

Daria Grobys

**Udział kanału VDAC w patogenezie
choroby Huntingtona w oparciu
o badania modeli komórkowych**

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Zakład Bioenergetyki

Promotor: prof.dr hab. Hanna Kmita

Promotor pomocniczy: dr Andonis Karachitos

Poznań, 2017

Dziękuję wszystkim, którzy w jakikolwiek sposób przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

*Serdeczne podziękowania kieruję do mojego promotora, **prof. dr hab. Hanny Kmity**, której pomoc i wsparcie było kluczowe podczas powstawania tej pracy. Chcę serdecznie podziękować i jestem szczerze wdzięczna za czas, jaki mi Pani poświęciła, a także za wszystkie zgłoszone sugestie, cenne rady merytoryczne, okazaną życzliwość i wyrozumiałość.*

*Chciałabym podziękować także **dr. Andonisowi Karachitosowi**, za wspólnie spędzony czas w laboratorium, za cenne rady i pomoc we wszelkich „kryzysowych” sytuacjach. Za wsparcie, życzliwość i niezwykłą kreatywność w rozwiązywaniu pojawiających się problemów.*

Wszystkim osobom, z którymi dane mi było współpracować: prof. Fabricowi Homblé, mgr. Ewie Kosickiej, dr Joannie Pieńkowskiej, dr. Tomaszowi Skrzypczakowi, dr Annie Bieluszewskiej, mgr. Żanecie Kołodziejskiej, a szczególnie pracownikom, doktorantom i magistrantom Zakładu Bioenergetyki: prof. dr hab. Wiesławie Jarmuszkiewicz, dr Małgorzacie Wojtkowskiej, Wiolecie Nobik, Danucie Drachal-Chrul, dr Annie Kicińskiej, dr Ninie Antos-Krzemińskiej, dr Agnieszce Kozieł, dr. Andrzejowi Wojdzie-Płoszczycy, mgr. Monice Mazur, mgr. Izabelli Sobieraj, mgr. Karolinie Ogrodnej, mgr. Klaudii Kulczyńskiej, mgr. Adrianowi Sobusiakowi, Wojtkowi Grabińskiemu i Martynie Baranek, dziękuję za życzliwą pomoc, miłą atmosferę i wszelki wkład, jaki wnieśli w powstanie tej pracy.

Tą pracę dedykuję moim najbliższym:

Kochanym Rodzicom, Mateuszowi oraz Rodzeństwu.

Z całego serca dziękuję Wam za miłość, za wszystko co dla mnie učiniliście,

za wszystko czego mnie nauczyliście i za to kim jestem dzięki Wam.

Badania zrealizowano ze środków:

NCN 2011/01/B/NZ3/00359

GDWB-06/2015

KNOW RNA Research Centre in Poznan No.01/KNOW2/2014

SPIS TREŚCI

Abstract	9
Streszczenie	11
1. Wykaz stosowanych skrótów	13
2. Wstęp	15
2.1. Wprowadzenie	15
2.2. Kanał VDAC jako białko zarządzające funkcjonowaniem mitochondriów	17
2.2.1. Transport przez błonę zewnętrzną	19
2.2.2. Regulacja ekspresji białek komórkowych	20
2.2.3. Oddziaływania z białkami mitochondrialnymi i cytoplazmatycznymi	21
2.2.4. Element systemu kontroli jakości mitochondriów	23
2.2.5. Funkcjonalne zróżnicowanie izoform	24
2.3. Znaczenie mitochondriów w przeżywalności komórek	27
2.3.1. Kluczowy element komórkowej homeostazy	27
2.3.1.1. Przemiany metaboliczne	28
2.3.1.2. Koordynacja działania z innymi organellami i strukturami komórkowymi	28
2.3.1.3. Komunikacja z jądrem komórkowym	30
2.3.1.4. Element systemu kontroli jakości cytozolu i innych przedziałów komórkowych	30
2.3.2. Udział w procesach śmierci komórek	31
2.4. Dysfunkcja mitochondriów w rozwoju choroby Huntingtona	32
2.4.1. Funkcje metaboliczne	32
2.4.2. Dynamika mitochondriów	34
2.4.3. Liczba mitochondriów	35
2.5. Przyczyny dysfunkcji mitochondriów w rozwoju choroby Huntingtona	38
2.5.1. Oddziaływanie huntingtyny i jej zmutowanej wersji na procesy komórkowe istotne dla funkcjonowania mitochondriów	40
2.5.2. Bezpośrednie oddziaływanie huntingtyny i jej zmutowanej wersji z mitochondriami	44
2.5.3. Kanał VDAC jako cel działania huntingtyny i jej zmutowanej wersji	44
2.6. Modele w badaniach choroby Huntingtona	46
3. Cel pracy	52
4. Materiały	54
4.1. Materiał biologiczny	54
4.1.1. Konstrukty plazmidowe	55
4.1.1.1. Ylp351Q25, Ylp351Q103	55
4.1.1.2. pYX212hVDAC1, pYX212hVDAC2, pYX212hVDAC3	55
4.1.1.3. pYX142	55
4.1.2. Bakterie <i>Escherichia coli</i> szczepu DH5α	56
4.1.3. Drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
4.1.4. Linie komórkowe PC12	57
4.2. Stosowane pożywki	58
4.2.1. Pożywka do otrzymania bakteryjnych komórek kompetentnych	58
4.2.2. Pożywki do transformacji komórek bakterii i selekcji otrzymanych transformantów	58
4.2.3. Pożywki do selekcji transformantów drożdżowych	59
4.2.4. Pożywki do hodowli komórek drożdży	60
4.2.5. Pożywki do hodowli komórek PC12	60

4.3.	Stosowane płyny	61
4.3.1.	Płyny do przygotowania bakteryjnych komórek kompetentnych.....	62
4.3.2.	Mieszanina do linearyzacji konstruktów Ylp351.....	62
4.3.3.	Płyn do elektroforezy w żelu agarozowym	62
4.3.4.	Płyny do otrzymania sferoplastów drożdży	63
4.3.5.	Płyny do izolacji mitochondriów z drożdży	63
4.3.6.	Płyny do izolacji mitochondriów z komórek PC12.....	63
4.3.7.	Płyn do solubilizacji mitochondriów i elucji białka VDAC z kolumny chromatograficznej.....	64
4.3.8.	Płyny do elektroforezy białek metodą SDS-PAGE.....	64
4.3.9.	Płyn do elektrotransferu białek	64
4.3.10.	Płyny do immunodetekcji białek	64
4.3.11.	Pozostałe płyny	61
4.4.	Skład żeli do elektroforezy	65
4.4.1.	Skład żeli do elektroforezy białek metodą SDS-PAGE	65
4.4.2.	Skład żelu agarozowego do rozdzielu DNA	65
4.5.	Stosowane odczynniki.....	66
4.6.	Stosowane przeciwciała	67
5.	Metody	68
5.1.	Otrzymanie konstruktów plazmidowych i namnożenie wektora plazmidowego pYX142 do transformacji komórek drożdży	68
5.1.1.	Przygotowanie komórek kompetentnych bakterii.....	68
5.1.2.	Transformacja komórek bakterii metodą szoku cieplnego i selekcja otrzymanych transformantów w obecności ampicyliny	68
5.1.3.	Izolacja konstruktów plazmidowych i wektora plazmidowego pYX142.....	69
5.1.4.	Linearyzacja konstruktów Ylp351Q25 i Ylp351Q103	69
5.1.5.	Oczyszczanie DNA.....	70
5.2.	Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych.....	70
5.3.	Otrzymanie transformantów drożdży	71
5.3.1.	Transformacja komórek drożdży metodą elektroporacji	71
5.3.2.	Selekcja transformantów	71
5.4.	Przygotowywanie i uruchamianie banków komórek	72
5.4.1.	Przygotowywanie i uruchamianie banków komórek drożdży	72
5.4.2.	Przygotowywanie i uruchamianie banków komórek PC12	72
5.5.	Weryfikacja ekspresji natywnej (Htt) i zawierającej mutację (mHtt) wersji huntingtyny z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego.....	73
5.6.	Hodowla komórek.....	74
5.6.1.	Hodowla komórek drożdży	74
5.6.1.1.	Hodowla komórek drożdży w celu weryfikacji ekspresji Htt i mHtt z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego	74
5.6.1.2.	Hodowla komórek drożdży w celu badania wpływu ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność i funkcje bioenergetyczne tych komórek	74
5.6.1.2.1.	Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt	75
5.6.1.2.2.	Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt.....	76
5.6.1.2.3.	Przygotowanie krzywych wzrostu	76
5.6.1.3.	Hodowla masowa komórek drożdży w celu izolacji mitochondriów	76
5.6.2.	Hodowla komórek PC12.....	76
5.7.	Izolacja mitochondriów	78
5.7.1.	Izolacja mitochondriów z komórek drożdży.....	78
5.7.2.	Izolacja mitochondriów z komórek PC12	78
5.8.	Testy przeżywalności komórek	80

5.8.1.	Płytkowy test przeżywalności	80
5.8.2.	Test MTT	80
5.8.2.1.	Dla komórek drożdży	80
5.8.2.2.	Dla komórek PC12	80
5.9.	Pomiary oksygraficzne	82
5.9.1.	Wyznaczenie szybkości zużycia tlenu w wybranych stanach oddechowych rejestrowanych dla komórek	82
5.9.2.	Wyznaczenie statusu sprzężenia energetycznego komórek <i>S.cerevisiae</i>	82
5.10.	Pomiar stężenia białka metodą Bradford	83
5.11.	Izolacja białka VDAC	83
5.12.	Detekcja białek	84
5.12.1.	Immunodetekcja białek metodą „Western blot”	84
5.12.1.1.	Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w obecności siarczanu dodecyłu sodu (SDS-PAGE)	84
5.12.1.2.	Elektrotransfer półsuchy	84
5.12.1.3.	Immunodetekcja	84
5.12.2.	Detekcja białek metodą spektrofotometrii mas	85
5.13.	Pomiar aktywności kanałowej białka VDAC	86
5.13.1.	Pomiar przewodnictwa kanałów w sztucznych błonach lipidowych	86
5.13.2.	Wyznaczenie parametrów określających funkcjonowanie kanału	86
6.	Wyniki	87
6.1.	Charakterystyka otrzymanego modelu drożdżowego choroby Huntingtona	87
6.1.1.	Selekcja otrzymanych komórek transformantów na pożywkach selekcyjnych ...	88
6.1.2.	Weryfikacja ekspresji Htt i mHtt z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej	88
6.1.3.	Weryfikacja ekspresji białek VDAC metodą Western Blot	92
6.1.4.	Weryfikacja ekspresji białek VDAC metodą testu fenotypowego	93
6.2.	Wpływ ekspresji Htt i mHtt na funkcjonowanie komórek drożdżowego modelu choroby Huntingtona	94
6.2.1.	Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przebieg wzrostu komórek drożdżowego modelu HD	94
6.2.2.	Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek modelu drożdżowego HD badany metodą MTT	96
6.2.2.1.	Przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w 28°C	96
6.2.2.2.	Przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w 37°C	98
6.2.3.	Wpływ znacznika <i>LEU2</i> na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD 100	
6.2.3.1.	Rozszerzenie drożdżowego modelu HD o szczepy zawierające funkcjonalny gen <i>LEU2</i>	100
6.2.3.2.	Selekcja otrzymanych komórek transformantów na pożywkach selekcyjnych	101
6.2.3.3.	Wpływ znacznika <i>LEU2</i> na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w warunkach braku ekspresji Htt i mHtt, badany metodą testu płytkowego	102
6.2.4.	Przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w warunkach ekspresji Htt i mHtt, badana metodą testu płytkowego	103
6.2.4.1.	Przeżywalność komórek z ekspresją yVDAC1 w warunkach ekspresji Htt i mHtt badana metodą testu płytkowego.	105
6.2.4.2.	Przeżywalność komórek z ekspresją hVDAC1 w warunkach ekspresji Htt i mHtt badana metodą testu płytkowego.	106
6.2.5.	Wpływ ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek drożdżowego modelu HD	107

6.2.5.1.	Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją yVDAC1	108
6.2.5.2.	Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją yVDAC1	110
6.2.5.3.	Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC1	112
6.2.5.4.	Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek drożdży z ekspresją hVDAC1	114
6.2.5.5.	Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC2	116
6.2.5.6.	Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC2	118
6.2.5.7.	Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC3	120
6.2.5.8.	Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC3	122
6.3.	Rola białka VDAC w przeżywalności komórek szczurzego modelu HD	124
6.3.1.	Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek PC12-HD-Q28 i PC12-HD-Q74	124
6.3.2.	Wpływ ekspresji Htt i mHtt na aktywność kanałową białek VDAC	125
7.	Dyskusja	127
8.	Podsumowanie	137
9.	Bibliografia	139
10.	Załącznik	154

Abstract

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive neuron dysfunction and their loss within the central nervous system. Neuronal degeneration initially includes the striatum and especially the medium-sized GABAergic neurons, while progression of the disease spreads the degeneration to the deeper layers of the cerebral cortex. This process mainly concerns areas of the brain involved in the coordination of cognitive processes and control of movement and emotions. Disturbing the functioning of these brain centers causes symptoms like uncontrollable movements (chorea), hand and leg tremors, decreased muscle tone, stupor, progressive memory disorders, personality changes and depression. The course of the disease is slow and progressive and the expectancy of patient's life after the onset of symptoms is between 15 and 20 years. Although the molecular basis of HD was discovered in 1993, there are still no effective therapeutic strategies to stop its development. Therefore, there is no doubt that understanding of the molecular basis of HD is crucial for the development of new, effective therapies allowing to counteract changes occurring in the course of HD in the central nervous system.

HD is classified as a glutamine expansion disease because it is caused by an increase in the number of CAG codons in the first exon of the HTT gene, which encodes the huntingtin protein (Htt). This results in a mutated version of the protein (mHtt) with an extended sequence of glutamine residues at the amino terminus. The mechanism of mHtt toxicity has not yet been clarified. What is more, so far it has not been determined if it results from the elimination of the Htt effect or it is the result of the appearance of a new mHtt function. However, there is no doubt that mitochondrial dysfunction, which occurs early in the development of HD and precedes other changes, plays an important role in HD pathomechanism.

The formation and proper functioning of mitochondria largely depend on the correct import of mitochondrial proteins, as well as the exchange of metabolites between mitochondria and cytoplasm. The crucial role in the metabolite exchange is played by the voltage-dependent anion-channel (VDAC). This seemingly simple function of VDAC protein leads to its fundamental importance for functioning of mitochondria. Consequently, this channel is called dynamic regulator, or even governor, of mitochondrial functions.

