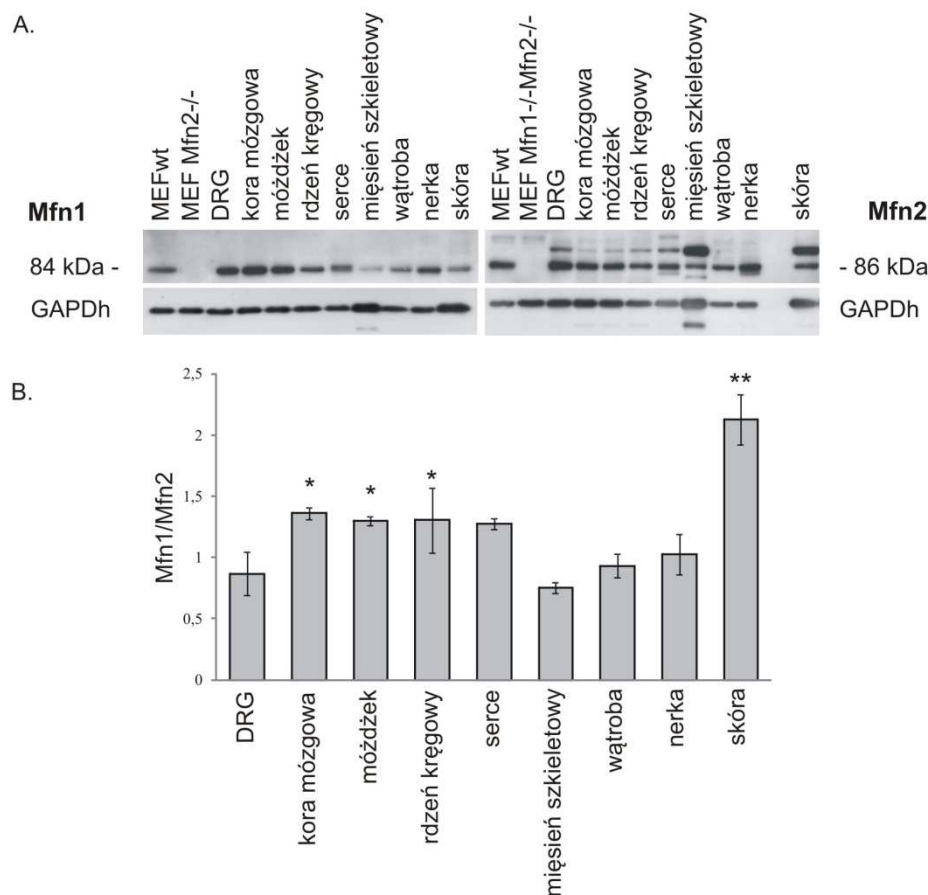
Ekspresję genów mitofuzyny 1 i 2 badano metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki wyliczono w oparciu o metodę  $\Delta\Delta C_t$  i przedstawiono jako: A. średni stosunek ekspresji Mfn1 i Mfn2  $\pm$  odchylenie standardowe (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. DRG) oraz B. wartości ekspresji mRNA dla Mfn1 i Mfn2 w wybranych strukturach układu nerwowego (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; na podstawie testu t-Studenta). Zwoje czuciowe (DRG) reprezentowały obwodowy układ nerwowy.

W zwojach czuciowych ekspresja genu Mfn2 przewyższała prawie trzykrotnie ekspresję Mfn1. Podczas gdy w korze mózgowej ekspresja genów obu mitofuzyn była jednakowa (Mfn1/Mfn2  $1,05 \pm 0,27$ ), w móżdżku i rdzeniu kręgowym Mfn1 przewyższała ekspresję genu Mfn2 (odpowiednio:  $1,26 \pm 0,12$  i  $1,67 \pm 0,12$ ). Ekspresja genu Mfn1 przeważała także we wszystkich pozostałych próbkach, wykazując wartość stosunku Mfn1/Mfn2 powyżej jedności (odpowiednio:  $1,22 \pm 0,14$  w sercu,  $2,04 \pm 0,05$  w mięśniu czworogłowym uda,  $1,10 \pm 0,20$  w wątrobie,  $1,87 \pm 0,01$  w nerce oraz  $3,15 \pm 0,95$  w skórze).

Zaobserwowano także, że w obrębie układu nerwowego ekspresja genu Mfn1 jest znacznie bardziej zróżnicowana, podczas gdy ekspresja Mfn2 utrzymuje się na podobnym poziomie (Ryc. 18 B). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji genu Mfn2 pomiędzy zwojami czuciowymi, korą mózgową, móżdżkiem i rdzeniem kręgowym.

### 4.3.2 Analiza porównawcza immunoreaktywności Mfn1 i Mfn2

Stosunek immunoreaktywności Mfn1 i Mfn2 w zwojach czuciowych wynosił  $0,85 \pm 0,20$ , potwierdzając przewagę Mfn2 nad Mfn1 (Ryc. 19).



**Ryc. 19. Porównanie immunoreaktywności Mfn1 i Mfn2 w wybranych narządach myszy**

Immunoreaktywność badano w ekstraktach komórkowych (30  $\mu$ g) po uprzednim rozdziale metodą elektroforezy SDS-PAGE. Wykorzystano przeciwciała anty-Mfn1 (84 kDa) oraz anty-Mfn2 (86 kDa). Zwoje czuciowe (DRG, ang. Dorsal Root Ganglia) reprezentowały obwodowy układ nerwowy. GAPDh stanowiło kontrolę prawidłowego nałożenia próbek na żel. Ekstrakty komórek MEF stanowiły odpowiednio kontrolę pozytywną (MEFwt) oraz negatywną (MEF<sup>Mfn2-/-</sup> oraz MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup>) specyficzności przeciwciał anty-Mfn1 i anty-Mfn2.

Przedstawiono reprezentatywny western blot (A) oraz dane uzyskane na drodze analizy densytometrycznej (B). Immunoreaktywność mitofuzyny w poszczególnych tkankach przeliczano w odniesieniu do MEFwt, a na podstawie otrzymanych wartości gęstości optycznej wyliczano stosunek Mfn1/Mfn2. Przedstawiono wartości średnie stosunku Mfn1 i Mfn2 z co najmniej trzech niezależnych doświadczeń z odchyleniem standardowym; \* $p < 0,05$  oraz \*\* $p < 0,01$  vs. DRG.

Większą ilość Mfn2 obserwowano także w mięśniu szkieletowym i wątrobie (odpowiednio:  $0,46 \pm 0,38$  i  $0,80 \pm 0,49$ ). We wszystkich pozostałych próbkach przeważała obecność Mfn1, o czym świadczyła większa od jedności wartość stosunku

Mfn1 i Mfn2 ( $1,44 \pm 0,17$  w korze mózgowej,  $1,37 \pm 0,17$  w mózdzku,  $1,22 \pm 0,25$  w rdzeniu kręgowym,  $1,06 \pm 0,47$  w sercu,  $1,08 \pm 0,44$  w nerce oraz  $2,27 \pm 0,78$  w skórze).

Analizy western blot z użyciem przeciwciała anti-Mfn2 wykazały obecność dodatkowego prążka o nieco większej masie molekularnej (Ryc. 19 A). Dodatkowy prążek był szczególnie widoczny w ekstraktach komórkowych mięśnia i skóry, a w mniejszym stopniu także w sercu i zwojach czuciowych.

Analiza ekspresji genów Mfn1 i Mfn2 na poziomie mRNA, jak i na poziomie białka wykazała przewagę Mfn2 w zwojach czuciowych. Ta zależność była bardziej zaznaczona na poziomie transkryptów. Niemniej jednak oba wyniki wydają się potwierdzać hipotezę o stosunkowo niskiej ekspresji Mfn1 w nerwach obwodowych.

#### **4.4 Wpływ Mfn2 prawidłowej oraz z mutacją na stosunek ilości mtDNA/nDNA**

Na podstawie dokonanej charakterystyki porównawczej trzech typów komórek MEF do dalszych prac nad testem patogenności mutacji Mfn2 wybrano stosunek ilości mitochondrialnego DNA do jądrowego DNA (mtDNA/nDNA).

Zmiany stosunku mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> oceniano po nadekspresji prawidłowego genu ludzkiej mitofuzyny 2 (wtMfn2) oraz z mutacjami, jak opisano w podrozdziale 3.1.1.3.

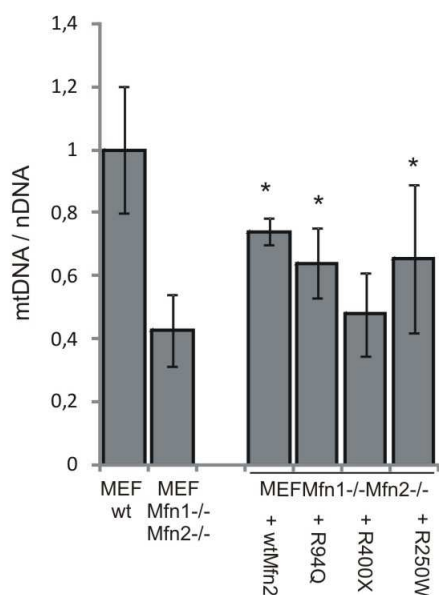
Zmiany stosunku mtDNA/nDNA po transfekcji badano w komórkach MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup>. Wybór ten podyktowany był pozytywnym zweryfikowaniem hipotezy o stosunkowo niskiej ekspresji Mfn1 w obwodowym układzie nerwowym. Ponadto w komórkach MEF<sup>Mfn2-/-</sup> nie obserwowano istotnych różnic ilości mtDNA w porównaniu do MEFwt.