The aim of this study was to check whether VDAC protein is important for Htt and/or mHtt effects on cells, which in turn would indicate VDAC participation in the pathogenesis of HD. The contribution of VDAC isoforms to the observed effects of Htt and mHtt expression was also evaluated. Two models of this disease were used in the study. The first one is based on available rat PC12 cells, while the second one was

constructed for this study, and is based on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. Both of these models allow for controlled expression of Htt and mHtt, while the second one also allows for determination of the effect of Htt/mHtt expression in the presence or absence of human VDAC isoforms. These models were used to investigate the effect of Htt and mHtt expression on cell survival, bioenergetic functions as well as channel properties of VDAC proteins.

The obtained results indicate that the presence of VDAC protein is important for the analyzed effects of Htt and mHtt expression. Moreover, the isoform of VDAC protein also matters. For example, the expression of mHtt in PC12 cells (in which VDAC1 isoform is quantitatively dominant), as well as in the yeast HD model cells expressing human VDAC1 (hVDAC1) results in decreased survival of these cells. In the case of the yeast cells this effect requires the presence of temperature stress (37°C), which may affect the level of mHtt aggregation. Interestingly, this temperature corresponds to the temperature of PC12 cell culture and the human body. Moreover, data obtained for hVDAC1 expressing cells of the yeast HD model appear to confirm the key importance of this VDAC isoform for mHtt effect on mitochondrial function. This is in line with results obtained for VDAC preparations isolated from PC12 cells as it was observed that mHtt expression may lead to changes in VDAC1 channel activity, consisting in altered conductivity and reduced potential dependence.

Summing up, the obtained results suggest an important role of VDAC1 isoform in HD pathomechanism. A comparison of results obtained for the yeast HD model and PC12 cell HD model suggests that mammalian VDAC1 isoform is involved directly or indirectly in mHtt cytotoxic effect. Moreover, the constructed yeast HD model may be used for further research on the pathomechanism of this disease.

Streszczenie

Choroba Huntingtona (HD) to choroba neurodegeneracyjna charakteryzująca się narastającą w czasie dysfunkcją neuronów i ich utratą w obrębie centralnego układu nerwowego. Degeneracja neuronów początkowo obejmuje prążkowie, a szczególnie średniej wielkości neurony GABAergiczne, aby z postępem choroby rozszerzyć się na głębsze warstwy kory mózgowej. Proces ten dotyczy przede wszystkim obszarów mózgu uczestniczących w koordynacji procesów poznawczych oraz kontrolujących poruszanie się i emocje. Zakłócenie funkcjonowania tych ośrodków mózgowych wywołuje objawy chorobowe, które obejmują: niekontrolowane ruchy (pląsawicę), pojawienie się drżenia rąk i nóg, zmniejszenie napięcia mięśni, ośpienie, postępujące zaburzenia pamięci, zmiany osobowości, a także depresję. Przebieg choroby jest powolny i postępujący, a długość życia pacjentów po wystąpieniu pierwszych objawów waha się od 15 do 20 lat. Mimo, iż podłoże molekularne HD odkryto już w 1993 roku, nadal nie istnieją skuteczne strategie terapeutyczne, pozwalające na zatrzymanie jej rozwoju. Nie ulega zatem wątpliwości, że zrozumienie molekularnych podstaw HD jest kluczowe dla stworzenia nowych, skutecznych terapii, pozwalających na przeciwdziałanie zmianom zachodzącym w przebiegu HD w ośrodkowym układzie nerwowym.

HD zaliczana jest do chorób ekspansji glutaminowych, gdyż jej przyczyną jest zwiększenie liczby kodonów CAG w pierwszym egzonie genu *HTT*, który koduje białko huntingtynę (Htt). Powstaje w ten sposób zmutowana wersja białka (mHtt), z wydłużonym ciągiem reszt glutaminy w obszarze końca aminowego. Mechanizm toksycznego działania mHtt nie został dotychczas wyjaśniony. Co więcej, do tej pory nie udało się ustalić, czy działanie to wynika z wyeliminowania efektu Htt, czy też jest skutkiem pojawienia się nowej funkcji mHtt. Nie ulega jednak wątpliwości, że istotną rolę w patomechanizmie HD odgrywa dysfunkcja mitochondriów, która pojawia się wcześniej w rozwoju HD i poprzedza w czasie inne zmiany.

Powstanie i właściwe funkcjonowanie mitochondriów w dużej mierze zależą od prawidłowego importu białek mitochondrialnych, a także wymiany metabolitów z cytoplazmą. Podstawową rolę w wymianie metabolitów między mitochondriami i cytoplazmą odgrywa zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej (kanał VDAC). Ta pozornie prosta funkcja białka VDAC przekłada się jednak na jego fundamentalne znaczenie dla funkcjonowania mitochondriów. Dlatego też kanał ten nazywany jest regulatorem, a nawet zarządcą, funkcji mitochondriów.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie czy białko VDAC jest istotne dla działania, Htt i/lub mHtt w komórkach, co w konsekwencji wskazywałoby na jego udział w patogenezie HD. Postanowiono także sprawdzić znaczenie obecności izoform białka

VDAC dla obserwowanych efektów ekspresji Htt i mHtt. W badaniach stosowano dwa modele tej choroby. Pierwszy z nich oparty jest na dostępnych szczurzych komórkach PC12, podczas gdy drugi został skonstruowany na potrzeby niniejszej pracy i oparty jest na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Oba te modele umożliwiają kontrolowaną ekspresję Htt i mHtt, przy czym drugi z nich umożliwia także badanie wpływu tej ekspresji w obecności bądź przy braku danej izoformy ludzkiego białka VDAC. Modele te wykorzystano dla zbadania wpływu ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek, funkcje bioenergetyczne mitochondriów, a także właściwości kanałowe białek VDAC.

Otrzymane wyniki wskazują, że obecność białka VDAC ma znaczenie dla analizowanych efektów ekspresji Htt i mHtt. Co więcej, znaczenie ma także izoforma badanego białka VDAC. Stwierdzono na przykład, że ekspresja mHtt w komórkach PC12, w których dominuje ilościowo izoforma VDAC1, jak i w komórkach modelu drożdżowego z ekspresją VDAC1 człowieka skutkuje zmniejszeniem przeżywalności tych komórek, przy czym w przypadku komórek drożdży efekt ten wymaga obecności stresu temperaturowego. Co ciekawe, ów stres temperaturowy odpowiada temperaturze organizmu człowieka (tj. 37°C), co może mieć wpływ na poziom agregacji mHtt. Otrzymane wyniki uzyskane dla komórek modelu drożdżowego z ekspresją hVDAC1 wydają się potwierdzać kluczowe znaczenie tej izoformy VDAC dla efektu mHtt na funkcjonowanie mitochondriów. Pozostaje to w związku z wynikami uzyskanymi dla preparatów VDAC izolowanych z komórek PC12, w przypadku których wykazano, że ekspresja mHtt może prowadzić do zmian aktywności kanałowej ssaczego białka VDAC1, polegających na zmienionym rozkładzie przewodnictwa i zmniejszonej zależności od potencjału.

Podsumowując, otrzymane wyniki sugerują istotną rolę izoformy VDAC1 w patomechanizmie HD. Porównanie wyników otrzymanych dla modelu drożdżowego i modelu opartego na komórkach PC12 pozwala założyć, iż ssacza izoforma VDAC1 jest miejscem bezpośredniego lub pośredniego oddziaływania mHtt i warunkiem pojawienia się cytotoksycznego efektu tego białka. Co więcej, skonstruowany drożdżowy model HD może stanowić punkt wyjścia dla dalszych badań nad patomechanizmem tej choroby.

1. Wykaz stosowanych skrótów

ADP - adenozynodifosforan
AMPK - kinaza aktywowana przez AMP
APS - nadsiarczan amonu, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
ATP - adenozynotrifosforan
BDNF - neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
BLM - czarne błonki lipidowe
BSA - albumina surowicy wołu
CBP - białko wiążące białko CREB
CBP - białko wiążące białko CREB
CK - kinaza keratynowa
CREB - białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP
CuZnSOD - zależna od miedzi i cynku dysmutaza ponadtlenkowa
ddH₂O - podwójnie destylowana H₂O
DTT - ditiotreitól
EDTA - etylenodwuaminocztteroocjan
EGTA - kwas etylenoglikol-O-O₂-bis(2-aminoetyl)-N,N,N₂,N₂ tetraoctowy
ER - retikulum endoplazmatyczne
ESC - embrionalne komórki macierzyste
FCCP - fenylhydrazon trójfluorometoksykarbonylo-cyjanu
GFP - białko zielonej fluorescencji
GPX1 - peroksydaza glutationowa
GSH - glutation
GSK3 β - 3 β -syntaza glikogenu
H₂O MiliQ - ultraczysta woda laboratoryjna
HAP1 - białko związane z huntingtyną 1
HD - choroba Huntingtona
HEPES - kwas N- (2-hydroksyetylo) piperazyno – N-2-etanosulfonowy
HK - heksokinaza
Htt - natywna wersja huntingtyny
IMM - błona wewnętrzna mitochondriów
iPSC - indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
MAD - degradacja związana z mitochondriami
MAP2 - białko towarzyszące mikrotubulom 2.
mHtt - zmutowana wersja huntingtyny
MMP - permeabilizacja błon mitochondrialnych
MnSOD - zależna od manganu dysmutaza ponadtlenkowa

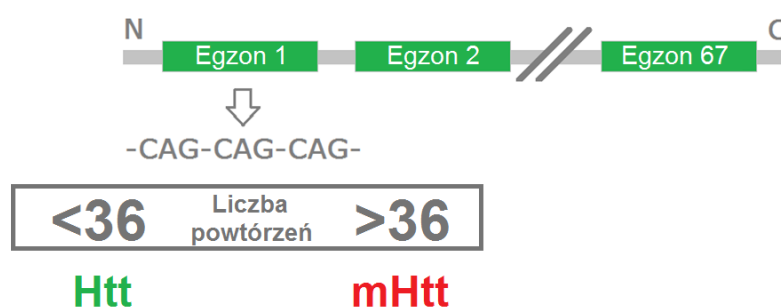
MTPT - 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6 tetrahydropirydyna
MTT - bromek 3-(4,5-dimetylo-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium
NADH - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NCCD - Komitet do spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej
NRF1 - jądrowy czynnik oddechowy 1
NRF2 - jądrowy czynnik oddechowy 2
OMM - błona zewnętrzna mitochondriów
OXPHOS - fosforylacja oksydacyjna
PBP74 - mortalina
PBS - sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PGC-1 α - koaktywator receptora PPAR- γ
PINK1 - kinaza indukowana przez PTEN
PKA - kinaza białkowa A
PKC - kinaza białkowa C
PMSF - fluorek fenylometylosulfonylu
redox - stan redukcyjno-oksydacyjnego
RFT - reaktywne formy tlenu
TBT - tributulocyna
TCA - kwas trójchlorooctowy
TEMED - N,N,N'',N''-tetrametyloetylenodiamina
TNA - translokaza nukleotydów adeninowych
TSPO - białko translokatorowe
TRIS - 3-hydroksymetyloaminoctan
UCP - białko rozprzegające
UPS - system ubikwityna-proteasom
VDAC - zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej

2. Wstęp

2.1. Wprowadzenie

Choroba Huntingtona (HD¹) to choroba neurodegeneracyjna, dziedziczona autosomalnie dominująco, o częstości występowania 5-10 przypadków na 100 tysięcy. W jej przebiegu dochodzi do narastającej w czasie utraty neuronów, głównie w obszarze prążkowiec i głębszych warstw kory mózgowej. Objawy kliniczne obejmują płasawicę, utratę masy ciała, demencję oraz zaburzenia psychiczne, takie jak depresja, stany lękowe, wycofanie się i drażliwość (Hersch i Rosas, 2008; Bossy-Wetzel i in., 2008, Karachitos i in., 2015; Wiatr i in., 2017). HD zaliczana jest do chorób ekspansji poliglutaminowych (Usdin i in., 2015), ponieważ jej przyczyną jest mutacja polegająca na zwiększeniu liczby kodonu dla glutaminy (CAG) z 6-35 do ponad 35 (Rys.1). Mutacja ta zachodzi w egzonie 1 genu *HTT* (zlokalizowanego na chromosomie 4 w pozycji: 4p63), kodującego białko zwane huntingtyną (Htt). Powstaje w ten sposób zmutowana wersja białka (mHtt), z wydłużonym ciągiem reszt glutaminy w obszarze końca aminowego (Karachitos i in., 2015; Wiatr i in., 2017). Objawy kliniczne HD pojawiają się zwykle między 30 a 40 rokiem życia, przy czym istnieje związek między liczbą reszt glutaminy w rejonie końca aminowego mHtt, a czasem wystąpienia i stopniem nasilenia objawów (Karachitos i in., 2016a). Ponadto, u dzieci z młodzieńczą odmianą HD (postać Westphala)², obserwuje się występowanie szeregu zaburzeń rozwojowych, takich jak na przykład zmniejszony rozmiar głowy i mózgu (Lee i in., 2012; Tereshchenko i in., 2015, Wiatr i in., 2017).

Gen *HTT*:



Rysunek 1. Istota mutacji w genie *HTT* prowadzącej do rozwoju choroby Huntingtona.

Htt - natywna wersja huntingtyny, mHtt - zmutowana wersja huntingtyny.

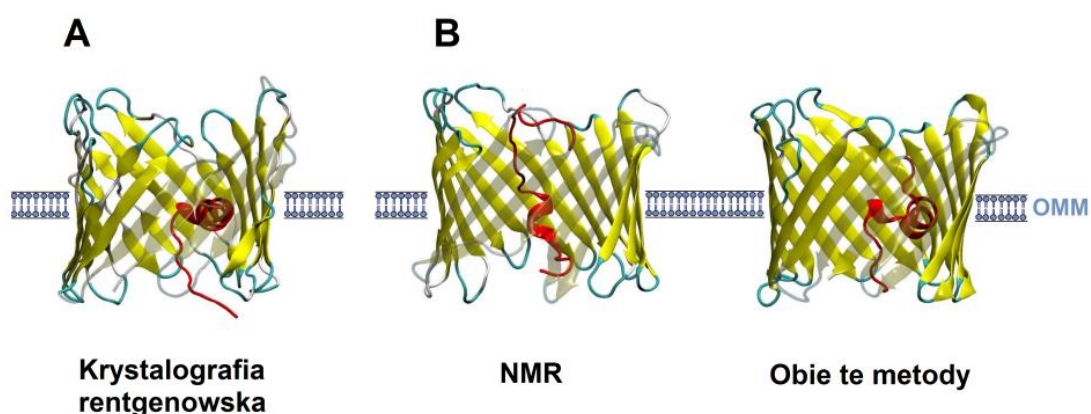
¹ang. *Huntington disease*

²Postać Westphala charakteryzuje się pojawieniem się objawów w wieku młodzieńczym. Najczęściej występuje, gdy liczba powtórzeń CAG w genie *HTT* przekracza 60 (Nicolas i in., 2011).

Wiele danych eksperymentalnych wskazuje na dysfunkcję mitochondriów, jako istotny czynnik w patogenezie HD. Obserwowane zmiany dotyczą między innymi działania: (1) łańcucha oddechowego, (2) systemu regulacji stężenia Ca^{2+} , (3) importu białek i (4) systemu kontroli jakości mitochondriów, obejmującego ich fuzję i fragmentację, jak i eliminację w procesie mitofagii (Bossy-Wetzel i in., 2008; Karachitos i in., 2010; Wang i in., 2014; Golpich i in., 2016). Co istotne, dostępne dane pozwalają stwierdzić, że zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów pojawiają się wcześniej w rozwoju HD i poprzedzają w czasie inne zmiany (Pandey i in., 2010). Potwierdzają to badania pacjentów, u których w przebiegu choroby, mimo prawidłowego odżywiania, występuje utrata masy ciała, zwiększenie intensywności glikolizy oraz wzrost ilości kwasu mlekowego w zmienionych obszarach mózgu (Solans i in., 2006; Bossy-Wetzel i in., 2008).

2.2. Kanał VDAC jako białko zarządzające funkcjonowaniem mitochondriów

Kanał VDAC³ jest białkiem zlokalizowanym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (OMM⁴) (Schein i in., 1976). Białko to stanowić może około 50% białek OMM i około 0,4% ogółu białek mitochondrialnych (Yamamoto i in., 2006; Shoshan-Barmatz i in., 2010). Mimo znaczących różnic w sekwencji aminokwasów u różnych organizmów eukariotycznych, kanał VDAC charakteryzuje się bardzo konserwatywną strukturą przestrzenną (Rys.2). Jest to 19 amfipatycznych, transbłonowych odcinków o strukturze β , formujących strukturę beczułki β , oraz rejon o strukturze helisy α , pełniący funkcję czujnika potencjału, zlokalizowany na końcu aminowym białka (Zeth, 2010; Karachitos i in., 2015; Shoshan-Barmatz i in., 2015; Homble i in., 2017).



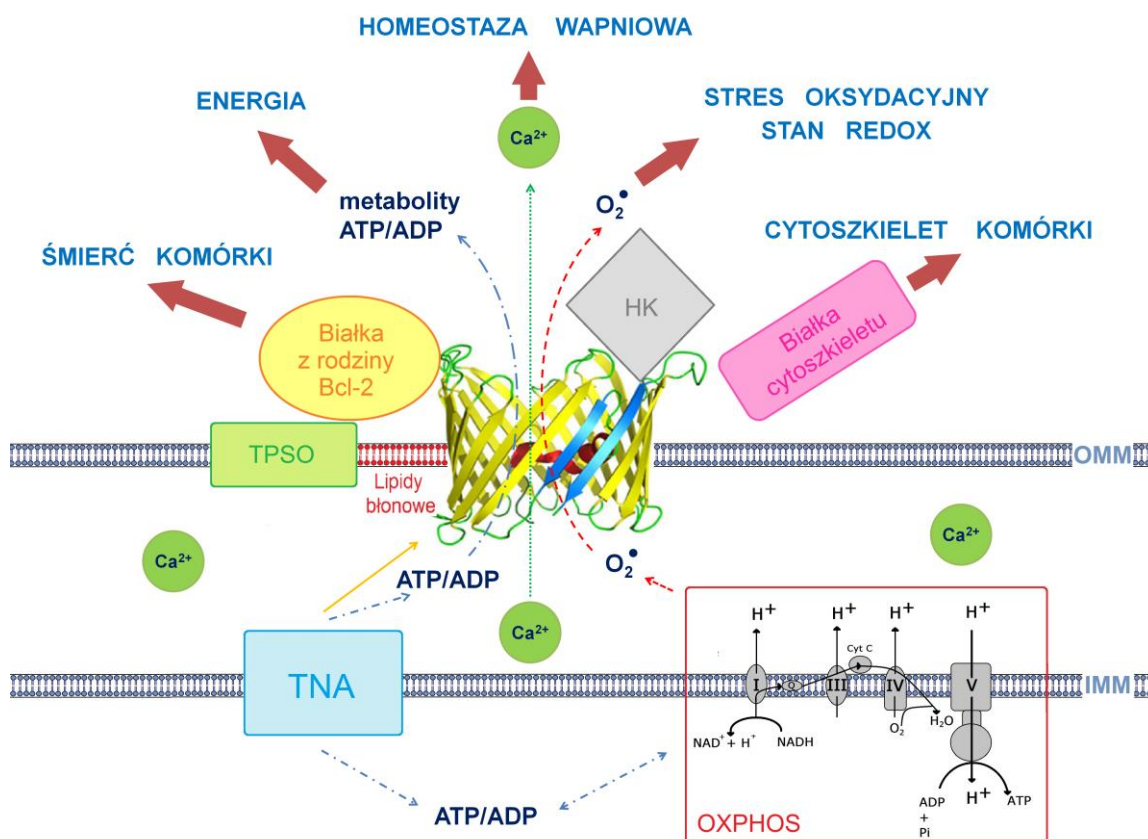
Rysunek 2. Struktura kanału VDAC oparta na danych eksperymentalnych. A: Struktura mysiego VDAC1 uzyskana z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej (kod pdb: 3emn), B: (po lewej) struktura ludzkiego VDAC1 otrzymana z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (kod pdb: 2k4t), (po prawej) struktura ludzkiego VDAC1 otrzymana przy kombinacji obu tych metod (kod pdb: 2jk4). Na żółto zaznaczono odcinki o strukturze β , a na czerwono helisę α . Struktury różnią się położeniem helisy α , która jest elementem ruchomym kanału. Rysunek przygotowany na podstawie Krammer i in., 2011.

Główną funkcją kanału VDAC jest wymiana jonów i metabolitów, w tym substratów łańcucha oddechowego oraz ATP i ADP między cytoplazmą i mitochondriami (Shoshan-Barmatz i in., 2015). W konsekwencji, kanał ten uczestniczy w racjonowaniu ATP, homeostazie Ca^{2+} i egzekucji apoptozy (Colombini, 2004; Shoshan-Barmatz i in., 2010; Insel i in., 2012), a także w regulowaniu stanu redukcyjno-oksydacyjnego (redox) i ekspresji wielu białek, w tym enzymów antyoksydacyjnych, białek zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz białek

³ang. *voltage-dependent anion channel*; pol. zależny od potencjału kanał o selektywności anionowej

⁴ang. *outer mitochondrial membrane*

odpowiedzialnych za komunikację między jądrem komórkowym a mitochondriami (Gałgańska i in., 2010a). Zatem, jak podsumowano na rysunku 3, jest to białko niezbędne do właściwego funkcjonowania mitochondriów, i w konsekwencji całej komórki (Shoshan-Barmatz i in., 2010; Lemasters i in., 2012).



Rysunek 3. Udział Kanału VDAC w procesach komórkowych: bezpośredni i pośredni poprzez oddziaływanie z białkami komórkowymi. TNA - translokaza nukleotydów adeninowych, OXPHOS - białka zaangażowane w fosforylację oksydacyjną (łańcuch oddechowy i syntaza ATP), TSPO⁵ - białko translokatorowe (18kDa), HK - heksokinaza, OMM - błona zewnętrzna mitochondriów, IMM⁶ - błona wewnętrzna mitochondriów. Rysunek przygotowany na podstawie Karachitos i in., 2015.

VDAC może występować w postaci izoform kodowanych przez odrębne geny jądrowe (Blachly-Dyson i Forte, 2001; Young i in., 2007; Messina i in., 2012). U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano dwie izoformy białka VDAC (yVDAC1 i yVDAC2), a w mitochondriach ssaków trzy: VDAC1, VDAC2 i VDAC3. Izoformy te mogą różnić się aktywnością kanałową i w konsekwencji ich funkcjonowanie w mitochondriach może prowadzić do różnych skutków (De Pinto i in., 2016).

⁵ang. *translocator protein*

⁶ang. *inner mitochondrial membrane*

2.2.1. Transport przez błonę zewnętrzną

Funkcjonalny kanał tworzony jest przez pojedyncze białko VDAC, jednak poszczególne kanały VDAC mogą tworzyć kompleksy z innymi kanałami VDAC lub/i z innymi białkami (Malia i Wagner, 2007; Bergdol i in., 2017; Hosaka i in., 2017). Informacje dotyczące aktywności kanałowej białka VDAC uzyskano w wyniku izolacji tego białka z mitochondriów różnych organizmów i rekonstytucji w sztucznych błonach lipidowych (BLM⁷) (Colombini i in., 1996; Karachitos i in., 2016a; Homble i in., 2017). W stanie otwartym kanał VDAC charakteryzuje się wysokim przewodnictwem (4 nS w 1 M KCl) i selektywnością anionową, co umożliwia transport cząsteczek o masie do 5 kDa (Colombini, 2012), zarówno małych jonów, jak i metabolitów, takich jak nukleotydy adeninowe i reaktywne formy tlenu (RFT⁸) (Colombini, 2012; Noskov i in., 2016; Maldonado, 2017a) oraz substraty cyklu kwasów trikarboksylowych, zasilającego łańcuch oddechowy, w tym pirogronian, jabłczan i bursztynian (Peixoto i in., 2012; Noskov i in., 2016). Stan otwarty kanału VDAC obserwowany jest przy niskim, bądź zerowym potencjale. Zwiększenie dodatniego lub ujemnego potencjału powoduje natomiast zamykanie kanału, a tym samym zmniejszenie jego przewodnictwa i zmianę selektywności z anionowej w kierunku kationowej (Shoshan-Barmatz i in., 2010; Noskov i in., 2016). Do tej pory nie udało się jednak stwierdzić, jak ta regulacja przewodnictwa przez przyłożony potencjał przebiega w przypadku białka zlokalizowanego w OMM, ponieważ nie udało się jednoznacznie określić wartości potencjału w poprzek tej błony (Lemeshko, 2002; Homble i in., 2017).

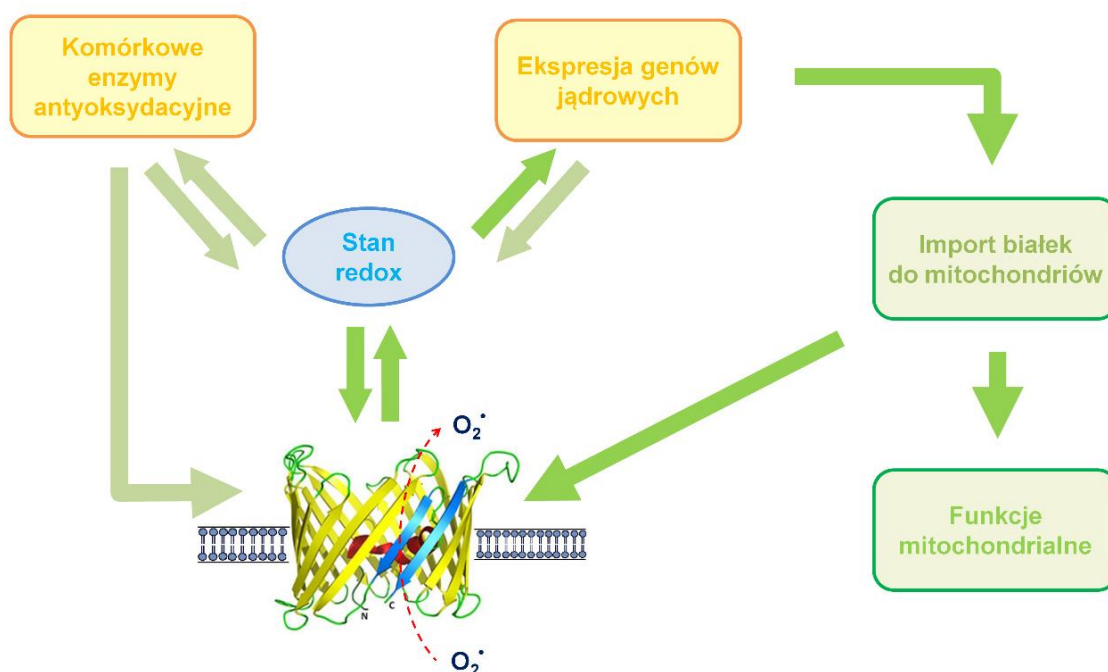
Istnieją także doniesienia wskazujące, że białka VDAC, w tym ich różne izoformy, mogą oddziaływać między sobą, przyjmując tym sposobem w błonie różne stany oligomeryzacji, od monomeru, dimeru, terameru po oktamer (Hoogenboom i in., 2007; Malia i Wagner, 2007; Hosaka i in., 2017). Oligomeryzacja kanału VDAC może być kluczowa dla oddziaływania z innymi białkami i/lub modyfikowana przez te oddziaływania (Malia i Wagner, 2007). Co istotne, uważa się, iż może ona prowadzić do pojawienia się w OMM kanału o dużej przepuszczalności, umożliwiającego na przykład uwalnianie cytochromu c i innych białek proapoptotycznych z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej (Shoshan-Barmatz i in., 2010; McCommis i Baines, 2012; Geula i in., 2012; Bergdol i in., 2017; Hosaka i in., 2017).

⁷ang. *black lipid membrane*; pol. czarne błonki lipidowe

⁸ang. *reactive oxygen species*

2.2.2. Regulacja ekspresji białek komórkowych

Dzięki wykorzystaniu modelu w postaci drożdży *S.cerevisiae* wykazano, że stan redoks w mitochondriach i cytozolu związany jest z obecnością izoform białka VDAC (Gałgańska i in., 2008). Co istotne, stwierdzono także, że stan ten to jeden z elementów regulacji poziomu ekspresji białek pełniących w komórkach różne funkcje redoks, a w jego zachowaniu pośredniczą izoformy białka VDAC (Gałgańska i in., 2008, 2010a, 2010b). Są to między innymi białka odpowiedzialne za usuwanie anionorodnika ponadtlenkowego (MnSOD^9 , CuZnSOD^{10}), a także posiadające funkcje kanałowe podjednostki kompleksów OMM uczestniczących w imporcie białka (Tom40 i Tob55/Sam50). Stan redoks reguluje również ekspresję jądrowego czujnika stanu redoks (Sir2) i białek uczestniczących w adaptacji komórki do tych zmian (Skn7, Msn2, Msn4, Yap1, Yap2), jak i białek odpowiedzialnych za komunikację jądro-mitochondria (Rtg2). Stwierdzono także, że w przypadku pewnych białek (Rtg1 i Hap4¹¹) izoforma yVDAC1 może pośredniczyć w regulacji ekspresji w sposób niezależny od wewnątrzkomórkowego stanu redoks. Jednakże mechanizm tej regulacji nadal pozostaje niewyjaśniony. Niewątpliwie jednak, jak podsumowano na rysunku 4, kanał VDAC pośredniczy tym sposobem w regulacji działania mitochondriów.