Zmiany stosunku mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> oceniano po transfekcji prawidłowym genem Mfn2 (wtMfn2) oraz genem z mutacją i przedstawiano w odniesieniu do MEFwt, w których stosunek mtDNA/nDNA przyjęto za 1,0 (Ryc. 20).

Wykazano, że na skutek nadekspresji genu prawidłowej Mfn2 stosunek mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup> zwiększał się istotnie z  $0,43 \pm 0,11$  do  $0,74 \pm 0,04$ . Po transfekcji plazmidem z mutacją R400X nie zaobserwowano zmian stosunku mtDNA/nDNA w odniesieniu do nietransferowanych komórek MEF<sup>Mfn1-/-Mfn2-/-</sup>. Stosunek mtDNA/nDNA po transfekcji wynosił  $0,48 \pm 0,13$ . Natomiast po transfekcji

komórek MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> plazmidem z mutacją R94Q oraz R250W zaobserwowano istotny wzrost stosunku mtDNA/nDNA do wartości (odpowiednio)  $0,64 \pm 0,11$  oraz  $0,65 \pm 0,24$ .

Jednocześnie, transfekcja komórek MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> plazmidem nie niosącym genu Mfn2 nie zmieniała stosunku mtDNA/nDNA.



**Ryc. 20. Wpływ Mfn2 prawidłowej oraz z mutacją na stosunek mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>**

Przedstawiono stosunek mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> po transfekcji prawidłowym genem mitofuzyny 2 (wtMfn2) oraz z mutacją R94Q, R400X i R250W. Wartości stosunku mtDNA/nDNA przedstawiono względem MEFwt, w których stosunek mtDNA/nDNA przyjęto za 1,0. Ilość DNA oznaczono metodą PCR w czasie rzeczywistym. Przedstawiono wartości średnie z odchyleniem standardowym; n = 5 - 12; \*p<0,05 vs. MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.

## 5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

### Tempo podziału

Komórki MEF z delecją genu *Mfn2* (MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>) charakteryzowały się zwiększonym tempem podziału w stosunku do komórek prawidłowych MEFwt.

Komórki MEF z delecją genów *Mfn1* i *Mfn2* (MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>) wykazywały najmniejsze tempo podziału, znacząco niższe od MEFwt.

### Charakterystyka porównawcza

Delecja genu *Mfn2* w komórkach MEF powodowała:

- istotne zwiększenie tempa zużycia tlenu;
- zwiększenie ilości białka Tfam będącego markerem biogenezy mitochondriów oraz zwiększoną ilość białek charakterystycznych dla mitochondriów, w tym białek kompleksów oddechowych;
- istotne obniżenie potencjału błonowego mitochondriów;
- zwiększony udział glikolizy beztlenowej w metabolizmie energetycznym komórek, o czym świadczyło jednakowe obniżenie wytwarzania ATP w obecności inhibitorów oksydacyjnej fosforylacji i glikolizy beztlenowej, wzrost stężenia mleczanu oraz występowanie glikogenu;
- zaburzenia tworzenia kompleksu i aktywności syntazy ATP.

Delecja genów *Mfn1* i *Mfn2* w komórkach MEF powodowała:

- istotne zmniejszenie tempa oddychania komórkowego;
- obniżenie ilości białka Tfam będącego markerem biogenezy mitochondriów oraz białek charakterystycznych dla mitochondriów, w tym białek kompleksów oddechowych;
- obniżenie stosunku mtDNA/nDNA;
- przeważający udział glikolizy beztlenowej, o czym świadczył ponad 2,5-krotny wzrost stężenia mleczanu oraz znaczące obniżenie wytwarzania ATP w obecności inhibitora glikolizy beztlenowej;
- prawie całkowity brak pełnego kompleksu syntazy ATP.

Pomimo różnej aktywności metabolicznej mitochondriów w komórkach MEFwt, MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> nie wykazano różnic w tworzeniu reaktywnych form tlenu.

### **Porównanie ekspresji genów mitofuzyny 1 i mitofuzyny 2 na poziomie mRNA oraz białka**

Stosunek ilości mRNA Mfn1/Mfn2 w zwojach czuciowych myszy okazał się najniższy, zarówno pośród struktur układu nerwowego, jak i w porównaniu do struktur obwodowych.

Analiza western blot wykazała przewagę białka Mfn2 nad Mfn1 w zwojach czuciowych, choć zjawisko to nie było tak znaczące jak dla mRNA.

Ilość mRNA dla Mfn1 w wybranych strukturach układu nerwowego była znacznie bardziej zróżnicowana od ilości mRNA dla Mfn2.

### **Wpływ Mfn2 prawidłowej oraz z mutacją na stosunek ilości mtDNA/nDNA**

Na skutek nadekspresji prawidłowego genu Mfn2 obserwowano wzrost stosunku mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.

Nadekspresja genu kodującego Mfn2<sup>R94Q</sup> oraz Mfn2<sup>R250W</sup> podnosiła stosunek mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, jednak w mniejszym stopniu niż nadekspresja genu prawidłowej Mfn2.

Nadekspresja genu kodującego Mfn2<sup>R400X</sup> nie zwiększała stosunku mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.

## 6. DYSKUSJA

Choroby kręgu CMT stanowią najliczniejszą grupę polineuropatii uwarunkowanych genetycznie. Ze względu na powszechność występowania stanowią przedmiot badań na całym świecie. CMT typu 2A stanowi najczęstszą formę aksonalną choroby CMT. Liczne badania wskazują, że mutacje w genie mitochondrialnego białka, Mfn2, stanowią główną przyczynę CMT2A [4,12]. Dotychczas zidentyfikowanych zostało ponad 100 mutacji patogennych związanych z rozwojem CMT2A. Prowadzone badania dostarczają informacji o kolejnych mutacjach opisywanych w poszczególnych populacjach, jak i podejmowane są liczne próby wyjaśnienia mechanizmu uszkodzenia aksonów obserwowanego u chorych z CMT2A.

Pomimo rosnącej wiedzy, diagnostyka chorych wciąż stanowi duże wyzwanie. Wobec występowania licznych polimorfizmów w genie Mfn2 oraz różnorodności fenotypowej wśród chorych, diagnostyka oparta na badaniach neurologicznych i genetycznych może okazać się niewystarczająca do postawienia pełnej diagnozy. Dlatego też podjęto próbę stworzenia testu diagnostycznego opartego o ocenę skutków funkcjonalnych mutacji Mfn2.

Jak wykazały badania Chen i wsp. mitofuzyna jest niezbędna w rozwoju embrionalnym. Brak Mfn2 prowadzi do wytworzenia nieprawidłowego łożyska i obumarcia płodów [22]. Z tego względu dotąd nie opracowano zwierzęcego modelu badawczego, w którym ekspresja mitofuzyny byłaby całkowicie zahamowana. Metodami zaawansowanej inżynierii genetycznej uzyskano zwierzęta transgeniczne (głównie gryzonie), u których ekspresja mitofuzyny była zahamowana wybiórczo i warunkowo w określonych strukturach, m.in. w nerwach obwodowych [56] lub w wątrobie [31]. Natomiast z zarodków myszy wyprowadzone zostały linie embrionalnych fibroblastów typu dzikiego oraz z delecją genów Mfn1 i Mfn2. Komórki te od lat stanowią powszechnie stosowany model do badań funkcji mitofuzyny [22].

W niniejszym projekcie dokonano charakterystyki porównawczej trzech typów mysich embrionalnych fibroblastów: prawidłowych, z delecją genu Mfn2 oraz genów Mfn1 i Mfn2. Badania zaplanowano w oparciu o hipotezę, że mutacje w genie białka mitochondrialnego, jakim jest mitofuzyna 2, będą upośledzać głównie mitochondria, a zatem możliwości i sposoby tworzenia związków wysokoenergetycznych w komórkach. Uzasadnienie dla podjęcia takiej hipotezy stanowiły prace, opisujące zaburzenia funkcji



mitochondriów w komórkach, w których ekspresja genu prawidłowej Mfn2 była ograniczona.

Mitofuzyna 2, obok mitofuzyny 1 i Opa1, jest jednym z najważniejszych białek odpowiadających za proces fuzji mitochondriów [24]. Zachowanie właściwej dla stanu komórki proporcji pomiędzy procesami fuzji i podziału mitochondriów, a więc sieci mitochondrialnej, jest niezbędne do prawidłowego przebiegu oksydacyjnej fosforylacji, stanowiącej najbardziej efektywne źródło ATP w komórce. Wykazano, że zaburzeniom ekspresji genu mitofuzyny 2 towarzyszą zmiany struktury sieci mitochondrialnej [22,26,27] oraz liczne zaburzenia metaboliczne [28-31].

W komórkach, w których ekspresja genu Mfn2 była zahamowana obserwowano m. in. zaburzenia metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych, co na poziomie molekularnym objawiało się obniżeniem tempa oddychania komórkowego oraz spadkiem potencjału błonowego mitochondriów [28,30]. Pich i wsp. [30] wykazali, że ograniczeniu ekspresji genu Mfn2 w mięśniach szkieletowych szczura towarzyszy zahamowanie utleniania glukozy i kwasów tłuszczowych, co przynajmniej częściowo wynikało ze zmian ekspresji białek łańcucha oddechowego. Zaburzenia efektywności łańcucha oddechowego, objawiające się obniżeniem potencjału błonowego mitochondriów wykazano także w badaniach na fibroblastach chorych z CMT2A obarczonych mutacją zmiany sensu [37].

Biorąc pod uwagę homologię pomiędzy Mfn1 i Mfn2 oraz możliwość kompensowania niektórych funkcji Mfn2 przez Mfn1, ocenę parametrów metabolicznych prowadzono zarówno dla komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, jak i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Ocena zdolności metabolicznych tych komórek wykazała, że w obu typach MEF z delecją genów mitofuzyny dochodzi do zmiany charakteru metabolizmu, jednak nasilenie tego zjawiska oraz zmiany poszczególnych cech mitochondrialnych były różne (Tabela nr 2).

Jak wiadomo z dotychczasowych publikacji zaburzeniom ekspresji genu Mfn2 towarzyszy zazwyczaj dysfunkcja mitochondriów, szczególnie obniżenie tempa oddychania komórkowego. W prezentowanych tu badaniach dla komórek MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wykazano jednak zwiększone tempo zużycia tlenu (Ryc. 7), przy jednoczesnym zwiększeniu ilości białka Tfam sugerującego nasilenie biogenezy mitochondriów (Ryc. 14) oraz wzroście ilości wybranych białek kompleksów oddechowych (Ryc. 17).

Podobną zależność opisano dla fibroblastów pobranych od chorych z CMT2A obarczonych mutacjami punktowymi w genie Mfn2 [82]. Fibroblasty chorych wykazały zwiększone tempo oddychania komórkowego, co autorzy tłumaczą jako próbę kompensacji zaburzeń efektywności łańcucha oddechowego. Co więcej, wykazano, że

ilość ATP wytwarzanego przez fibroblasty chorych z CMT2A była porównywalna do ilości wytwarzanej przez fibroblasty osób zdrowych, ale powstawanie ATP odbywało się z większym wykorzystaniem substratu kompleksu II (bursztynianu), którego utlenianie dostarcza mniej energii, na co wskazywał zwiększony udział kompleksu II łańcucha oddechowego w porównaniu do fibroblastów kontrolnych. Analogicznie, w przeprowadzonych badaniach wykazano, że ilość ATP powstającego w fibroblastach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> nie różniła się od wykrytego w MEFwt (Ryc. 10). Wykazano również zwiększoną, w stosunku do MEFwt, immunoreaktywność kompleksów oddechowych, w tym także kompleksu II (Ryc. 17).

**Tabela nr 2. Podsumowanie zmian metabolizmu i parametrów mitochondrialnych w komórkach MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> i MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> w porównaniu do prawidłowych fibroblastów myszy.**

	MEF <sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>	MEF <sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>
<b>Tempo podziału</b>	wzrost	obniżenie
<b>Oddychanie komórkowe</b>	wzrost	obniżenie
<b>Potencjał błonowy mitochondriów</b>	obniżenie	bez zmian
<b>Wytwarzanie ATP</b>	bez zmian stężenia; jednakowy udział oksydacyjnej fosforylacji i glikolizy	bez zmian stężenia; przewaga glikolizy
<b>Wytwarzanie mleczanu</b>	wzrost	wzrost
<b>Obecność glikogenu</b>	znaczna	znikoma
<b>Aktywność syntazy ATP</b>	zwiększony udział wolnej podjednostki F <sub>1</sub> kosztem złożonego kompleksu F <sub>0</sub> F <sub>1</sub>	całkowity brak złożonego kompleksu syntazy ATP
<b>Ilość białek charakterystycznych dla mitochondriów</b>	zwiększona	zmniejszona
<b>Markery biogenezy mitochondriów</b>	wzrost	obniżenie
<b>Stosunek mtDNA/nDNA</b>	bez zmian	obniżony
<b>Ilość białek łańcucha oddechowego</b>	zwiększona, w szczególności białko kompleksu II, IV i V	obniżona, w szczególności białko kompleksu I i IV

W przedstawionych tu badaniach obserwowano zwiększone tempo podziałów komórek MEF z delecją genu Mfn2 (Ryc. 6). To zjawisko najprawdopodobniej jest związane z hamującym wpływem Mfn2 na tempo podziału komórek poprzez oddziaływanie Mfn2 z białkami Ras w szlaku kinaz ERK/MAPK [47,55]. Zanim mutacje w genie Mfn2 powiązano z chorobą CMT2A udział mitofuzyny 2 badany był w kontekście chorób, którym towarzyszy rozrost mięśni gładkich naczyń krwionośnych, m.in.

nadciśnienia tętniczego oraz miażdżycy. Wykazano, że patologicznemu rozrostowi mięśni gładkich naczyń krwionośnych towarzyszyło obniżenie ekspresji genu *Mfn2* [47]. Można przypuszczać, że w komórkach  $\text{MEF}^{\text{Mfn2}/-}$  w związku z brakiem ekspresji *Mfn2*, dochodzi do aktywacji szlaku kinaz ERK/MAPK, co wiąże się ze wzrostem tempa podziału tych komórek, zagadnienie to nie było jednak dalej badane w tej pracy. Z kolei, wzmożona aktywność podziałowa komórek  $\text{MEF}^{\text{Mfn2}/-}$  może przyczyniać się do nasilenia metabolizmu mitochondriów, o którym świadczyło zwiększenie zużycia tlenu. Nasilonemu oddychaniu komórkowemu towarzyszyło zwiększenie ilości mitochondriów oraz białek kompleksów oddechowych. Wzrost immunoreaktywności czynnika transkrypcyjnego *Tfam* wskazuje, że za zwiększoną ilość mitochondriów w komórkach  $\text{MEF}^{\text{Mfn2}/-}$  przynajmniej częściowo odpowiada nasilenie procesu ich biogenezy.

Pomimo wzrostu immunoreaktywności czynnika *Tfam*, który odpowiada m.in. za zwiększenie replikacji mitochondrialnego DNA, w komórkach  $\text{MEF}^{\text{Mfn2}/-}$  nie obserwowano wzrostu stosunku mtDNA/nDNA (Ryc. 15). Jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska może być nakładanie się procesów nasilenia metabolizmu mitochondriów (w związku ze wzmożonym tempem podziałowym) oraz zaburzeń funkcji tych organelli, o czym świadczył obniżony potencjał błonowy mitochondriów (Ryc. 8) oraz zaburzenia aktywności syntazy ATP (Ryc. 16).

Ponadto na ilość i jakość mitochondrialnego DNA znaczący wpływ mają procesy fuzji mitochondriów [32]. Postuluje się, że procesy fuzji stanowią mechanizm chroniący mitochondrialne DNA przed nagromadzeniem mutacji i jego degradacją [33]. Można zatem przypuszczać, że w komórkach  $\text{MEF}^{\text{Mfn2}/-}$ , dzięki obecności *Mfn1*, fuzja mitochondriów jest możliwa i ten stan mitochondriów sprzyja zachowaniu stosunku mtDNA/nDNA na poziomie zbliżonym do  $\text{MEF}^{\text{wt}}$ .

W komórkach  $\text{MEF}^{\text{Mfn2}/-}$  zaobserwowano zmianę charakteru metabolizmu, polegającą na zwiększonym udziale glikolizy beztlenowej. Świadczył o tym ok. 2,5-krotny wzrost stężenia mleczanu w stosunku do komórek prawidłowych  $\text{MEF}^{\text{wt}}$  (Ryc. 11). O zwiększonym udziale glikolizy w tych komórkach świadczył także jednakowy wpływ inhibitorów oksydacyjnej fosforylacji i glikolizy na syntezę ATP. W komórkach prawidłowych, przy braku glukozy ilość ATP obniżała się istotnie statystycznie w obecności inhibitora oksydacyjnej fosforylacji, wskazując na przewagę tego procesu w syntezie ATP. O zmianie charakteru metabolizmu komórek  $\text{MEF}^{\text{Mfn2}/-}$  świadczy także odkładanie zasobów glikogenu (Ryc. 12), którego obecność jest charakterystyczna dla komórek zależnych od metabolizmu beztlenowego. Być może obecność glikogenu w

MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> związana jest ze zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym w związku ze zwiększonym tempem ich podziału oraz nasilonym metabolizmem.