Rysunek 4. Schemat udziału kanału VDAC w regulacji ekspresji białek komórkowych. Rysunek przygotowany na podstawie Gałgańska i in., 2010.

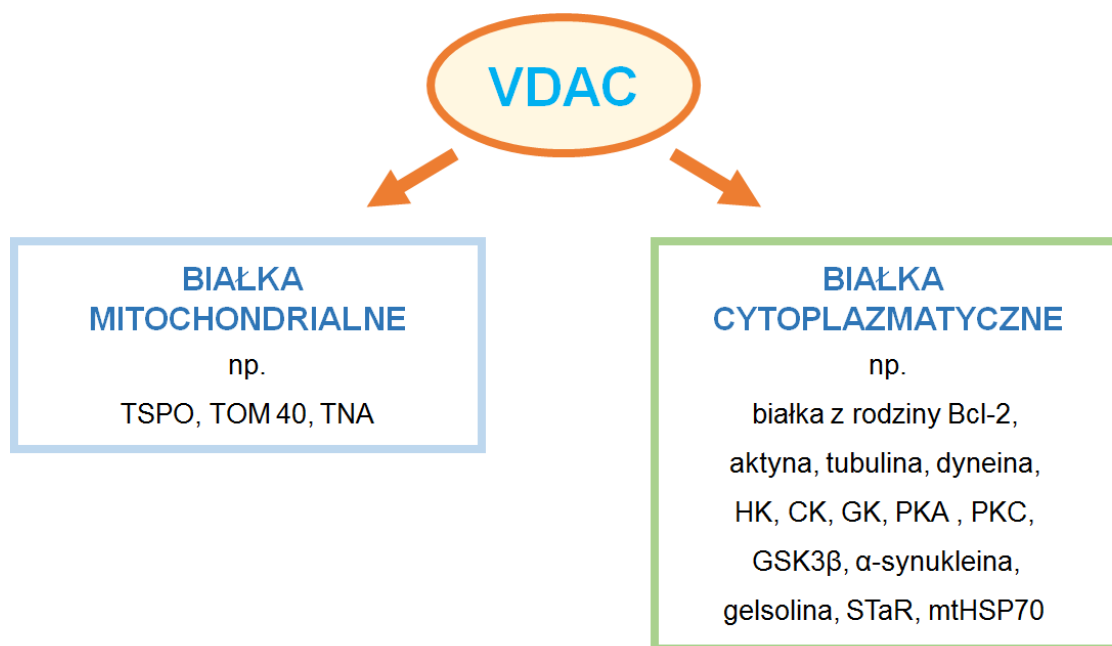
⁹zależna od manganu dysmutaza ponadtlenkowa

¹⁰zależna od miedzi i cynku dysmutaza ponadtlenkowa

¹¹czynn timerkrypcyjny uczestniczący w regulacji ekspresji genów kodujących białka metabolizmu tlenowego

2.2.3. Oddziaływania z białkami mitochondrialnymi i cytoplazmatycznymi

Według bazy danych BioGrid¹², dla izoform ludzkiego białka VDAC stwierdzono do tej pory następującą liczbę oddziałujących białek: VDAC1 – 137, VDAC2 – 130 i VDAC3 – 113. Rysunek 5 przedstawia wybrane oddziaływania VDAC z białkami mitochondrialnymi i cytoplazmatycznymi.



Rysunek 5. Wybrane oddziaływania VDAC z białkami pochodzenia mitochondrialnego i cytoplazmatycznego. Białka mitochondrialne: TSPO, mitochondrialne białko translokatorowe; TOM40¹³; TNA, translokaza nukleotydów adeninowych. Białka cytoplazmatyczne: HK - heksokinaza, CK¹⁴ - kinaza keratynowa, GK¹⁵ - kinaza glicerolowa, PKA¹⁶ - kinaza białkowa A, PKC¹⁷ - kinaza białkowa C, GSK3β¹⁸ - 3β-syntaza glikogenu, STaR¹⁹. Rysunek przygotowany na podstawie Kusano i in., 2000; Xu i in., 2001; Shoshan-Barmatz i Israelson, 2005; Rostovtseva i Bezrukov, 2008; Rostovtseva i in., 2008; Shoshan-Barmatz i in., 2008a, 2010, 2015; Lemasters i in., 2012; Fan i Papadopoulos, 2013; Lemeshko, 2014; Maldonado, 2017b.

VDAC wraz z TNA i STaR oddziałuje z TSPO, białkiem odpowiedzialnym za wewnątrzmitochondrialny transport cholesterolu i steroidogenezę, co prowadzi do hamowania tych procesów (Frison i in., 2017). Jednocześnie, TSPO, zmieniając oddziaływanie kanału VDAC z kinazami, reguluje jego przewodnictwo, np. dla jonów Ca²⁺ (Frison i in., 2017). Oddziaływanie kanału VDAC z kinazami (np. HK i CK) i TNA,

¹² <https://thebiogrid.org/>

¹³ang. *translocase of outer mitochondrial membrane 40*

¹⁴ang. *creatine kinase*

¹⁵ang. *glycerol kinase*

¹⁶ang. *protein kinase A*

¹⁷ang. *protein kinase C*

¹⁸ang. *glycogen synthase kinase 3β*

¹⁹białko regulujące transfer cholesterolu w mitochondriach

jest fundamentem systemu transportu nukleotydów adeninowych (Poleti, 2009; Shoshan-Barmatz i in., 2010). System ten jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania komórki, bowiem sprawny transport ADP do matriks mitochondrialnej jest warunkiem zachodzenia fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS). Dzięki oddziaływaniu z VDAC, HK, będąca pierwszym enzymem glikolizy, uzyskuje bezpośredni dostęp do mitochondrialnej puli ATP, niezbędnej do fosforylacji glukozy (Arora i Pedersen, 1988).

Oddziaływania VDAC z innymi białkami mogą znacząco zmienić funkcjonowanie całej komórki. Na przykład, badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, że oddziaływanie VDAC z HK może doprowadzić w komórkach nowotworowych do hamowania apoptozy regulowanej przez mitochondria (szlak wewnątrzpochodny) (Abu-Hamad i in., 2008; Arzoine i in., 2009; Shoshan-Barmatz i in., 2017). Oddziaływanie to może bowiem przeciwdziałać oddziaływaniu mitochondriów z białkami proapoptotycznymi z rodziny Bcl-2. Z kolei oddziaływanie mitochondriów z białkami proapoptotycznymi z rodziny Bcl-2 może wynikać z upośledzenia oddziaływania hVDAC z HK, bowiem powstanie kompleksu HK-VDAC zmienia wrażliwość mitochondriów na czynniki proapoptotyczne (Pastorino i Hoek, 2008; Shoshan-Barmatz i in., 2015; Homble i in., 2017). Co więcej, wiele danych eksperymentalnych wskazuje na współdziałanie kanału VDAC z białkami pro- i antyapoptotycznymi z rodziny Bcl-2, takimi jak Bax, Bid, Bim i Bcl-xL, w regulowaniu szlaku wewnątrzpochodnego apoptozy, przy czym istotne znaczenie dla skutków tego oddziaływania ma także izoforma białka VDAC (Shimizu i in., 2000; Sugiyama i in., 2002; Alexander i in., 2007; Malia i Wagner, 2007; Tajeddine i in., 2008; Arbel i Shoshan-Barmatz, 2009; Abu-Hamad i in., 2009; Arzoine i in., 2009; Shoshan-Barmatz i Golan 2012; Shoshan-Barmatz i in., 2015, 2017). Stwierdzono na przykład, że białko Bax przyspiesza wpływ sacharozy z proteoliposomów zawierających izoformę VDAC1, podczas gdy Bcl-xL hamuje ten proces. Białko Bcl-xL hamuje również uwalnianie cytochromu c indukowane przez białka Bax i Bim (Shimizu i in., 1999, Sugiyama i in., 2002). Co ciekawe podobne działanie wykazują przeciwciała anti-VDAC1 (Shimizu i in., 2001; Shoshan-Barmatz i in., 2015). Z drugiej strony, kiedy izoforma VDAC1 łączy się CK, powinowactwo VDAC1 do HK i Bax znacząco się obniża (Vysokikh i in., 2004).

Jak wspomniano wcześniej VDAC oddziałuje także z białkami cytoszkieletu, na przykład z tubuliną, która jest białkiem tworzącym protofilamenty mikrotubul. Mikrotubule zbudowane są z heterodimerów tubuliny, składających się z tubuliny α i tubuliny β . Każda z tych podjednostek posiada ujemnie naładowany koniec karboksylowy, który oddziałuje z białkiem VDAC i blokuje jego aktywność, przy czym efekt ten związany jest z izoformą tworzącą kanał (Maldonado i in., 2013; Zhang i in., 2016). W konsekwencji, tubulina, kiedy nie podlega polimeryzacji, może w sposób

odwracalny regulować przepuszczalność kanału VDAC, zależnie od tworzącej ten kanał izoformy (Maldonado i in., 2010, 2013). Oddziaływania białka VDAC z białkami cytoszkieletu uznawane są także za istotny element oddziaływania cytoszkieletu z mitochondriami (Shoshan-Barmatz i in., 2010). Na przykład, dla izoformy VDAC1 człowieka, stwierdzono oddziaływanie z białkiem MAP2²⁰ (Linden i Karlsson, 1996), gelsoliną, białkiem odpowiedzialnym za składanie i rozkładanie filamentów aktynowych (Kusano i in., 2000), aktyną w stanie monomeru (Xu i in., 2001), łańcuchem lekkim dyneiny i mortalina (PBP74²¹), białkiem biorącym udział w podziałach komórkowych (Schwarzer i in., 2002).

2.2.4. Element systemu kontroli jakości mitochondriów

Wynikiem działania mitochondrialnego łańcucha oddechowego jest powstawanie RFT. W przypadku braku równowagi między ich produkcją, a zdolnościami komórki do utylizacji RFT, mamy do czynienia z sytuacją stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do wielu patologii, m.in. zaburzenia wewnątrzkomórkowego stanu redoks, hamowania aktywności białek mitochondrialnych, takich jak: syntaza ATP i kompleks I łańcucha oddechowego (dehydrogenaza NADH), a także uszkodzenia mitochondrialnego DNA i peroksydacji kwasów tłuszczowych, a w konsekwencji śmierci komórki (Zhang i in., 1990; Maldonado i in., 2017b).

Prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów ma podstawowe znaczenie dla uruchomienia odpowiedniej odpowiedzi na zaistniały stres i utrzymania równowagi metabolicznej. Z kolei funkcjonowanie to jest regulowane przez system kontroli jakości mitochondriów, który umożliwia usunięcie wadliwych mitochondriów i zastąpienia ich nowymi (Okamoto i Kondo-Okamoto, 2012). W systemie tym kluczową rolę odgrywają procesy określane mianem dynamiki mitochondriów (tj. fuzja i fragmentacja mitochondriów, ich morfologia, rozmiar i przemieszczanie się), umożliwiające oddzielenie wadliwych mitochondriów jak i wyrównanie poziomu mitochondrialnego DNA, białek i metabolitów oraz mitofagia, umożliwiającą degradację i „recykling” wadliwych mitochondriów (Hill i in., 2012; Golpich i in., 2016; Anzell i in., 2017). Co ciekawe, dostępne dane wskazują, że dynamika mitochondriów i mitofagia są współzależne (Ni i in., 2015), a VDAC odgrywa istotną rolę w mitofagii (Gatliff i in., 2014).

²⁰ang. *microtubule-associated protein 2*

²¹ang. *heat-shock protein peptide-binding protein 74*

2.2.5. Funkcjonalne zróżnicowanie izoform

Dostępne dane wskazują, że pomimo wysokiej homologii sekwencji aminokwasowej i podobieństwa przewidywanej struktury przestrzennej (Amodeo i in., 2014), izoformy białka VDAC wykazują różnice właściwości, które sugerują ich różne znaczenie funkcjonalne. Jest to na przykład widoczne w przypadku izoformy yVDAC1 i yVDAC2 drożdży *S.cerevisiae* (p. 2.2). Kanoniczną aktywność kanałową, obejmującą selektywność anionową w stanie otwartym i bardziej kationową w jednym z podstanów zamkniętych jak i zależność od potencjału wykazano tylko dla yVDAC1 (Forte i in., 1987), podczas gdy dla białka yVDAC2 aktywności kanałowej nie udało się do tej pory stwierdzić. Jednak białko to, kiedy poddane zostanie nadekspresji jest w stanie doprowadzić do rewersji fenotypu mutanta pozbawionego funkcjonalnej izoformy yVDAC1 (Blachly-Dyson i in., 1997; Lee i in., 1998), przy czym funkcja tego białka pozostaje do tej pory nieznana. Inny przykład prawdopodobnego zróżnicowania funkcjonalnego izoform VDAC stanowią izoformy tego białka u człowieka (De Pinto i in., 2016). Jeszcze do niedawna uważano, że tylko izoformy VDAC1 i VDAC2 są w stanie tworzyć funkcjonalny kanał o nieco odmiennej charakterystyce (Messina i in., 2012; Maurya i Mahalakshmi, 2015; Karachitos i in., 2016b). Ostatnio wykazano jednakże, że także izoforma VDAC3 może tworzyć funkcjonalny kanał, jednak jego charakterystyka elektrofizjologiczna jest do tej pory przedmiotem dyskusji (Checchetto i in., 2014; Okazaki i in., 2015; Karachitos i in., 2016b; Reina i in., 2016a, 2016b).