Zjawisko polegające na pozyskiwaniu energii w procesach beztlenowych jest w przyrodzie dobrze znane i może stanowić zarówno stan fizjologiczny (w przypadku pracujących mięśni) jak i towarzyszyć zjawiskom patologicznym, np. w przypadku komórek nowotworowych. Komórki łatwiej pozyskują energię poprzez nasilenie glikolizy beztlenowej w cytoplazmie przy jednoczesnym ograniczeniu znacznie bardziej efektywnej oksydacyjnej fosforylacji, przebiegającej w mitochondriach. Podejrzuje się, że taka zmiana w metabolizmie może świadczyć o adaptacji komórek do środowiska ubogiego w tlen lub stanowić próbę uniezależnienia się komórki od mitochondriów, które mogą pracować w wadliwy sposób lub wręcz stać się inicjatorami apoptozy [83]. Zwiększony udział glikolizy w metabolizmie MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> oraz MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> również może być związany z obniżoną efektywnością syntezy ATP w mitochondriach i próbą pozyskania ATP w alternatywnym szlaku biochemicznym.

Jak dotąd nie opisano występowania dodatkowego materiału zapasowego w biopsjach mięśni i skóry chorych CMT2A. Jednak zwiększony poziom mleczanu po wysiłku u chorych z CMT wydaje się potwierdzać występowanie zaburzeń bioenergetycznych [19]. Odkładanie materiału zapasowego opisano natomiast w kontekście miopatii PBD (ang. *polyglucosan body myopathy*) [84], w której magazynowaniu glikogenu towarzyszą uszkodzenia mięśni szkieletowych, a niekiedy także mięśnia sercowego oraz objawy neuropatii obwodowej [85].

Przeciwne efekty metaboliczne obserwowano w komórkach MEF na skutek delekcji genów obu mitofuzyn. W komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> obserwowano znaczące obniżenie tempa podziału (Ryc. 6), oraz zmniejszenie szybkości zużywania tlenu (Ryc. 7). Wykazano zmniejszoną (w odniesieniu do MEFwt) ilość białka Tfam (Ryc. 14) oraz wybranych białek kompleksów oddechowych (Ryc. 17), a także obniżenie wartości stosunku mtDNA/nDNA (Ryc. 15). A zatem, wydaje się prawdopodobne, że przyczyną wolniejszego oddychania tych komórek jest zmniejszenie ilości mitochondriów.

Ilość mitochondriów w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> szacowano, tak jak w przypadku MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, na podstawie obecności białek mitochondrialnych, Tom20 i Hsp60. Obserwowana rozbieżność immunoreaktywności Tom20 i Hsp60 w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wymaga dalszych badań. Białko Hsp60 pełni funkcję białka opiekuńczego. Wykazano jego udział w fałdowaniu białek i ich transporcie do macierzy mitochondrialnej [86]. Jednocześnie wykazano, że zahamowanie ekspresji genu Mfn2 zaburza

oddziaływania pomiędzy mitochondriami i siateczką śródplazmatyczną, prowadząc do zjawiska stresu siateczkowego, spowodowanego m.in. zaburzeniem fałdowania białek [31]. Związek pomiędzy tymi zjawiskami może być jednym z możliwych wyjaśnień różnicy immunoreaktywności Hsp60 i Tom20 w związku z delecją genów Mfn1 i Mfn2 w komórkach MEF.

Zaburzenia tempa podziału i oddychania komórkowego, jak w przypadku MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, opisano także dla innych komórek, w których ilość białek fuzyjnych była zmniejszona. Były wśród nich komórki mięśniowe, w których wyciszono ekspresję genów Mfn1 i Mfn2 [26], jak również komórki, w których zahamowano ekspresję genu Opa1. Białko Opa1, podobnie, jak mitofuzyny, jest GTPazą uczestniczącą w procesie fuzji mitochondriów, odpowiedzialną za fuzję wewnętrznej błony mitochondrialnej [42]. Mfn1 wraz z Opa1 koordynuje proces fuzji obu błon mitochondrialnych [42]. Przypuszcza się, że jednakowy charakter zaburzeń metabolizmu w komórkach Opa1<sup>-/-</sup> oraz Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup> jest konsekwencją całkowitego zahamowania fuzji mitochondriów [26].

Zaburzenia metabolizmu objawiające się obniżeniem tempa oddychania komórkowego i ilości białek mitochondrialnych zaobserwowano także w fibroblastach pochodzących od chorego z CMT2A obciążonego mutacją zmiany sensu [19]. Dodatkowo, w mięśniach chorych z CMT2A zaobserwowano nagromadzenie uszkodzeń mitochondrialnego DNA na skutek obniżonej zdolności jego naprawy [19]. W innych badaniach z udziałem fibroblastów pochodzących od chorych z CMT2A wykazano, że mutacje Mfn2 zaburzają oksydacyjną fosforylację poprzez ograniczenie replikacji mtDNA. [87]. Te zależności wydają się podkreślać związek pomiędzy występowaniem fuzji mitochondriów a utrzymaniem właściwej ilości i jakości mtDNA. Zaburzenia parametrów mitochondrialnych obserwowane w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> również wydają się potwierdzać powyższą hipotezę.

Jedenaście spośród 37 genów znajdujących się w mitochondrialnym DNA u ludzi koduje białka wchodzące w skład kompleksów łańcucha oddechowego, a 2 geny kodują podjednostki syntazy ATP. W komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wykazano zaburzenia funkcji i formowania syntazy ATP (Ryc. 16). W tej sytuacji można rozważyć hipotezę, wedle której na skutek nieprawidłowego formowania tzw. kompleksu piątego powrót protonów do macierzy mitochondrialnej może odbywać się bez wytwarzania ATP. Skutkiem tego może być nie tylko mniej efektywna synteza ATP przez mitochondria, ale także zaobserwowane obniżenie potencjału mitochondrialnego, jak wykazano dla MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> (Ryc. 8). Wzrost tego potencjału po podaniu oligomycyny wydaje się zgodny z powyższymi rozważaniami.

Kompleks syntazy ATP składa się z dwóch głównych podjednostek: katalitycznej  $F_1$  i przezłonowej  $F_o$ . W komórkach  $MEF^{Mfn1^{-/-}Mfn2^{-/-}}$  obserwuje się znaczne obniżenie stosunku mtDNA/nDNA oraz prawie zupełny brak kompleksu  $F_1F_o$  syntazy ATP. Nie można więc wykluczyć, że przyczyną tych nieprawidłowości jest deficyt dwóch białek kodowanych w mtDNA (MT-ATP6 i MT-ATP8). Te białka uczestniczą w łączeniu podjednostek  $F_1$  i  $F_o$ , i są zlokalizowane są w błonie mitochondrialnej, w domenie  $F_o$ . Sugestia upośledzenia tworzenia kompleksu  $F_1F_o$  wydaje się być także w zgodzie z obserwacją niższego potencjału błonowego mitochondriów w komórkach  $MEF^{Mfn2^{-/-}}$  i jego wzrostu po zahamowaniu aktywności podjednostki  $F_o$  oligomycyną (Ryc. 8). Zaburzenia aktywności syntazy ATP zostały także opisane jako jedna z przyczyn choroby CMT. Wykazano, że na skutek mutacji w genie MT-ATP6, kodującym podjednostkę szóstą syntazy ATP, dochodzi do rozwoju izolowanej postaci neuropatii aksonalnej CMT [88].

Można przypuszczać, że zaburzenia funkcji mitochondriów w komórkach  $MEF^{Mfn1^{-/-}Mfn2^{-/-}}$  są na tyle poważne, że komórki te pozyskują energię prawie wyłącznie w procesie glikolizy beztlenowej, przebiegającej bez udziału mitochondriów. Obserwacja sieci mitochondrialnej z wykorzystaniem specyficznego barwnika fluorescencyjnego wykazała znacznie poważniejsze zaburzenia rozmieszczenia mitochondriów niż w komórkach  $MEF^{Mfn2^{-/-}}$  (Ryc. 4). Mitochondria nie tylko wykazywały okołojądrową lokalizację, ale także tworzyły skupiska. Nie można wykluczyć, że do zaburzenia rozmieszczenia mitochondriów, oprócz zahamowania fuzji, przyczynia się również ich wadliwy transport. Wykazano, że mitofuzyny oddziałują bezpośrednio z kompleksem białkowym Miro i Milton umożliwiając przyłączenie mitochondriów do systemu transportującego opartego na białkach motorycznych: kinezyne i dyneinie [56]. Transport mitochondriów ma decydujące znaczenie w przypadku komórek nerwowych. Zaburzenie transportu mitochondriów w nerwach obwodowych uważane jest za istotny czynnik przyczyniający się do uszkodzeń aksonalnych w chorobie CMT2A [57,89,90]. Wadliwe rozmieszczenie mitochondriów opisano także w biopsjach nerwów pacjentów z CMT2A [12,19].

W komórkach  $MEF^{Mfn1^{-/-}Mfn2^{-/-}}$ , podobnie, jak dla  $MEF^{Mfn2^{-/-}}$ , zaobserwowano zmianę charakteru metabolizmu z tlenowego na beztlenowy. Świadczyła o tym podwyższona (w odniesieniu do  $MEF^{wt}$ ) synteza mleczanu oraz zmniejszenie wytwarzania ATP w obecności inhibitora dehydrogenazy glicerolo-3-fosforanowej, przy jednoczesnym niewielkim obniżeniu ilości ATP po podaniu inhibitora syntazy ATP. Efekt ten wydaje się znacznie silniej zaznaczony w  $MEF^{Mfn1^{-/-}Mfn2^{-/-}}$  niż w komórkach  $MEF^{Mfn2^{-/-}}$ .

Niewykluczone, że niewielkie nagromadzenie glikogenu w  $MEF^{Mfn1^{-/-}Mfn2^{-/-}}$ , nieznacznie większe w stosunku do komórek prawidłowych i znacznie mniejsze niż w komórkach  $MEF^{Mfn2^{-/-}}$ , jest związane z przesunięciem równowagi w kierunku rozkładania glukozy w procesie glikolizy, a nie jej magazynowania (które jest procesem wymagającym nakładu energii). Zjawisko zmiany charakteru metabolizmu z tlenowego na beztlenowy na skutek jednoczesnej delecji genów *Mfn1* i *Mfn2* opisali także Son i wsp. [55] postulując, że ta zmiana odbywa się poprzez aktywację szlaku Ras-Raf oraz oddziaływanie z czynnikiem HIF-1 $\alpha$  [55]. Przeniesienie ciężaru pozyskiwania energii z fosforylacji oksydacyjnej na substratową (glikoliza) na skutek zmian metabolizmu mitochondriów stanowi istotny czynnik w procesie różnicowania komórek [91]. Zmianę charakteru metabolizmu w związku z zahamowaniem ekspresji genów białek fuzyjnych opisali także Chen i wsp. wnioskując na podstawie wysokiego poziomu mleczanu w mięśniach szkieletowych myszy, w których zahamowano ekspresję genów *Mfn1* i *Mfn2* [33]. W przypadku komórek  $MEF^{Mfn1^{-/-}Mfn2^{-/-}}$  wydaje się, że jest to zmiana adaptacyjna pozwalająca na pozyskiwanie energii wobec ograniczenia oksydacyjnej fosforylacji. Można podejrzewać, że na skutek zmniejszonej ilości białek mitochondrialnych i przez to zapewne obniżonej masy mitochondriów w komórkach  $MEF^{Mfn1^{-/-}Mfn2^{-/-}}$  ilość ATP powstającego na drodze oksydacyjnej fosforylacji jest niewystarczająca, co powoduje aktywację glikolizy.

Zmiany metabolizmu wyrażone poprzez stosunek mtDNA/nDNA, ilość białek łańcucha oddechowego czy uzależnienie od glikolizy beztlenowej są znacznie mniej zaznaczone w  $MEF^{Mfn2^{-/-}}$  niż  $MEF^{Mfn1^{-/-}Mfn2^{-/-}}$ . Najprawdopodobniej ma to związek z kompensacyjnym efektem *Mfn1*. Jednocześnie, nie wszystkie badania na fibroblastach pochodzących od chorych z CMT2A, wykazują istotne zmiany w morfologii i funkcji mitochondriów [62]. Przypuszcza się, że za specyficzność objawów CMT2A odpowiada stosunkowo niska ekspresja *Mfn1* w nerwach obwodowych, podczas gdy w fibroblastach i komórkach mięśniowych ekspresja *Mfn1* jest dostatecznie wysoka, by nie dopuścić do uszkodzeń wynikających z mutacji *Mfn2* [27,56,62]. Tym samym, zarówno badania na fibroblastach osób chorych, jak i przedstawiona tu analiza porównawcza MEF wydają się uzasadniać weryfikację hipotezy opartej o wykazanie niskiej ekspresji *Mfn1* w nerwach obwodowych.

Jak dotąd opublikowanych zostało niewiele wyników pochodzących z badań porównujących ekspresję genów mitofuzyn w różnych narządach, jednak w żadnych z nich nie uwzględniono nerwów obwodowych. Metodą northern blot wykazano że poziom

mRNA dla Mfn1 był znaczny jedynie w sercu, podczas gdy ekspresja genu Mfn2 wyróżniała się w sercu, mięśniach szkieletowych i mózgu [40].

W przedstawionych badaniach ekspresję genów mitofuzyn porównano w wybranych tkankach myszy zarówno poprzez ocenę ilości transkryptu, jak i immunoreaktywności białka. Obwodowy układ nerwowy reprezentowały zwoje czuciowe (DRG). Zwoje czuciowe stanowią skupiska ciał komórek nerwowych i są powszechnie uznanym modelem do badań fizjologii obwodowego układu nerwowego [92].

Ilościowa analiza PCR wykazała najniższy stosunek ilości transkryptów Mfn1/Mfn2 w zwojach czuciowych, wskazując na prawie trzykrotną przewagę mRNA dla Mfn2 nad Mfn1 (Ryc. 18). Stosunek ilości transkryptów Mfn1/Mfn2 w DRG był najniższy zarówno w odniesieniu do innych struktur układu nerwowego (kora mózgowa, mózdzek, rdzeń kręgowy), jak i pozostałych badanych organów (serce, mięsień szkieletowy, wątroba, nerka, skóra). Również analiza western blot wykazała niski stosunek immunoreaktywności Mfn1 i Mfn2 w zwojach czuciowych (Ryc. 19), co łącznie wydaje się potwierdzać hipotezę o stosunkowo niewielkiej ekspresji genu Mfn1 w obwodowym układzie nerwowym. O ile wyniki analizy PCR były jednoznaczne, tak interpretację wyników western blot komplikuje fakt pojawienia się dodatkowych prążków wykrywanych przez przeciwciało anti-Mfn2 w preparatach pochodzących z niektórych narządów. Obecność dodatkowych prążków jest szczególnie wyraźna w przypadku mięśni szkieletowych oraz w nieco mniejszym stopniu, w przypadku serca i skóry. Również analiza western blot białek homogenatu nerki wskazuje na obecność dodatkowego prążka/białka, tuż poniżej przewidywanej wysokości dla Mfn2. Przyczyna tego zjawiska nie została wyjaśniona. Otrzymane obrazy mogą wynikać z niespecyficzności przeciwciał, ale warto też rozważyć inne możliwe przyczyny. Ze względu na procedurę elektroforezy SDS-PAGE, obejmującą denaturację białek i traktowanie próbek silnymi detergentami, raczej należy wykluczyć powstawanie dimerów. Natomiast wartym rozważenia wydaje się fakt modyfikacji potranslacyjnych. Wiadomo, że Mfn2 ulega ubikwitynacji i proces ten ma kluczowe znaczenie podczas mitofagii. Wykazano również związek pomiędzy zaburzeniem ubikwitynacji Mfn2 a rozwojem chorób neurodegeneracyjnych. Zmiany ubikwitynacji Mfn2 opisano m.in. u pacjentów z chorobą Parkinsona obarczonych mutacją w genie kodującym białko PINK1 [93]. Zmiany potranslacyjne często powodują zmianę aktywności białka. W przeprowadzonych badaniach dodatkowe prążki obserwowano w przypadku immunoblotów dla narządów o intensywnym metabolizmie. Biorąc pod uwagę fakt, że Mfn2 nie tylko uczestniczy w fuzji mitochondriów, ale wydaje się także wpływać



na metabolizm komórki niezależnie od właściwości fuzyjnych, być może zjawisko to wskazuje na dodatkowe funkcje Mfn2 w tych narządach.

Analiza ilości mRNA, jak i immunoreaktywność białka Mfn1 i Mfn2 wydają się potwierdzać hipotezę o stosunkowo niskiej ekspresji genu Mfn1 w nerwach obwodowych, oraz, przynajmniej częściowo, tłumaczyć specyficzność występowania objawów CMT2A. Co więcej, wysoki stosunek ilości białek Mfn1 i Mfn2 w próbkach skóry wydaje się także potwierdzać przypuszczenia, że w fibroblastach pacjentów skutki mutacji genu Mfn2 mogą być nieznaczące ze względu na kompensacyjny efekt Mfn1. Dlatego też komórki MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, w których skutki mutacji genu Mfn2 nie mogą być kompensowane przez Mfn1, wydają się dobrym modelem do oceny patogenności mutacji Mfn2, lepszym niż komórki MEF<sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>, a tym bardziej MEFwt.

Jak już wspomniano, w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> zaobserwowano znaczące obniżenie stosunku ilości mtDNA/nDNA, w odniesieniu do komórek prawidłowych MEFwt (Ryc. 15). Zaburzenia ilości i jakości mtDNA opisane zostały w różnych jednostkach chorobowych, z których wiele ma charakter neurologiczny. Zaburzenia ilości mtDNA i biogenezy mitochondriów opisano w chorobie Parkinsona, w neuronach dopaminergicznych obciążonych mutacją PINK1 [94]. Mutacje w mitochondrialnym DNA są przyczyną zespołu Leigha, który, ze względu na charakter patologii, określany jest mianem choroby neurometabolicznej [95]. Mutacje w DNA mitochondrialnym opisano także jako przyczynę dziedzicznej neuropatii wzrokowej Lebera oraz mitochondrialnej encefalopatii z kwasicą mleczanową i epizodami podobnymi do udaru mózgu (zespół MELAS) [96]. Obniżenie ilości mtDNA i wynikające z tego zaburzenia oksydacyjnej fosforylacji zaobserwowano również w hodowlach *in vitro* fibroblastów i mięśni szkieletowych chorych z CMT2A [27,87].