Izoforma VDAC1 została do tej pory najlepiej scharakteryzowana. Udało się ją także skryształizować i rozwiązać jej strukturę przestrzenną, z wysoką rozdzielczością, na poziomie atomowym (Rys.2). W badaniach tych analizowano strukturę białka VDAC1 izolowanego z mitochondriów człowieka i myszy, przy czym stwierdzono, iż są one niemal identyczne (DeLano, 2003; Shoshan-Barmatz i in., 2010; Krammer i in., 2011; Bergdoll i in., 2017; Hombler i in., 2017). Wysoka homologia w obrębie ssaczych VDAC, a także skryształizowanie izoformy VDAC2 izolowanej z mitochondriów *Danio rerio* (Schredelseker i in., 2014) umożliwiło wykonanie badań porównawczych i określenie struktury pozostałych ludzkich izoform (Bergdoll i in., 2017). Zauważono także, że jedna z subtelnych różnic w sekwencji aminokwasowej izoform VDAC ssaków, w tym człowieka, polega na tym, że izoforma VDAC2 zawiera 7 dodatkowych reszt cysteiny (w porównaniu do VDAC1), podczas gdy izoforma VDAC3 (w porównaniu z VDAC1) zawiera 4 dodatkowe reszty cysteiny (Messina i in., 2012; Reina i in., 2016a). Ze względu na możliwość odwracalnego utleniania i udziału tej modyfikacji w fałdowaniu białek, cysteina uznawana jest za aminokwas kluczowy dla ich funkcjonowania. Dostępne wyniki badań wskazują, że w przypadku izoformy

VDAC1 reszty cysteiny nie mają związku z aktywnością kanału. Natomiast w przypadku izoform VDAC2 i VDAC3, dla których stwierdzono podobny rozkład reszt cysteiny, uważa się, że mogą one występować w różnych stanach utlenienia, co z kolei ma istotny wpływ na aktywność kanałową tych izoform. Innymi słowy, obie izoformy mogą tworzyć w OMM kanały o różnej aktywności, zależnie od stopnia utlenienia reszt cysteiny. To z kolei wskazuje, że mogą one stanowić istotne narzędzia modulacji stanu redoks i reakcji mitochondriów na obecność RFT (De Pinto i in., 2016; Reina i in., 2016a). Proponuje się także, że duża liczba reszt cysteiny występująca w izoformach VDAC2 i VDAC3 stanowi ochronę przed gromadzeniem się RFT w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, a ich utlenianie jest sposobem neutralizacji RFT lub jest elementem regulacji ekspresji i aktywności enzymów eliminujących RFT (Messina i in., 2012; Maurya i Mahalakshmi, 2016; Reina i in., 2016a).

Izoformą występującą w komórkach w największej ilości jest VDAC1, podczas gdy w najmniejszej ilości występuje izoforma VDAC3 (Messina i in., 2012; Bergdoll i in., 2017). Badania skutków delecji poszczególnych izoform białka VDAC prowadzone są głównie z wykorzystaniem modelu mysiego. Wyniki tych badań wskazują, iż usunięcie izoformy VDAC1 skutkuje dysfunkcjami układu nerwowego, problemami z uczeniem się, a także przyspieszonym starzeniem i zwiększoną śmiertelnością w okresie zarodkowym (Shoshan-Barmatz i in., 2010). Z kolei brak izoformy VDAC2 jest letalny już na poziomie zarodków (Cheng i in., 2003; Bergdoll i in., 2017), a brak VDAC3, uznawanej za izoformę charakterystyczną dla jąder i włókien zewnętrznych wici plemników, prowadzi do samczej bezpłodności (Sampson i in., 2001; Hinsch i in., 2004; Bergdoll i in., 2017). Stwierdzono także istotne znaczenie izoformy VDAC3 dla prawidłowego funkcjonowania mikrotubul, co z kolei przekłada się na możliwość podziału komórkowego i ruchliwość komórek, np. plemników (De Pinto i in., 2016).

Wyniki badań funkcjonalnych wskazują, że izoforma VDAC1 jest odpowiedzialna za większość transportu metabolitów prowadzonego w poprzek OMM, a ponadto przypisuje się jej działanie proapoptotyczne (Abu-Hamad i in., 2009; Shoshan-Barmatz i in., 2010; Ben-Hail i in., 2016; Bergdoll i in., 2017). Jak wspomniano powyżej (p. 2.2.3), aktywność proapoptotyczna VDAC1 jest tłumaczona konkurencją między heksokinazą i białkami z rodziny Bcl-2 o wiązanie z VDAC (Pastorino i Hoek, 2008; Arbel i Shoshan-Barmatz, 2009). Z kolei izoformie VDAC2 przypisuje się znaczącą rolę w spermatogenezie i oogenezie (Shoshan-Barmatz i in., 2006; Yuan i in., 2015; Maurya i Mahalakshmi, 2016). Co więcej, izoforma ta słabo oddziałuje z heksokinazą (Azoulay-Zohar i Aflalo, 1999) i wykazuje działanie antyapoptotyczne, co tłumaczy się jej oddziaływaniem z białkiem proapoptotycznym Bak, prowadzącym do hamowania tego białka (Cheng i in., 2003). Ze względu na

możliwość modulacji apoptozy, zarówno VDAC1 jak i VDAC2 uznaje się za istotne dla patomechanizmu nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych (De Pinto i in., 2016; Shoshan-Barmatz i in., 2017). Z kolei, izoforma VDAC3 uznawana jest za białko kluczowe w sygnalizacji opartej na zmianie stanu redoks i odpowiedzi na stres oksydacyjny, których dysfunkcja może prowadzić do rozwoju nowotworów, zaburzeń zdrowia psychicznego i chorób infekcyjnych (Reina i in., 2016a, 2016b).

2.3. Znaczenie mitochondriów w przeżywalności komórek

Poza swoją kluczową funkcją bioenergetyczną związaną z funkcjonowaniem łańcucha oddechowego i syntezą ATP, mitochondria biorą udział w szeregu biosyntez, sygnalizacji komórkowej i komunikacji między różnymi organellami, podziałach komórkowych oraz starzeniu i śmierci komórki. W realizację tych funkcji zaangażowanych jest ok. 1000 różnych białek mitochondrialnych, o tkankowo specyficznej ekspresji (Shoshan-Barmatz i in., 2017).

2.3.1. Kluczowy element komórkowej homeostazy

Mitochondria definiowane są często, jako centrum integracji procesów metabolicznych, kluczowych dla wzrostu i przeżycia komórki. Co więcej, obecnie nie ulega już wątpliwości, że mitochondria informują komórkę o swoim stanie funkcjonalnym, jak i uruchamiają mechanizmy komórkowe, których zadaniem jest wyeliminowanie zachodzących zmian lub adaptacja komórki do istniejącej sytuacji (Eisenberg-Bord i Schuldiner, 2017). Mechanizmy leżące u podłoża owej synchronizacji procesów zachodzących w komórce i mitochondriach są od wielu lat przedmiotem dyskusji, przy czym ostatnie doniesienia wskazują na istotną rolę niekodujących RNA (Vendramin i in., 2017).

Ponieważ ponad 90% białek mitochondrialnych kodowanych jest przez geny jądrowe (Schmidt i in., 2010), biogeneza i funkcjonowanie mitochondriów wymaga koordynacji ekspresji genów jądrowych i zlokalizowanych w mitochondrialnym DNA. Stąd, zmiany dotyczące stosunku ilościowego białek kodowanych przez geny jądrowe i mitochondrialne, wynikające ze zmian w poziomie ich syntezy i degradacji, uznaje się za czuły wskaźnik stanu funkcjonalnego mitochondriów i w konsekwencji komórki. Innymi słowy, stan funkcjonalny mitochondriów jest istotny dla komórkowej homeostazy białkowej, co sprawia, że upośledzenie funkcjonowania mitochondriów może doprowadzić do uruchomienia mechanizmu korekcyjnego zlokalizowanego poza mitochondriami (Vendramin i in., 2017). Innym istotnym aspektem udziału mitochondriów w utrzymaniu homeostazy komórkowej jest ich udział w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} (Duszyński in., 2006). Mitochondria akumulują lokalny nadmiar stężenia tych jonów, jak i umożliwiają lokalny wzrost ich stężenia, skutkiem czego przyczyniają się do regulacji działania kanałów wapniowych i poziomu akumulacji jonów Ca^{2+} w obrębie innych magazynów wewnątrzkomórkowych. Jony Ca^{2+} odgrywają kluczową rolę w regulacji

i współdziałaniu białek komórkowych i w konsekwencji uczestniczą w większości procesów wewnątrzkomórkowych. Stąd, nie ulega wątpliwości, że regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , jak i jego zmiany muszą być precyzyjnie regulowane (Berridge i in., 2000). Mitochondria są także funkcjonalnie związane z wewnątrzkomórkowym stanem redoks i stresem oksydacyjnym. Związek ten sprowadza się do: (1) znaczącego udziału w generacji stresu oksydacyjnego w wyniku powstawania RFT (Otti in., 2007; Murphy, 2009), (2) pełnienia roli czujnika RFT w wyniku modyfikacji oraz zmiany ekspresji i aktywności pewnych białek (O'Brien i in., 2004; Karachitos i in., 2009; Nickel i in., 2014; De Pinto i in. 2016; Reina i in., 2016a) i (3) przeciwdziałania stresowi oksydacyjnemu w wyniku uruchomienia mechanizmów antyoksydacyjnych obejmujących między innymi koenzym Q (Giordano i in., 2013) i aktywację enzymów antyoksydacyjnych (Nickel i in., 2014).

2.3.1.1. Przemiany metaboliczne

Dzięki badaniom biochemicznym mitochondriów ustalono, że metabolizm komórkowy podlega ścisłej kompartmentacji (Scheffler, 2002; Eisenberg-Bord i Schuldiner, 2017a; [usmle-forums](http://usmle-forums.com)²²). Cykl kwasów trikarboksylowych, zasilaający łańcuch oddechowy, i w konsekwencji syntezę ATP, jak i utlenianie kwasów tłuszczowych oraz synteza ciał ketonowych zachodzi całkowicie w mitochondriach. Natomiast inne szlaki i cykle (np. glukoneogeneza, cykl mocznikowy, synteza centrów żelazowo-siarkowych, hemu, kardiolipiny, chinonu i sterydów) obejmuje także etapy zachodzące poza mitochondriami. Nie ulega jednak wątpliwości, że przebieg tych procesów jest ściśle skoordynowany z energetycznymi potrzebami i możliwościami komórki (Eisenberg-Bord i Schuldiner, 2017b). Ponadto mitochondria odgrywają kluczową rolę w regulacji poziomu metabolitów kluczowych dla różnych procesów komórkowych (Nunnari i Suomalainen, 2012).

2.3.1.2. Koordynacja działania z innymi organellami i strukturami komórkowymi

Aby móc realizować rozliczne funkcje w sposób skoordynowany z możliwościami i potrzebami komórki, mitochondria muszą kontaktować się z innymi elementami komórki. Ponieważ są w zasadzie wyłączone z wewnątrzkomórkowego systemu obrotu pęcherzyków, kontakt ten polega na wykorzystaniu sieci szlaków sygnalizacyjnych oraz tworzeniu miejsc kontaktowych między błonami, co umożliwia

²² www.usmle-forums.com/usmle-step-1-bits-pieces/8803-cytoplasmic-versus-mitochondrial-metabolic-processes.html

wymianę małych cząsteczek, jonów i lipidów (Eisenberg-Bord i Schuldiner, 2017a). W przypadku jądra komórkowego wykorzystywane są głównie szlaki sygnalizacyjne i białka o podwójnej lokalizacji (Eisenberg-Bord i Schuldiner, 2017b). W przypadku pozostałych organelli i struktur komórkowych dominują błonowe miejsca kontaktowe. Najbardziej znane przykłady dotyczą komunikacji mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną (ER²³), lizosomami, peroksosomami, błoną komórkową i kroplami lipidowymi (Eisenberg-Bord i Schuldiner, 2017a; Ellenrieder i in., 2017).

Miejsca kontaktu między mitochondriami i ER zaangażowane są w podział mitochondriów oraz wymianę jonów, głównie Ca²⁺ i lipidów błonowych, jak i też metabolitów, w tym RFT (Michael i Kornmann, 2012; Szymański i in., 2017). Ich powstanie jest modulowane na różne sposoby i przez liczne białka, w tym mitofuzyny, kluczowe dla przebiegu fuzji mitochondriów (Szymański i in., 2017). Miejsca kontaktu powstające między mitochondriami i lizosomami uznaje się za istotne dla regulacji poziomu lipidów w mitochondriach oraz wymiany jonów, w tym jonów żelaza i aminokwasów (Sheftel i in., 2007; Elbaz-Alon i in., 2014). Co ciekawe, miejsca te pozostają w funkcjonalnym związku z miejscami kontaktu mitochondriów z ER (Eisenberg-Bord i Schuldiner, 2017a). Warto także wspomnieć, iż lizosomy są miejscem docelowym, do którego trafiają pęcherzyki odpączkowujące z mitochondriów i zawierające nieprawidłowe białka (Braun i Westermann, 2017). Z kolei miejsca kontaktu mitochondriów z peroksosomami umożliwiają wspólną regulację szlaków metabolicznych. Co warto podkreślić, peroksosomy uznaje się obecnie za struktury pochodzenia mitochondrialnego, powstałe na bazie pęcherzyków, które odpączkowały od mitochondriów (Eisenberg-Bord i Schuldiner, 2017a). Oddziaływania błony komórkowej z mitochondriami uznaje się za istotne dla przebiegu podziału komórek. Co więcej wykazano, że około 10% błony komórkowej może być pokryte mitochondriami, co podkreśla znaczenie tych kontaktów (Szymański i in., 2017).

Krople lipidowe opisywane są jako magazyny lipidów, zawierające przede wszystkim triacyloglicerole i estry steroli, które zabezpieczają potrzeby strukturalne i metaboliczne mitochondriów (Walther i Farese, 2012). Oddziaływania mitochondriów z kroplami lipidowymi są na razie zagadnieniem mało poznanym. Stwierdzono jednakże zwiększenie intensywności tych oddziaływań w komórkach ssaków po wysiłku fizycznym, jak i proponuje się, że mogą one pełnić istotną rolę w regulacji odpowiedzi na stres i egzekucji apoptozy (Shaw i in., 2008; Bischof i in., 2017).

²³ang. *endoplasmic reticulum*

2.3.1.3. Komunikacja z jądrem komórkowym

Jak wspomniano powyżej (p.2.3.1), funkcjonowanie mitochondriów zależy od koordynacji realizacji informacji zawartej w genomie jądrowym i mitochondrialnym. Zatem, ekspresja genów zawartych w tych genomach podlega koregulacji. Sygnały anterogradowe, które powstają w jądrze komórkowym i są następnie kierowane do mitochondriów, kontrolują ekspresję genów w mitochondriach, w odpowiedzi na czynniki wewnętrzne i środowiskowe. Sygnały retrogradowe, powstające w mitochondriach i kierowane do jądra komórkowego, mogą natomiast modyfikować mechanizmy anterogradowe (Allen, 2003; Butow i Avadhani, 2004; Pesaresi i in., 2007; Woodson i Chory, 2008; Matilainen i in., 2017). Zdolność do syntezy ATP, dostępność O_2 i produkcja RFT odzwierciedlają stan funkcjonalny mitochondriów. Równocześnie stanowią podstawę informowania jądra komórkowego o zmiennych warunkach środowiska wewnętrznego, i w konsekwencji prowadzić mogą do uruchomienia mechanizmów adaptacyjnych i naprawczych. Znaczącą rolę w komunikacji między jądrem a mitochondriami przypisuje się ostatnio mechanizmom epigenetycznym (Matilainen i in., 2017). Sygnały metaboliczne pochodzące z mitochondriów mogą uruchamiać zmiany modyfikacji epigenetycznych w jądrze komórkowym. Z kolei tzw. „epigenom jądrowy” może modulować funkcjonowanie mitochondriów w różny sposób. Co więcej, modyfikacje epigenetyczne postulują się również dla mitochondrialnego DNA. Zatem, oprócz sieci szlaków sygnalizacyjnych stanowiących podstawę działania sygnałów anterogradowych i retrogradowych, w procesie komunikacji między jądrem komórkowym i mitochondriami istnieje jeszcze dodatkowy mechanizm związany z regulacją modyfikacji epigenetycznych. Jest to jednakże na razie zagadnienie słabo poznane.