Biorąc pod uwagę uzyskane wartości stosunku mtDNA/nDNA w poszczególnych typach MEF oraz znaczenie mitochondrialnego DNA dla fizjologii komórki, pomiar stosunku mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> wykorzystano w następnym etapie pracy nad testem patogenności mutacji w genie Mfn2. Wybór takiego parametru uzasadnia także możliwość zastosowania standardowej metody pomiaru, umożliwiającej otrzymywanie powtarzalnych wyników przy wykorzystaniu niewielkiej ilości materiału badawczego. Ponieważ zmiany ilości mtDNA mogą towarzyszyć także innym zaburzeniom, nie wynikającym z mutacji w genie Mfn2, zmiany stosunku mtDNA/nDNA odnoszone były do komórek prawidłowych MEF oraz komórek MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> transfekowanych prawidłowym genem Mfn2.

Nadekspresja prawidłowego genu *Mfn2* w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> podnosiła stosunek mtDNA/nDNA do ok. 75% wartości w prawidłowych komórkach MEF (Ryc. 20), co wydaje się potwierdzać przyjęte założenia dotyczące związku pomiędzy *Mfn2* a ilością mtDNA.

Natomiast nadekspresja genu *Mfn2* z mutacją R400X nie zmieniała stosunku mtDNA/nDNA w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>. Białko *Mfn2* z mutacją, ze względu na przedwczesne wystąpienie kodonu stop, nie posiada domeny przezbłonowej, kotwiczącej *Mfn2* w błonie mitochondrium, oraz fragmentu C-końcowego, na którym znajduje się domena HR2. Ta domena mitofuzyny 2 jest odpowiedzialna za tworzenie dimerów pomiędzy mitofuzynami, co stanowi ważny etap w procesie fuzji mitochondriów [23]. Jednocześnie, analiza western blot ekstraktów komórkowych MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> po transfekcji wykazała powstanie dodatkowego prążka rozpoznawanego przez przeciwciało anti-*Mfn2* na wysokości ok. 45 kDa, odpowiadającej *Mfn2* z mutacją R400X (wyniki niezamieszczone w dysertacji). Na tej podstawie można przypuszczać, że pomimo wystąpienia przedwczesnego kodonu stop, w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> dochodzi do biosyntezy *Mfn2* z tą mutacją, a ze względu na brak domeny HR2, można przypuszczać, że *Mfn2*<sup>R400X</sup> nie ma możliwości pośredniczenia w fuzji mitochondriów.

W przeciwieństwie do *Mfn2*<sup>R400X</sup>, nadekspresja genu *Mfn2* z mutacją R94Q i R250W podnosiły stosunek mtDNA/nDNA, choć nie tak znacząco, jak nadekspresja prawidłowego genu *Mfn2* (Ryc. 20). Na skutek mutacji R94Q dochodzi do zamiany aminokwasu, występującego na skraju domeny *Mfn2* o aktywności GTPazy. Z kolei mutacja R250W powoduje zamianę aminokwasu w samej domenie GTPazowej mitofuzyny 2. Aktywność GTPazowa *Mfn2* jest niezbędna, by mogła ona uczestniczyć w fuzji mitochondriów [41]. Można przypuszczać, że mutacje R94Q oraz R250W mogą upośledzać aktywność GTPazową mitofuzyny 2 i w związku z tym negatywnie wpływać na aktywność fuzyjną tego białka. Dodatkowo, jak wykazały badania Detmera i Chana, nadekspresja genu *Mfn2* z mutacją w rejonie domeny GTPazowej, m.in. w kodonie 251 i 94, nie przywracała sieci mitochondrialnej w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> [27].

Związek pomiędzy fuzją mitochondriów a zachowaniem właściwej dla komórki ilości mtDNA został udowodniony w badaniach *in vitro* [15]. Jednocześnie na ilość mtDNA w komórce wpływają liczne inne zjawiska związane m.in. z tempem podziału komórki lub zapotrzebowaniem energetycznym [34]. Dlatego też można przypuszczać, że wpływ *Mfn2* prawidłowej lub z mutacją na ilość mtDNA może odbywać się także w sposób niezależny od fuzji, np. poprzez wpływ na metabolizm komórki. Jednak

mechanizm zależności pomiędzy ekspresją prawidłowego genu Mfn2 a ilością mtDNA nie został dotąd poznany i wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań.

Podczas gdy związek pomiędzy mutacją 94-ego kodonu mitofuzyny 2 a wystąpieniem choroby CMT2A został dokładnie opisany [4,12,71], związek pomiędzy wystąpieniem mutacji R250W a rozwojem CMT2A u polskiego pacjenta nie jest tak oczywisty. Objawy polineuropatii obserwowano u polskiego chorego obarczonego dwoma mutacjami w układzie trans (R400X/R250W) natomiast u ojca chorego, obarczonego pojedynczą mutacją R250W, dotąd nie zaobserwowano objawów polineuropatii [12]. Jednak mutacja tego samego kodonu u innego chorego powodowała rozwój choroby CMT2A [12].

Chorobotwórcze mutacje w genie Mfn2 są dziedziczone w sposób dominujący, co oznacza, że mutacja jednego allelu genu Mfn2 jest wystarczająca do rozwinięcia objawów choroby CMT2A. Choć nie jest znany mechanizm uszkodzenia aksonalnego na skutek mutacji Mfn2, przypuszcza się, że Mfn2 z mutacją wywiera dominujący szkodliwy efekt nad prawidłową Mfn2 [97]. Jak dotąd zaobserwowano zaledwie kilka rodzin, u których mutacje Mfn2 dziedziczone są w sposób recesywny [61,97]. W przypadku polskiego chorego z mutacjami R250W/R400X nie można wykluczyć, że za fenotyp chorego oraz brak objawów polineuropatii u ojca obarczonego mutacją R250W odpowiada niższa ekspresja Mfn2 z mutacją na skutek zmian w promotorze genu Mfn2, podobnie jak sugerowano w pracy Nicholson i wsp. [97].

W świetle uzyskanych wyników rodzą się dalsze pytania, m. in. o zmiany sieci mitochondrialnej w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> po transfekcji genem z badanymi mutacjami. Ewentualne zmiany struktury sieci mitochondrialnej mogłyby wskazywać, że za zmianę stosunku mtDNA/nDNA odpowiada przywrócenie fuzji mitochondriów. W kontekście badania skutków mutacji, wartym zbadania wydaje się także udział procesu mitofagii. Tym bardziej, że ubikwitynylacja Mfn2 przez PINK1 stanowi istotny etap degradacji wadliwie działających mitochondriów. Skoro białko Mfn2 z mutacją R400X nie posiada domeny przezbłonowej i najprawdopodobniej nie jest związane z błoną mitochondriów, jego ubikwitynacja nie musi skutkować eliminacją mitochondriów.

Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że sama ocena wpływu mutacji na sieć mitochondrialną jest niewystarczająca, co uzasadnia poszukiwanie parametru o innym charakterze. Na świecie podejmowane są próby stworzenia modeli do badań skutków mutacji, co wydaje się podkreślać potrzebę prowadzenia badań w tym kierunku. Skutki mutacji genu Mfn2 badano po ich nadekspresji u muszki owocówki *Drosophila*

*melanogaster* [98]. Uzyskano także transgeniczne myszy z ekspresją genu *Mfn2* z mutacją R94Q w nerwach obwodowych [99]. Ekspresja genu *Mfn2*<sup>R94Q</sup> u myszy skutkowała rozwinięciem objawów charakterystycznych dla choroby CMT2A. Charakter uszkodzeń był jednak mniej wyraźny niż u ludzi (niewielkie zaburzenia ruchowe), co autorzy tłumaczą m.in. różną długością nerwów obwodowych u ludzi i gryzoni, co przekłada się na ich mniejszą wrażliwość na skutki mutacji związane z aksonalnym transportem mitochondriów [56]. Prowadzone są także hodowle komórkowe neuronów czuciowych DRG z nadekspresją genu *Mfn2* z wybraną mutacją [57].

Niemniej jednak istniejące modele doświadczalne wymagają dość skomplikowanego zaplecza badawczego i zastosowania zaawansowanych metod inżynierii genetycznej. W prezentowanym projekcie podjęto próbę stworzenia testu patogenności w oparciu o śledzenie skutków mutacji w wybranej unieśmiertelnionej linii komórkowej, co wydaje się upraszczać procedury badawcze. Starano się też znaleźć parametr, który można przedstawić w bezwzględnych wartościach liczbowych, nie obciążonych subiektywną oceną badacza. Uzyskane wyniki wydają się uzasadniać dalsze badania nad zastosowaniem oceny ilości mtDNA do oceny patogenności mutacji *Mfn2*, do których należy pomiar stosunku mtDNA/nDNA w fibroblastach chorych z CMT2A, hodowanych w warunkach uwidaczniających zaburzenia metabolizmu mitochondriów, co osiąga się poprzez hodowlę komórek w pożywce bez glukozy, wzbogaconej galaktozą, w której komórki pozyskują ATP w wyniku oksydacyjnej fosforylacji [100].