2.3.1.4. Element systemu kontroli jakości cytozolu i innych przedziałów komórkowych

Dostępne dane wskazują, że mitochondria prawdopodobnie aktywnie uczestniczą w utrzymaniu homeostazy w obszarach pozamitochondrialnych komórki. Dostępne dane wskazują bowiem, że OMM może być miejscem rekrutacji cytoplazmatycznego systemu ubikwityna-proteasom, co z kolei umożliwia degradację białek oddziałujących z białkami OMM, przestrzeni międzybłonowej i prawdopodobnie IMM (Braun i Westermann, 2017). Zjawisko to określane skrótem MAD²⁴ prawdopodobnie uczestniczy w degradacji nieprawidłowych białek w trakcie ich importu do mitochondriów, ale także białek nie-mitochondrialnych, w tym o błędnej lokalizacji

²⁴ang. *mitochondria-associated degradation*; pol. degradacja związana z mitochondriami

lub wchodzących w skład agregatów cytoplazmatycznych oddziałujących z OMM. Co ciekawe, istnieje związek między aktywnością systemu ubikwityna-proteasom, a stanem funkcjonalnym mitochondriów (Ross i in., 2015). Postuluje się także, że dysfunkcja mitochondriów może skutkować zmniejszeniem akumulacji rozfałdowanych białek w cytozolu, co związane jest ze zwiększeniem poziomu białek opiekuńczych w cytozolu (Kim i in., 2016). Mechanizm ten jest prawdopodobnie oparty na zmianie w mitochondrialnym metabolizmie lipidów (Braun i Westermann, 2017). Co więcej, RFT uwalniane przez mitochondria mogą przyczynić się do modulacji aktywności systemu ubikwityna-proteasom (Segref i in., 2014).

2.3.2. Udział w procesach śmierci komórek

Zgodnie z rekomendacją Komitetu do spraw Nazewnictwa Śmierci Komórkowej²⁵ obecnie wyróżnia się trzy typy śmierci komórki: przypadkową, regulowaną i programowaną (Galluzzi i in., 2015). Śmierć przypadkowa, przypominająca pod względem morfologicznym nekrozę, jest procesem niekontrolowanym, wywołanym przez ekstremalne czynniki chemiczne i fizyczne. Śmierć regulowana wykazuje natomiast cechy nekrozy i apoptozy oraz podlega modulacji przez czynniki farmakologiczne i genetyczne. Z kolei śmierć programowana wykazuje cechy typowe dla apoptozy i jest wariantem śmierci programowanej, zachodzącej w ramach procesów rozwojowych lub w dojrzałym organizmie w celu utrzymania homeostazy w tkankach. Obecnie nie ulega już wątpliwości, że mitochondria uczestniczą we wszystkich wymienionych typach śmierci (Wang i in., 2017; Dawson i Dawson, 2017).

Śmierć przypadkowa wynika z "zalanía" komórki jonami wapnia na skutek utraty możliwości regulacji homeostazy wapniowej w wyniku dysfunkcji mitochondriów. W przypadku śmierci regulowanej i programowanej, udział mitochondriów polega przede wszystkim na uwalnianiu białek, które biorą udział w egzekucji wewnątrzpochodnych szlaków śmierci, w tym wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy (Dawson i Dawson, 2017). Mechanizm tego uwalniania jest nadal przedmiotem dyskusji. Nie ulega jednak wątpliwości, że istotną rolę odgrywają w nim białka z rodziny Bcl-2 i białko VDAC (Shoshan-Barmatz i in., 2017) (p.2.2.3, 2.2.5, 2.4.3 i 2.5.1). Ze względu na kluczowe znaczenie kanału VDAC dla funkcjonowania mitochondriów (p.2.2), jego nieprawidłowe działanie może być przyczyną dysfunkcji mitochondriów i przypadkowej śmierci komórki.

²⁵ang. *nomenclature committee on cell death*, NCCD

2.4. Dysfunkcja mitochondriów w rozwoju choroby Huntingtona

Badania wykorzystujące modele zwierzęce pozwoliły zidentyfikować następujące zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów, które, co istotne, poprzedzają w czasie inne zmiany chorobowe występujące w patogenezie HD: (1) oddziaływanie mHtt z OMM, (2) zmniejszenie syntezy ATP, (3) zmiana wrażliwości na jony wapnia, (4) zwiększona podatność na permeabilizację błon mitochondrialnych (MMP²⁶), (5) zmiany w przebiegu fuzji i fragmentacji mitochondriów i (6) osłabienie biogenezy mitochondriów (Solans i in., 2006; Ghavami i in., 2013; Johri i in., 2013; Golpich i in., 2016). Zatem, w przebiegu HD obserwuje się zmiany funkcji metabolicznych mitochondriów, ich dynamiki i oraz liczebności.

2.4.1. Funkcje metaboliczne

Komórki nerwowe ze względu na swoje funkcje wykazują ogromne zapotrzebowanie na ATP. Szacuje się, że mózg stanowi tylko ok. 2% masy ciała, podczas gdy wymaga ok. 20% energii przekształcanej przez mitochondria (Wang i in., 2009a). Syntetyzowane w mitochondriach ATP wykorzystywane jest w neuronach do utrzymywania potencjału błonowego, egzocytozy i wychwyty zwrotnego neuroprzekaźników, gromadzenia rezerwowej puli pęcherzyków na wypadek długotrwałego lub intensywnego uwalniania neuroprzekaźnika, a także transportu jonów i organelli w obrębie dendrytów i aksonu. Mitochondria kontrolują także stężenie Ca^{2+} w neuronach, które ma podstawowe znaczenie dla egzocytozy neuroprzekaźnika i regulacji ekspresji genów (Karachitos i in., 2010; Karachitos i in., 2016a, Liot i in., 2017). Podsumowując, prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania neuronów.

Dla rozważania roli zmian funkcji metabolicznych w patogenezie HD kluczowa wydaje się obserwacja, że mysie zarodkowe komórki macierzyste (ESC²⁷) pozbawione genu *HTT* wykazują zwiększone zapotrzebowanie na glukozę i zmniejszone zużycie tlenu (Ismailoglu i in., 2014; Wiatr i in., 2017), co wskazuje na zakłócenie funkcjonowania mitochondriów. Jednocześnie w badaniach *post mortem* chorych z HD stwierdza się zmniejszenie aktywności II, III i IV kompleksu łańcucha oddechowego, co niewątpliwie istotnie upośledza skuteczność przekształceń energetycznych (Bossy-Wetzel i in., 2008; Reddy i in., 2009; Krzysztoń-Russjan i in., 2013; Naia i in., 2015;

²⁶ ang. *mitochondrial membrane permeabilization*

²⁷ ang. *embryonic stem cells*; pol. embrionalne komórki macierzyste

Golpich i in., 2016). Ponadto badania na gryzoniach z wykorzystaniem kwasu 3-nitropropionowego (3-NP), nieodwracalnego inhibitora kompleksu II łańcucha oddechowego, stosowanego jako kluczowy element eksperymentalnego modelu HD, pozwoliły stwierdzić zmiany analogiczne do tych obserwowanych w przebiegu HD (Brouillet i in., 2005; Liot i in., 2009; Gao i in., 2017). Kompleks II mitochondrialnego łańcucha oddechowego (dehydrogenaza bursztynianowa), zasila proces fosforylacji oksydacyjnej, a także uczestniczy w cyklu kwasów trikarboksylowych. Dlatego upośledzenie jego działania prowadzi do znacznego zmniejszenia syntezy ATP i tym samym do dramatycznego w skutkach deficytu energetycznego komórki (Majumder i in., 2007). Systematyczne podawanie 3-NP szczurom i ssakom naczelnym wywołuje wybiórczą utratę neuronów w obszarze prążkowiec oraz zaburzenia ruchowe i psychiczne, typowe dla HD (Lioti in., 2009; Solesio i in., 2017). Badania nad toksycznością 3-NP i mHtt ujawniły także upośledzenie gospodarki wapniowej komórek i aktywację kaspaz (Liot i in., 2009, Gao i in., 2017). Zwiększenie ekspresji podjednostek kompleksu II w badanych komórkach prążkowiec przywraca aktywność oddechową tego kompleksu i chroni komórki przed śmiercią. Co ciekawe, przy wykorzystaniu szczurzego modelu HD stwierdzono, że zmiany przeżywalności wchodzących w jego skład komórek współwystępują ze zmianami statusu energetycznego mitochondriów, które z kolei współwystępują ze zmianami w funkcjonowaniu kanału VDAC (Karachitos i in., 2016a).

Zaobserwowano także upośledzenie produkcji ATP w mysich ESC z ekspresją mHtt, jednak dane uzyskane przez dwie grupy (Jacobsen i in., 2011 i Ismailoglu i in., 2014), wskazują różnice we wpływie ekspresji mHtt na poziom syntezy ATP (Wiatr i in., 2017), co prawdopodobnie wynika z różnej liczby reszt glutaminy w białku i różnic struktury powstających mRNA (Tawani i Kumar, 2015). Ponadto, u chorych na HD, jak również w zróżnicowanych neuronach, obserwowano zaburzenia szlaków syntezy lipidów i cholesterolu (Leoni i Caccia, 2015; HD iPSC Consortium, 2012), przebiegających w komórkach dzięki współpracy ER z mitochondriami. Co istotne, w przebiegu HD wykazano również mutacje mitochondrialnego DNA, co obok upośledzenia funkcji metabolicznych prowadzi do osłabienia biogenezy mitochondriów (Bossy-Wetzel i in., 2008; Golpich i in., 2016). Z drugiej strony ekspresja mHtt prowadzi do hamowania aktywności proteosomu, co skutkuje akumulacją agregatów mHtt i wzmocnieniem upośledzenia funkcji metabolicznych mitochondriów (Golpich i in., 2016).

2.4.2. Dynamika mitochondriów

Mitochondria są strukturami niezwykle dynamicznymi, zmieniającymi swój kształt i położenie w komórce, jak i morfologię i rozmiar, w wyniku procesów fuzji i fragmentacji (Westermann, 2012) (p.2.2.4 i 2.3.1.2). Proces fuzji, czyli łączenia się mitochondriów, jest niezbędny dla komunikacji między mitochondriami oraz ułatwia ich rozmieszczenie i przemieszczanie się w komórce. Proces fragmentacji z kolei umożliwia odnowę, redystrybucję i zwiększenie liczby mitochondriów (Shirendeb i in., 2011). Oba te procesy podlegają ścisłej kontroli i regulacji poprzez liczne białka występujące w cytozolu i mitochondriach. Dostępne dane wskazują, że podstawową rolę w procesie fuzji i fragmentacji mitochondriów odgrywają GTPazy. Są to mitofuzyny (MFN1 i MFN2) oraz Opa1 uczestniczące w fuzji oraz białka Drp1 i Fis1, regulujące proces fragmentacji mitochondriów (Iwasawa i in., 2011; Shirendeb i in., 2011; Gao i in., 2017). W przebiegu HD obserwuje się zwiększoną fragmentację mitochondriów (Kim i in., 2010; Johri i in., 2012a), co tłumaczy się zmianami w ekspresji lub modyfikacjami potranslacyjnymi Drp1, mitofuzyn i Fis1 (Song i in., 2011; Shirendeb i in., 2012) i interpretuje jako przyczynę znaczącego uszkodzenia synaps w obrębie dendrytów (Haun i in., 2013). W badaniach mózgów chorych w początkowym stadium HD, w prążkowie i korze mózgowej stwierdzono zwiększoną ekspresję białek Drp1 i Fis1 oraz zmniejszoną ekspresję MFN1, MFN2, i Opa1 (Reddy i Shirendeb, 2012). Co ciekawe zastosowanie Mdivi-1, inhibitora fragmentacji mitochondriów, zapobiega efektom obecności mHtt na dynamikę mitochondriów (Manczak i Reddy, 2015). Wykazano także możliwość bezpośredniego oddziaływania mHtt z Drp1 i MFN2, powodującego zmianę ich aktywności (Wang i in., 2009b; Song i in., 2011; Gao i in., 2017) (p.2.5).

Neurony są wysoce wyspecjalizowanymi typami komórek. Posiadają długie aksony, a także silnie rozgałęzione dendryty, które tworzą złożone sieci połączeń. W konsekwencji, neurony stanowią szczególne anatomiczne i morfologiczne wyzwanie dla procesów dystrybucji mitochondriów w komórce (Li i in., 2010). Mitochondria powstają bowiem w perykarionie i są następnie transportowane do aksonu, dendrytów i synaps (ruch anterogradowy), gdzie gwarantują niezbędne zasilanie energetyczne. Uszkodzone mitochondria są z kolei transportowane do obszarów okołojądrowych, gdzie odbywa się ich selektywna degradacja (ruch retrogradowy) (Drabik i in., 2016). Zachodzi więc ciągła wymiana mitochondriów między perykarionem a dystalnymi częściami komórki. Jest ona konieczna dla prawidłowego funkcjonowania neuronów (Schwarz, 2013), przy czym wyróżnia się dwie populacje mitochondriów: statyczne i będące w ruchu. Szacuje się, że ok. 30% wszystkich mitochondriów w komórce

przemieszcza się, podczas gdy pozostałe są zakotwiczone w miejscach o dużym zapotrzebowaniu energetycznym (Drabik i in., 2016). Zatem, niemożność przemieszczania mitochondriów lub dostarczenia ich do odpowiednich miejsc w komórce skutkuje upośledzeniem zasilania energetycznego i pogorszeniem działania synaps lub sieci neuronowych (Li i in., 2010).

W proces przemieszczania się mitochondriów w komórce nerwowej zaangażowane są 3 grupy białek: (1) białka budujące elementy cytoszkieletu, takie jak tubulina (mikrotubule) i aktyna (mikrofilamenty), (2) białka motoryczne, takie jak kinezy i dynaktyny, i (3) białka adaptorowe i rusztowaniowe, które wiążą „ładunek” z „motorem” i cytoszkieletem (Li i in., 2010). Mikrotubule prawdopodobnie odpowiadają za transport mitochondriów na duże odległości, podczas gdy mikrofilamenty pośredniczą w transporcie na krótkich odcinkach (Lin i in., 2010). Wiele danych wskazuje na zaburzenia w transporcie mitochondriów w przebiegu HD. Zaburzenia w transporcie aksonalnym obserwowano w modelu mysim i neuronalnych liniach komórkowych, jak również w przypadku modelu HD opartego na *Drosophila melanogaster* (Krench i Littleton, 2013).

2.4.3. Liczba mitochondriów

Biogeneza mitochondriów i ich selektywna degradacja w wyniku autofagii nazywanej mitofagią, która stanowi kluczowy element mechanizmu kontroli jakości mitochondriów (p.2.2.4), to dwa przeciwstawne procesy komórkowe regulujące liczbę mitochondriów, w odpowiedzi na stan energetyczny komórki, stres, a także inne sygnały środowiskowe i wewnątrzkomórkowe. Zatem, upośledzenie jednego z tych procesów prowadzi do zaburzenia równowagi w komórce i w konsekwencji stanowi istotny element patogenezy różnych chorób, w tym chorób neurodegeneracyjnych (Palikaras i in., 2015; Wasilewski i in., 2016).

Biogeneza mitochondriów jest złożonym, wieloetapowym procesem, który obejmuje skoordynowaną ekspresję genów zlokalizowanych w mitochondrialnym i jądrowym DNA, uruchomienie nowo syntetyzowanych białek i lipidów, i w końcu import, składanie i aktywację białek w powstającej sieci mitochondrialnej (Golpich i in., 2016; Bragoszewski i in., 2017). Proces biogenezy regulowany jest przez wiele czynników transkrypcyjnych, uruchamianych w odpowiedzi na bodźce wewnątrzkomórkowe, jak również środowiskowe, takie jak: dostępność składników odżywczych, czynników wzrostu i hormonów, obecność toksyn, wahania temperatury i poziomu tlenu. Głównym regulatorem tego procesu jest PGC-1 α ²⁸. Białko to kontroluje

²⁸ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*; pol. koaktywator receptora PPAR- γ

aktywność kilku czynników transkrypcyjnych, także zaangażowanych w biogenezę i regulację metabolizmu mitochondriów, takich jak: NRF1 i NRF2²⁹, mitochondrialne czynniki transkrypcyjne TFAM i TFB1M i receptory estrogenu (Dominy i Puigserver, 2013; Yun i Finkel, 2014; Golpich i in., 2016). Co istotne, w komórkach z ekspresją mHtt obserwuje się obniżenie ekspresji PGC-1 α (Cui i in., 2006; Khalil i in., 2015).

Jak wspomniano w podrozdziale 2.2.4, efektem ubocznym przekształceń energetycznych prowadzonych przez mitochondria, jest powstawanie potencjalnie niebezpiecznych RFT. Komórki eukariotyczne rozwinęły szeroki wachlarz mechanizmów kontrolnych w celu zachowania mitochondrialnej homeostazy, i w konsekwencji zapobiegania uszkodzeniom komórki i jej śmierci. Zadania te realizowane są przez system kontroli jakości mitochondriów (p.2.4). Jednym z elementów tego systemu jest mitofagia, selektywny rodzaj autofagii, wywoływany przez gromadzenie się uszkodzonych lub zbędnych mitochondriów (Lemasters, 2005; Hill i in., 2012; Golpich i in., 2016; Anzell i in., 2017; Wang i in., 2017). Komórki indukują mitofagię w celu regulacji rozmiaru i jakości sieci mitochondrialnej w odpowiedzi na zapotrzebowanie energetyczne i stres oksydacyjny (Youle i Narendra, 2011; Kubli i Gustafsson, 2012; Hwang i in., 2015; Bordi i in., 2017). Mitochondria przeznaczone do degradacji są kierowane do autofagosomów, a następnie przenoszone do lizosomów, gdzie ulegają rozkładowi. Nie ulega wątpliwości, że mitofagia jest procesem zależnym od stanu funkcjonalnego mitochondriów, a także ich morfologii, a procesy fuzji i fragmentacji biorą czynny udział w jej promocji (Frank i in., 2012).

Dotychczas wyróżniono kilka cząsteczek biorących udział w regulacji równowagi między biogenezą mitochondriów i ich eliminacją. Są to sirtuiny (deacetylazyhistonowe, regulujące metabolizm komórkowy i długość życia), kinaza AMPK³⁰, PGC-1 α , p53 (czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego), Parkin (element systemu ubikwityna-proteosom), kinaza PINK1³¹, MFN1 i białka z rodziny Bcl-2 (Egan i in., 2011; Shin i in., 2011; Sahin i in., 2012; Palikaras i in., 2015; Wang i in., 2017). Część z nich jest także zaangażowanych w sposób pośredni lub bezpośredni w patogenezie HD. Co więcej, dane eksperymentalne sugerują że w przebiegu HD, dochodzi do zaburzenia regulacji mitofagii, a nadekspresja kinazy PINK1, zapobiega toksycznym efektom wywoływanym przez mHtt, w sposób zależny od Parkin i białek OMM, takich jak MFN i VDAC (Khalil i in., 2015). W przebiegu HD zanotowano również upośledzony transport autofagosomów, prowadzący do nieefektywnej degradacji mitochondriów (Soubannier

²⁹ang. *nuclear respiratory factor 1 and 2*; pol. jądrowy czynnik oddechowy 1 i 2

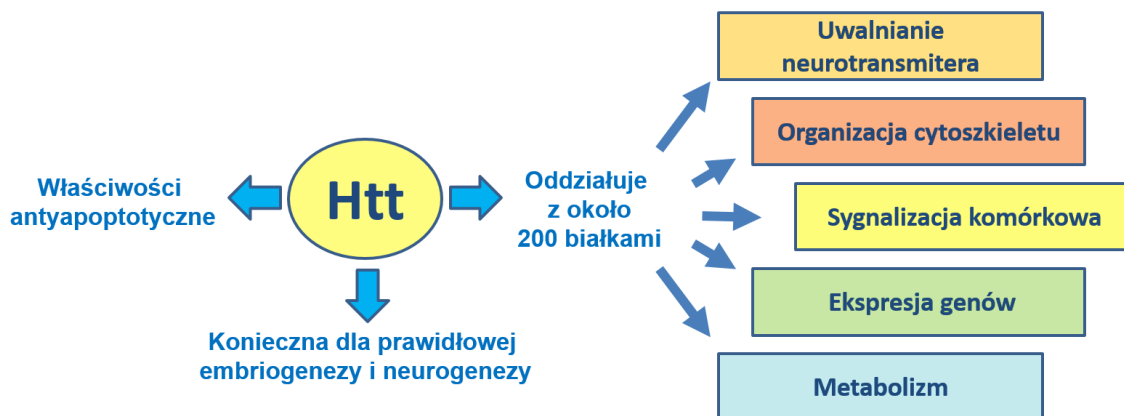
³⁰ang. *AMP-activated protein kinase*; pol. kinaza aktywowana przez AMP

³¹ang. *PTEN-induced kinase 1*; pol. kinaza indukowana przez PTEN

i in., 2012; Wong i Holzbaur, 2014) i częściowe przywrócenie sprawności tego procesu po nadekspresji kinazy PINK1 (Khalil i in., 2015).

2.5. Przyczyny dysfunkcji mitochondriów w rozwoju choroby Huntingтона

Htt jest białkiem charakterystycznym dla kręgowców (Truant i in. 2008), zlokalizowanym głównie w cytoplazmie, wykazującym aktywność antyapoptotyczną i zdolność oddziaływania z wieloma białkami o różnych funkcjach (Bocharova i in., 2009; Pandey i in., 2010; baza danych BioGrid). Jednakże funkcja Htt w komórce nie została do tej pory precyzyjnie wyjaśniona. Dostępne dane pozwalają wnioskować o jej udziale w szeregu procesów komórkowych (Rys. 6), w tym w podziałach komórkowych, podczas których uczestniczy w tworzeniu wrzeciona podziałowego we właściwej orientacji (Godin i in., 2010). Wykazano także istotne znaczenie tego białka w procesie embriogenezy i rozwoju centralnego układu nerwowego (Sardo i in., 2012; Wiatr i in., 2017).



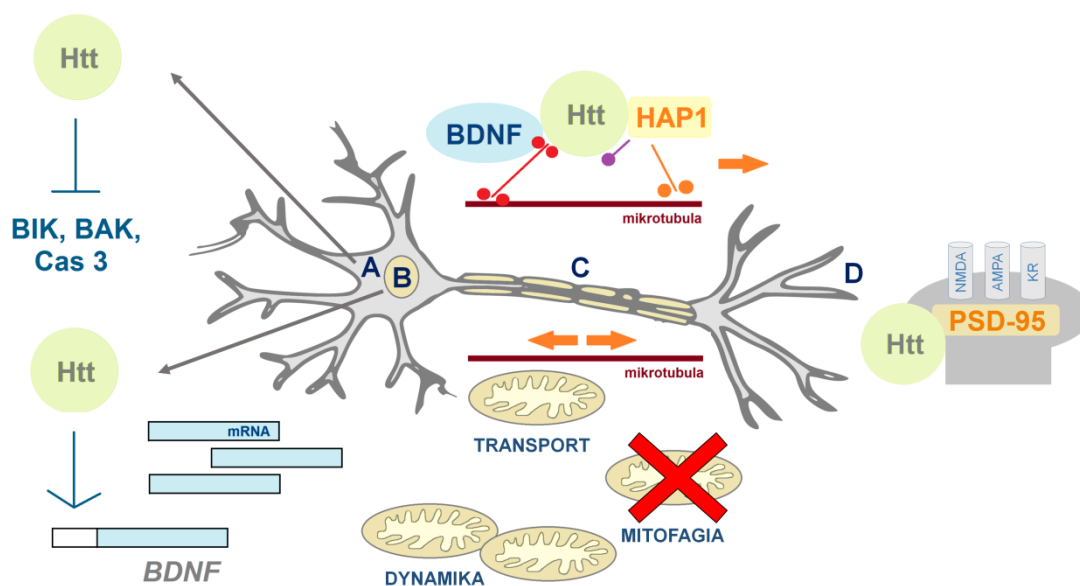
Rysunek 6. Proponowane funkcje Htt.

W komórkach nerwowych Htt pełni szereg funkcji (Rys.7). Uznaje się, że skutkiem jej działania jest hamowanie aktywności białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2 oraz kaspazy 3, zwiększenie ekspresji neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF³²), regulacja transportu retrogradowego i anterogradowego oraz dynamiki mitochondriów. Ponadto Htt bierze udział w aktywacji receptorów w błonie postsynaptycznej, ponieważ reguluje aktywność białka PSD-95³³ (Jodeir i Farshbaf i Ghaedi, 2017). Htt reguluje także transport aksonalny, który jest realizowany wzdłuż mikrotubul przy obecności HAP1³⁴ i białek motorycznych takich jak: dynaktyna, dyneina i kinezyna (Hoffner i in., 2002; Jodeiri Farshbaf i Ghaedi, 2017).

³² ang. *brain-derived neurotrophic factor*; białko wydzielane przez neurony, należące do rodziny czynników wzrostu nerwów

³³ang. *postsynaptic density protein 95*; kinaza biorąca udział w aktywacji receptorów w błonie postsynaptycznej

³⁴ ang. *huntingtin-associated protein 1*; białko wiążące Htt do białek motorycznych



Rysunek 7: Proponowane funkcje Htt w komórkach nerwowych. A - perykarion; B - jądro komórkowe; C - akson; D - zakończenie aksonu. Htt - natywna wersja huntingtyny; Bik, Bak - białka z rodziny Bcl-2; Cas 3 - kaspaza 3; NMDA - receptory NMDA; AMPA - receptor AMPA; KR – receptor kaininowy. Rysunek przygotowany na podstawie Jodeiri Farshbaf i Ghaedi, 2017.

Ekspresja genu *HTT* jest konstytutywna i nie jest specyficzna dla obszaru prążkowiec ani nawet całego mózgu (Morton i Howland, 2013), jednakże prążkowiec jest niezwykle podatny na upośledzenie metabolizmu mitochondrialnego, obserwowane w przebiegu HD. Wykazano bowiem, iż „wady genetyczne” mitochondriów mogą prowadzić do degeneracji prążkowiec i objawiać się choreoatetozą jak i dystonią. Na przykład mutacje punktowe w genach kodujących kilka podjednostek kompleksu I mitochondrialnego łańcucha oddechowego mogą prowadzić do degeneracji skoprupy (część prążkowiec) i dystonii w połączeniu z objawami takimi jak epilepsja, wylew i atrofia nerwu wzrokowego. Mutacje w białkach mitochondrialnych kodowanych przez geny jądrowe mogą z kolei prowadzić do neurologicznych nieprawidłowości charakterystycznych dla zespołu Leigha. Co więcej zbadane przypadki zatrucia toksynami takimi jak cyjanek (inhibitor kompleksu IV mitochondrialnego łańcucha oddechowego), metanol i 3-NP wykazały, że prążkowiec jest niezwykle wrażliwy na zablokowanie fosforylacji oksydacyjnej (Liot i in., 2017).

W rozwoju HD dochodzi do ekspresji obu alleli, bez mutacji i z mutacją (Kegel i in., 2002). Uważa się zatem, że przyczyną pojawienia się objawów chorobowych może być zarówno pojawienie się nowej funkcji mHtt, utrata funkcji przez mHtt, jak i utrata funkcji przez Htt w wyniku oddziaływania z mHtt (Hersch i Rosas, 2008; Bossy-Wetzel i in., 2008; Mochel i Haller, 2011; Marelli i Maschat, 2016). Mimo iż, utrata funkcji przez mHtt może być istotnym elementem patogenezы HD, wiele danych eksperymentalnych, jak i dominujący charakter mutacji w genie *HTT* sugerują, że

toksyczne właściwości mHtt wynikają z pojawienia się nowej funkcji tej wersji białka (Bates, 2003; Wang i in., 2008; Zuccato i in., 2010; Finkbeiner, 2011; Marelli i Maschat, 2016; Koyuncu i in., 2017).

2.5.1. Oddziaływanie huntingtyny i jej zmutowanej wersji na procesy komórkowe istotne dla funkcjonowania mitochondriów

Uzyskane dotychczas dane pozwalają na wskazanie następujących mechanizmów toksycznego działania mHtt na komórki nerwowe: (1) zmiany w modulacji transkrypcji genów jądrowych, w tym kodujących białka mitochondrialne i czynniki wzrostu, np. *BDNF*, (2) upośledzenie funkcjonowania mitochondriów, w tym ich dynamiki, transportu wzdłuż aksonu i mitofagii, (3) stres oksydacyjny, (4) ekscytotoksyczność, (5) tworzenie agregatów i ciał inkluzyjnych, i (6) zaburzenia w proteolizie i funkcjonowaniu proteasomu, (7) zaburzenia funkcjonowania cytoszkieletu i transportu aksonalnego (Karachitos i in., 2010; Marelli i Maschat, 2016; Jodeiri Farshbaf i Ghaedi, 2017).