Dalsze poszukiwania testu diagnostycznego w oparciu o skutki komórkowe mutacji w genie *Mfn2*, m.in. śledzenie zmian ilości mtDNA, wydają się więc uzasadnione i potrzebne.

## 7. WNIOSKI KOŃCOWE

Na podstawie przeprowadzonej analizy porównawczej trzech typów komórek MEF zdecydowano, że ocena stosunku ilości mtDNA/nDNA zostanie wykorzystana do dalszych badań nad testem patogenności mutacji Mfn2. Decyzję oparto o spostrzeżenie, że stosunek mtDNA/nDNA był znacznie obniżony w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> w odniesieniu do MEFwt, a nadekspresja prawidłowego genu Mfn2 podnosiła istotnie wartość stosunku mtDNA /nDNA.

Pozytywna weryfikacja hipotezy o stosunkowo niskiej ekspresji Mfn1 w nerwach obwodowych uzasadnia badanie skutków mutacji genu Mfn2 w komórkach, w których nie dochodzi do ekspresji genu Mfn1, mianowicie MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup>.

Nadekspresja genu Mfn2 z mutacją sprawczą w komórkach MEF<sup>Mfn1<sup>-/-</sup>Mfn2<sup>-/-</sup></sup> nie powodowała tak istotnego wzrostu stosunku mtDNA/nDNA jak nadekspresja prawidłowego genu Mfn2.

**Na tej podstawie wnioskuje się, że pomiar stosunku mtDNA/nDNA może być wykorzystany pomocniczo do oceny patogenności mutacji w genie Mfn2.**

**8. SPIS PIŚMIENICTWA**

1. Azzedine H, Senderek J, Rivolta C, Chrast R (2012) Molecular genetics of charcot-marie-tooth disease: from genes to genomes. *Mol.Syndromol.* 3: 204-214
2. Skre H (1974) Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin.Genet.* 6: 98-118
3. Jani-Acsadi A, Krajewski K, Shy ME (2008) Charcot-Marie-Tooth neuropathies: diagnosis and management. *Semin.Neurol.* 28: 185-194
4. Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat.Genet.* 36: 449-451
5. Charcot J, Marie P (1886) Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive souvent familiale debutant par les pieds et les jamber et atteignant plus tard les mains. [On a particular form of progressive muscular atrophy, often familial, commencing with the feet and the legs and later reaching the hands.]. *Revue de Medecine* 6:97-138
6. Tooth H (1886) The peroneal type of progressive muscular atrophy. *Praca doktorska.*
7. Zuchner S, Vance JM (2006) Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular.Med.* 8: 63-74
8. Harding AE, Thomas PK (1980) The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 103: 259-280
9. Chung KW, Kim SB, Park KD, Choi KG, Lee JH, Eun HW, Suh JS, Hwang JH, Kim WK, Seo BC, Kim SH, Son IH, Kim SM, Sunwoo IN, Choi BO (2006) Early onset severe and late-onset mild Charcot-Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain* 129: 2103-2118
10. Szigeti K, Nelis E, Lupski JR (2006) Molecular diagnostics of Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *Neuromolecular.Med.* 8: 243-254
11. Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, Feely SM, Siskind CE, Shy ME (2011) Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann.Neurol.* 69: 22-33
12. Verhoeven K, Claeys KG, Zuchner S, Schroder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M, Seeman P, Mazanec R, Saifi GM, Szigeti K, Mancias P, Butler IJ, Kochanski A, Ryniewicz B, De Bleecker J, Van den BP, Verellen C, Van Coster R, Goemans N, Auer-Grumbach M,

- Robberecht W, Milic R, V, Nevo Y, Tournev I, Guergueltcheva V, Roelens F, Vieregge P, Vinci P, Moreno MT, Christen HJ, Shy ME, Lupski JR, Vance JM, De Jonghe P, Timmerman V (2006) MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 129: 2093-2102
13. Kotruchow K, Kabzinska D, Kochanski A (2015) Pathogenic mutations and sequence variants within mitofusin 2 gene in Polish patients with different hereditary motor-sensory neuropathies. *Acta Neurobiol.Exp.(Wars.)* 75: 1-15
  14. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105: 587-597
  15. Cartoni R, Martinou JC (2009) Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp.Neurol.* 218: 268-273
  16. Feely SM, Laura M, Siskind CE, Sottile S, Davis M, Gibbons VS, Reilly MM, Shy ME (2011) MFN2 mutations cause severe phenotypes in most patients with CMT2A. *Neurology* 76: 1690-1696
  17. Zhu D, Kennerson ML, Walizada G, Zuchner S, Vance JM, Nicholson GA (2005) Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations. *Neurology* 65: 496-497
  18. Zuchner S, De Jonghe P, Jordanova A, Claeys KG, Guergueltcheva V, Cherninkova S, Hamilton SR, Van Stavern G, Krajewski KM, Stajich J, Tournev I, Verhoeven K, Langerhorst CT, de Visser M, Baas F, Bird T, Timmerman V, Shy M, Vance JM (2006) Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann.Neurol.* 59: 276-281
  19. Rouzier C, Bannwarth S, Chausseot A, Chevrollier A, Verschueren A, Bonello-Palot N, Fragaki K, Cano A, Pouget J, Pellissier JF, Procaccio V, Chabrol B, Paquis-Flucklinger V (2012) The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* 135: 23-34
  20. Santel A, Fuller MT (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J.Cell Sci.* 114: 867-874
  21. Kawalec M, Kotruchow K, Kochanski A, Zablocka B (2011) [Mitofusin 2 as a crucial peripheral nervous system protein and a common regulator of cell metabolism]. *Postepy Biochem.* 57: 215-221
  22. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J.Cell Biol.* 160: 189-200

23. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305: 858-862
24. Zorzano A, Liesa M, Sebastian D, Segales J, Palacin M (2010) Mitochondrial fusion proteins: Dual regulators of morphology and metabolism. *Semin.Cell Dev.Biol.* 6: 566-574
25. de Brito OM, Scorrano L (2009) Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. *Mitochondrion.* 9: 222-226
26. Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J.Biol.Chem.* 280: 26185-26192
27. Detmer SA, Chan DC (2007) Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J.Cell Biol.* 176: 405-414
28. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J.Biol.Chem.* 278: 17190-17197
29. Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP (2005) Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J.Physiol* 567: 349-358
30. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum.Mol.Genet.* 14: 1405-1415
31. Sebastian D, Hernandez-Alvarez MI, Segales J, Sorianello E, Munoz JP, Sala D, Waget A, Liesa M, Paz JC, Gopalacharyulu P, Oresic M, Pich S, Burcelin R, Palacin M, Zorzano A (2012) Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109: 5523-5528
32. Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130: 548-562
33. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141: 280-289
34. Jornayvaz FR, Shulman GI (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 47: 69-84



35. Bestwick ML, Shadel GS (2013) Accessorizing the human mitochondrial transcription machinery. *Trends Biochem.Sci.* 38(6):283-291
36. Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA (2012) Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochim.Biophys.Acta* 1819: 921-929
37. Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferre M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthiery Y, Bonneau D, Reynier P (2007) Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann.Neurol.* 61: 315-323
38. Niemann A, Ruegg M, La P, V, Schenone A, Suter U (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J.Cell Biol.* 170: 1067-1078
39. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat.Genet.* 26: 207-210
40. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J.Cell Sci.* 116: 2763-2774
41. Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J.Cell Sci.* 117: 6535-6546
42. Cipolat S, Martins de BO, Dal ZB, Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 15927-15932
43. de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605-610
44. Merkwirth C, Langer T (2008) Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell* 135: 1165-1167
45. Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, Zorzano A (2005) Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54: 2685-2693
46. Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A (2008) Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60: 748-766
47. Chen KH, Guo XM, Ma DL, Guo YH, Li QA, Yang DM, Li PF, Qiu XY, Wen SJ, Xiao RP, Tang JA (2004) Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nature Cell Biology* 6: 872-883

48. Zorzano A (2009) Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle. *Appl.Physiol Nutr.Metab* 34: 433-439
49. Chen KH, Dasgupta A, Ding J, Indig FE, Ghosh P, Longo DL (2014) Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. *FASEB J.* 28: 382-394
50. Pawlikowska P, Gajkowska B, Orzechowski A (2007) Mitofusin 2 (Mfn2): a key player in insulin-dependent myogenesis in vitro. *Cell Tissue Res.* 327: 571-581
51. Wang W, Cheng X, Lu J, Wei J, Fu G, Zhu F, Jia C, Zhou L, Xie H, Zheng S (2010) Mitofusin-2 is a novel direct target of p53. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 400: 587-592
52. Cheng X, Zhou D, Wei J, Lin J (2013) Cell-cycle arrest at G2/M and proliferation inhibition by adenovirus-expressed mitofusin-2 gene in human colorectal cancer cell lines. *Neoplasma* 60: 620-626
53. Wang W, Lu J, Zhu F, Wei J, Jia C, Zhang Y, Zhou L, Xie H, Zheng S (2012) Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via Bax signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Med.Oncol.* 29: 70-76
54. Wang W, Zhu F, Wang S, Wei J, Jia C, Zhang Y, Zhou L, Xie H, Zheng S (2010) HSG provides antitumor efficacy on hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo. *Oncol.Rep.* 24: 183-188
55. Son MJ, Kwon Y, Son MY, Seol B, Choi HS, Ryu SW, Choi C, Cho YS (2015) Mitofusins deficiency elicits mitochondrial metabolic reprogramming to pluripotency. *Cell Death.Differ.* 22(12): 1957-69
56. Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH (2010) Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J.Neurosci.* 30: 4232-4240
57. Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J (2007) Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J.Neurosci.* 27: 422-430
58. de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid.Redox.Signal.* 10: 621-633
59. Segales J, Paz JC, Hernandez-Alvarez MI, Sala D, Munoz JP, Noguera E, Pich S, Palacin M, Enriquez JA, Zorzano A (2013) A form of mitofusin 2 (Mfn2) lacking the transmembrane domains and the COOH-terminal end stimulates metabolism in muscle and liver cells. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 305: E1208-E1221
60. Bergamin G, Boaretto F, Briani C, Pegoraro E, Cacciavillani M, Martinuzzi A, Muglia M, Vettori A, Vazza G, Mostacciolo ML (2014) Mutation analysis of MFN2, GJB1, MPZ and PMP22 in Italian patients with axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular.Med.* 16: 540-550
61. Polke JM, Laura M, Pareyson D, Taroni F, Milani M, Bergamin G, Gibbons VS, Houlden H, Chamley SC, Blake J, Devile C, Sandford R, Sweeney MG, Davis

- MB, Reilly MM (2011) Recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to compound heterozygous mitofusin 2 mutations. *Neurology* 77: 168-173
62. Amiott EA, Lott P, Soto J, Kang PB, McCaffery JM, DiMauro S, Abel ED, Flanigan KM, Lawson VH, Shaw JM (2008) Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp.Neurol.* 211: 115-127
63. Saifi GM, Szigeti K, Snipes GJ, Garcia CA, Lupski JR (2003) Molecular mechanisms, diagnosis, and rational approaches to management of and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J.Investig.Med.* 51: 261-283
64. Sahenk Z, Galloway G, Clark KR, Malik V, Rodino-Klapac LR, Kaspar BK, Chen L, Braganza C, Montgomery C, Mendell JR (2014) AAV1.NT-3 gene therapy for charcot-marie-tooth neuropathy. *Mol.Ther.* 22: 511-521
65. Young P, De JP, Stogbauer F, Butterfass-Bahloul T (2008) Treatment for Charcot-Marie-Tooth disease. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD006052
66. d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, Van DP, Irobi J, Kozikowski AP, Vanden Berghe P, Timmerman V, Robberecht W, Van Den Bosch L (2011) HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat.Med.* 17: 968-974
67. Harel T, Lupski JR (2014) Charcot-Marie-Tooth disease and pathways to molecular based therapies. *Clin.Genet.* 86: 422-431
68. Allodi I, Udina E, Navarro X (2012) Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog.Neurobiol.* 98: 16-37
69. Cavalcanti F, Kidd T, Patitucci A, Valentino P, Bono F, Nistico R, Quattrone A (2009) An axon regeneration signature in a Charcot-Marie-Tooth disease type 2 patient. *J.Neurogenet.* 23: 324-328
70. Smeets HJ, Sallevelt SC, Dreesen JC, de Die-Smulders CE, de Coo IF (2015) Preventing the transmission of mitochondrial DNA disorders using prenatal or preimplantation genetic diagnosis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1350(1): 29-36
71. Kijima K, Numakura C, Izumino H, Umetsu K, Nezu A, Shiiki T, Ogawa M, Ishizaki Y, Kitamura T, Shozawa Y, Hayasaka K (2005) Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum.Genet.* 116: 23-27
72. Roshan MM, Young A, Reinheimer K, Rayat J, Dai LJ, Warnock GL (2015) Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology* 67: 379-386
73. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-

- tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 40-45
74. Williamson JR, Corkey B.E. (1969) Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. *Methods in Enzymology* 13: 434-513
75. Rybicka KK (1996) Glycosomes--the organelles of glycogen metabolism. *Tissue Cell* 28: 253-265
76. Wieckowski MR, Giorgi C, Lebedzinska M, Duszynski J, Pinton P (2009) Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat.Protoc.* 4: 1582-1590
77. Sabar M, Balk J, Leaver CJ (2005) Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant J.* 44: 893-901
78. Yan LJ, Forster MJ (2009) Resolving mitochondrial protein complexes using nongradient blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal.Biochem.* 389: 143-149
79. Maga G, Hubscher U (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J.Cell Sci.* 116: 3051-3060
80. Myers MB, Mittelstaedt RA, Heflich RH (2009) Using phiX174 DNA as an exogenous reference for measuring mitochondrial DNA copy number. *Biotechniques* 47: 867-869
81. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods* 25: 402-408
82. Guillet V, Gueguen N, Verny C, Ferre M, Homedan C, Loiseau D, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Chevrollier A (2010) Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Neurogenetics.* 11: 127-133
83. Lopez-Lazaro M (2008) The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med.Chem.* 8: 305-312
84. Weis J, Schroder JM (1988) Adult polyglucosan body myopathy with subclinical peripheral neuropathy: case report and review of diseases associated with polyglucosan body accumulation. *Clin.Neuropathol.* 7: 271-279
85. Vucic S, Pamphlett R, Wills EJ, Yiannikas C (2007) Polyglucosan body disease myopathy: an unusual presentation. *Muscle Nerve* 35: 536-539
86. Voos W (2013) Chaperone-protease networks in mitochondrial protein homeostasis. *Biochim.Biophys.Acta* 1833: 388-399

87. Vielhaber S, Debska-Vielhaber G, Peeva V, Schoeler S, Kudin AP, Minin I, Schreiber S, Dengler R, Kollwe K, Zusratter W, Kornblum C, Zsurka G, Kunz WS (2012) Mitofusin 2 mutations affect mitochondrial function by mitochondrial DNA depletion. *Acta Neuropathol.* 125(2): 245-256
88. Pitceathly RD, Murphy SM, Cottenie E, Chalasani A, Sweeney MG, Woodward C, Mudanohwo EE, Hargreaves I, Heales S, Land J, Holton JL, Houlden H, Blake J, Champion M, Flinter F, Robb SA, Page R, Rose M, Palace J, Crowe C, Longman C, Lunn MP, Rahman S, Reilly MM, Hanna MG (2012) Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 79: 1145-1154
89. Misko AL, Sasaki Y, Tuck E, Milbrandt J, Baloh RH (2012) Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J.Neurosci.* 32: 4145-4155
90. Russo GJ, Louie K, Wellington A, Macleod GT, Hu F, Panchumarthi S, Zinsmaier KE (2009) Drosophila Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J.Neurosci.* 29: 5443-5455
91. Son MJ, Jeong BR, Kwon Y, Cho YS (2013) Interference with the mitochondrial bioenergetics fuels reprogramming to pluripotency via facilitation of the glycolytic transition. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 45: 2512-2518
92. Melli G, Hoke A (2009) Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert.Opin.Drug Discov.* 4: 1035-1045
93. Rakovic A, Grunewald A, Kottwitz J, Bruggemann N, Pramstaller PP, Lohmann K, Klein C (2011) Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PLoS.ONE.* 6: e16746
94. Gegg ME, Cooper JM, Schapira AH, Taanman JW (2009) Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. *PLoS.ONE.* 4: e4756
95. Lake NJ, Bird MJ, Isohanni P, Paetau A (2015) Leigh syndrome: neuropathology and pathogenesis. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 74: 482-492
96. Thajeb P, Dai D, Chiang MF, Shyu WC (2006) Genotype-phenotype correlation of maternally inherited disorders due to mutations in mitochondrial DNA. *Taiwan.J.Obstet.Gynecol.* 45: 201-207
97. Nicholson GA, Magdelaine C, Zhu D, Grew S, Ryan MM, Sturtz F, Vallat JM, Ouvrier RA (2008) Severe early-onset axonal neuropathy with homozygous and compound heterozygous MFN2 mutations. *Neurology* 70: 1678-1681
98. Eschenbacher WH, Song M, Chen Y, Bhandari P, Zhao P, Jowdy CC, Engelhard JT, Dorn GW (2012) Two rare human mitofusin 2 mutations alter mitochondrial dynamics and induce retinal and cardiac pathology in Drosophila. *PLoS.ONE.* 7: e44296

99. Cartoni R, Arnaud E, Medard JJ, Poirot O, Courvoisier DS, Chrast R, Martinou JC (2010) Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain* 133: 1460-1469
100. Aguer C, Gambarotta D, Mailloux RJ, Moffat C, Dent R, McPherson R, Harper ME (2011) Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS.ONE*. 6: e28536