Dostępne dane wskazują, że mHtt wykazuje zdolność wychwytywania mniejszych białek i zmiany ich docelowej lokalizacji, uniemożliwiając realizację ich funkcji w obrębie neuronu. Wykazano na przykład, że mHtt może wiązać i unieczynniać białko CBP³⁵, niewielkie białko regulatorowe pełniące funkcję koaktywatora transkrypcyjnego, które reguluje ekspresję m.in. białek łańcucha oddechowego, takich jak oksydaza cytochromowa, czy cytochrom c (Karachitos i in., 2010). Obecność mHtt obniża także poziom ekspresji PGC-1 α , pozostającego pod kontrolą białka CREB³⁶ (Johri i in., 2013; Golpich i in., 2016). Jak wspomniano wcześniej (p.2.4.3), PGC-1 α , wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za regulację ekspresji genów jądrowych, kodujących białka mitochondrialne i reguluje między innymi procesy biogenezy mitochondriów, fosforylacji oksydacyjnej, termogenezy, ochrony przed RFT oraz metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych (Cui i in., 2006; Karachitos i in., 2010; Johri i in., 2013; Dominy i Puigserver, 2013; Yun i Finkel, 2014; Villena, 2015; Golpich i in., 2016)

Htt przypuszczalnie reguluje procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów (p.2.4.2) poprzez wiązanie się z białkami zaangażowanymi w te procesy, natomiast mHtt może powodować nieprawidłowe działanie tych białek (Haun i in., 2013). Podejrzewa się również, że mHtt selektywnie wiąże i unieczynnia białka motoryczne lub zakłóca

³⁵ang. *CREB - binding protein*; pol. białko wiążące białko CREB

³⁶ang. *cAMP response element-binding protein*; pol. białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP

oddziaływania białek motorycznych z mikrotubulami, i poprzez oddziaływanie z białkiem HAP1 zaburza proces przemieszczania mitochondriów w obrębie komórki (Trushina i in., 2004; del Toro i in., 2006; Gauthier i in., 2004; Gao i in., 2017). Obserwowano także, że mHtt może wychwytywać białka zaangażowane w tworzenie autofagosomów i zaburzać proces rozpoznawania mitochondriów przeznaczonych do mitofagii (Shibata i in., 2006; Martinez-Vicente i in., 2010; Khalil i in., 2015) (p.2.4.3). Wyniki badań prowadzonych na modelach pozbawionych ekspresji Htt także wskazują na zaburzenia w procesie mitofagii i powstawanie tzw. „pustych autofagosomów”, sugerując, że Htt jest konieczna do rozpoznania uszkodzonych mitochondriów przez białka wchodzące w skład autofagosomu (Rui i in., 2015).

Wiele danych wskazuje na udział RFT i upośledzenia usuwających je systemów w rozwoju HD. Mózg jest organem bardzo wrażliwym na stres oksydacyjny, pojawiający się w komórkach z powodu wyższej zawartości tłuszczu i wysokiego zapotrzebowania energetycznego. Mimo, iż podwyższony poziom produkcji RFT nie bywa często odnotowywany we wczesnych etapach HD, wydaje się on stanowić jeden z głównych patomechanizmów na późniejszym etapie rozwoju tej choroby (Johri i Beal, 2012). Uszkodzenia funkcjonowania łańcucha oddechowego i dysfunkcja mitochondriów to główne mechanizmy zaangażowane w zależny od RFT rozwój HD (Lee i in., 2012b; Manoharan i in., 2016). W przebiegu HD obserwuje się ponadto zwiększenie poziomu markerów stresu oksydacyjnego, któremu towarzyszy spadek poziomu przeciwutleniaczy, jak i upośledzenie działania białek uczestniczących w eliminacji RFT. Na przykład, u pacjentów z HD odnotowano wzrost peroksydacji lipidów, w połączeniu z obniżoną ilością glutationu (Túnez i in., 2011), a także nieprawidłowy metabolizm tryptofanu (Stoy i in., 2005; Manoharan i in., 2016). Obniżenie ekspresji PGC-1 α , obserwowane w obecności mHtt (patrz wyżej), wpływa na ekspresję genów kodujących białka obniżające produkcję RFT lub RFT eliminujące. Do grupy pierwszej należą białka rozprzegające (UCP³⁷) (Jarmuszkiewicz i Woyda-Płoszczyca, 2008; Weydt i in., 2009; Johri i in., 2013; McCourt i in., 2016; Su i in., 2017). Z kolei w eliminacji RFT uczestniczą katalaza i peroksydaza glutationowa (GPX1) (Johri i in., 2013), a także dysmutazy ponadtlenkowe CuZnSOD i MnSOD (Gałgańska i in. 2010b).

Jak wspomniano wcześniej, (p.2.5.1) mHtt przyczynia się pośrednio do wzrostu poziomu RFT, co z kolei istotnie zwiększa poziom uszkodzeń powstających w DNA. Jednym z mechanizmów odpowiedzi komórki na tego typu uszkodzenia DNA jest uruchomienie białka supresorowego p53. Białko to jest istotne w procesie naprawy DNA i syntezy DNA, a także reguluje wiele szlaków sygnalizacyjnych zaangażowanych

³⁷ ang. *uncoupling protein*

w kontrolę stabilności genomu, metabolizmu energetycznego komórek, procesów antyoksydacyjnych, a także bierze udział w odpowiedzi na inne źródła stresu komórkowego (Vousden i Prives, 2009; Park i in., 2016). Pośmiertna analiza mózgów pacjentów z HD wykazuje zwiększony poziom białka p53 w neuronach (Grisson i in., 2011). Obserwowana w przebiegu HD akumulacja białka p53 w jądrze komórkowym prowadzi do zwiększonej syntezy proapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2, takich jak Puma i Bax, co sprzyja uruchomieniu wewnątrzpochodnego szlaku apoptozy (Karachitos i in., 2010; Mochel i Haller, 2011).

Glutaminian jest neuroprzekaźnikiem występującym w układzie nerwowym kręgowców, rozpoznawanym przez receptory jonotropowe i metabotropowe, znajdujące się w błonie komórkowej neuronów (Marambaud i in., 2009; Wang i in., 2015). Aktywacja receptorów jonotropowych, czyli receptorów NMDA, AMPA i kainianowych (Rys.7), prowadzi do otwarcia kanałów w błonie komórkowej i napływu Ca^{2+} do komórki. Receptory metabotropowe nie tworzą kanałów przepuszczających jony Ca^{2+} , jednak mogą uczestniczyć w regulacji ich stężenia w procesach zależnych od trimerycznych białek G (Marambaud i in., 2009). Z kolei jony Ca^{2+} biorą udział w wielu procesach, począwszy od regulacji ekspresji genów, kończąc na oddziaływaniach komórka-komórka i komórka – substancja zewnątrzkomórkowa. Jak wspomniano wcześniej (p.2.4.1), w mózgu stężenie Ca^{2+} ma fundamentalne znaczenie w regulacji aktywności synaptycznej i stabilizacji połączeń synaptycznych (Santello i Volterra, 2009; Marambaud i in., 2009; Kaplan i Stockwell, 2012). Nadmierna aktywacja receptorów glutaminergicznych może prowadzić do zwiększenia stężenia Ca^{2+} w cytozolu, a w konsekwencji do zaburzenia czynności neuronów i ich śmierci w wyniku procesu nazywanego ekscytotoksycznością (Karachitos i in., 2010; Qiu i in., 2013; Wang i in., 2015; Dawson i Dawson, 2017). Co więcej, glutaminian pośredniczy w sposób zależny od Ca^{2+} w degradacji MFN2, regulatora fuzji mitochondriów (p.2.4.2), co w konsekwencji przyczynia się do fragmentacji mitochondriów i może prowadzić do śmierci komórek nerwowych (Wang i in., 2015). W przebiegu HD obserwuje się zwiększenie aktywacji receptorów dla glutaminianu i występowanie nieprawidłowości w aktywacji synaptycznej, plastyczności neuronów oraz aktywacji enzymów zależnych od Ca^{2+} , biorących udział w katabolizmie białek, fosfolipidów i kwasów nukleinowych, a także syntezie NO (Marambaud i in., 2009; Kaplan i Stockwell, 2012; Dawson i Dawson, 2017). Co więcej, wykazano że mHtt promuje ekscytotoksyczność, podczas gdy Htt przeciwdziała temu zjawisku (Kaplan i Stockwell, 2012). Ponadto stwierdzono, że obecność mHtt prowadzi do uwrażliwienia receptorów NMDA, i co się z tym wiąże, sprzyja śmierci komórki indukowanej przez glutaminian (Marambaud i in., 2009; Kaplan i Stockwell, 2012; Raymond, 2014).

Funkcjonujący w komórkach system ubikwityna-proteasom (UPS³⁸) odpowiedzialny jest za znakowanie, a następnie degradację uszkodzonych, zdenaturowanych i dysfunkcyjnych białek, a także białek obcych dla danej komórki, np. białek wirusowych (p.2.3.1.4). Umożliwia to między innymi kontrolę proteomu mitochondrialnego i ochronę komórki przed niewydolnością mitochondrialną (Bragoszewski i in., 2017). Proces ubikwitynacji przebiega wieloetapowo i polega na przyłączeniu do białka przeznaczonego do degradacji, małego białka ubikwityny. Po jej przyłączeniu białko kierowane jest do proteasomu, gdzie podlega enzymatycznej degradacji, która przebiega z wykorzystaniem ATP (Bragoszewski i in., 2017; Collins i in., 2017). Powstające w komórce agregaty mHtt różnią się między sobą pod względem występujących w nich białek, rozpuszczalności, lokalizacji i toksyczności (Wiatr i in. 2017). Upośledzają one działanie proteasomu, uniemożliwiając mu tym samym degradację mHtt, jak i innych białek (Venkatramani in., 2004; Barnard i in., 2011). Jednak część prac eksperymentalnych interpretuje agregację jako mechanizm chroniący przed toksycznym działaniem mHtt (Mitra i in., 2009; Krench i Littleton, 2013). Uznaje się, że decydujące znaczenie ma tu stadium choroby, lokalizacja komórkowa agregatów, ich skład i oddziaływania z innymi białkami lub organellami (Zhao i in., 2016). Agregacja mHtt może być także skutkiem zmniejszenia dostępności ATP w wyniku upośledzenia transportu aksonalnego mitochondriów w obecności mHtt, bowiem działanie UPS jest wysoce zależne od dostępności ATP (Zhao i in., 2016). Założenie to wspierają badania nad innymi chorobami neurodegeneracyjnymi, w przebiegu których dochodzi do powstawania agregatów zmutowanych wersji białek. Wyniki tych badań sugerują, że agregacja białek jest efektem nieprawidłowego działania UPS, a nie pierwotną przyczyną toksyczności, przy czym pojawienie się agregatów może dodatkowo upośledzać działanie UPS, działając na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego (Bence i in., 2001; Deger i in., 2015). Tłumaczyłoby to zaostrzający się efekt neurotoksyczności i dynamikę postępu choroby.

³⁸ ang. *ubiquitin-proteosome system*

2.5.2. Bezpośrednie oddziaływanie huntingtyny i jej zmutowanej wersji z mitochondriami

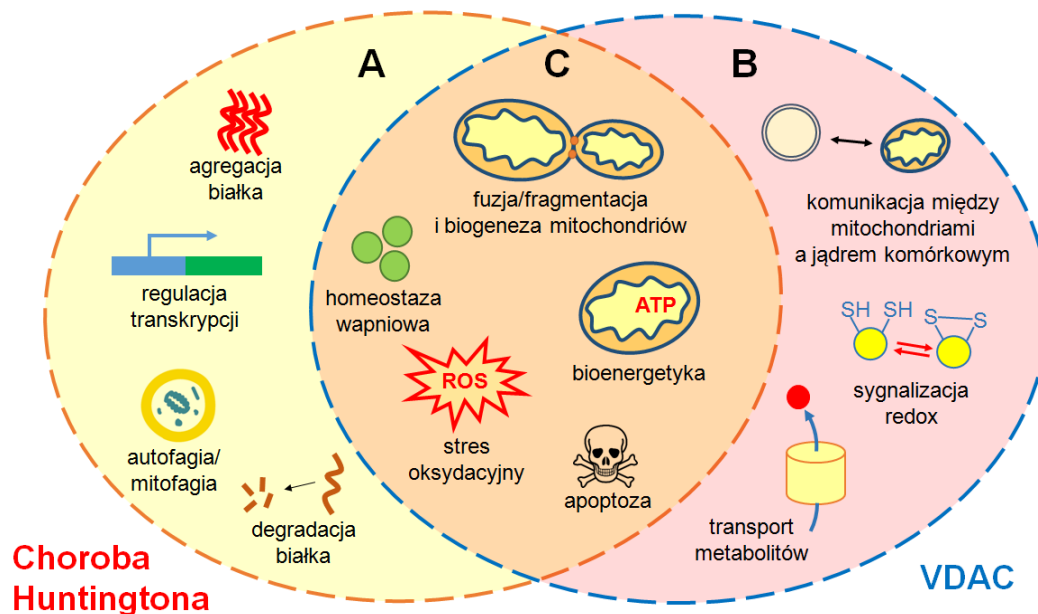
Jak wspomniano powyżej (p.2.5), analiza bazy danych BioGrid^{3,4}, wskazuje na ponad 200 białek oddziałujących z Htt. Wśród nich znajduje się wiele białek o lokalizacji mitochondrialnej³⁹. Istnieją także dane eksperymentalne wskazujące na możliwość oddziaływania Htt z mitochondriami (Choo i in., 2004; Hamilton i in., 2015). W przypadku mHtt uznaje się, że jej bezpośrednie oddziaływanie z mitochondriami jest istotnym elementem patogenezy HD (Golpich i in., 2016). Postuluje się, że oddziaływanie to związane jest głównie z OMM (Bossy-Wetzel, 2008; Orr i in., 2008; Oliveira, 2010), przy czym najczęściej wskazywane są białka Drp1 i MFN2, uczestniczące w fuzji i fragmentacji mitochondriów (Wang i in., 2009; Song i in., 2011; Gao i in., 2017) (p.2.4.2). Co ciekawe, istnieją również doniesienia, że mHtt może zostać uwięziona wewnątrz mitochondriów ulegających degeneracji (Yu i in., 2003; Oliveira, 2010) lub też może oddziaływać z białkami IMM, takimi jak TNA i inne białka z rodziny nośników mitochondrialnych, kompleks II łańcucha oddechowego (Oliveira, 2010; Song i in., 2011) i kompleks TIM23 (Jonas, 2014).

2.5.3. Kanał VDAC jako cel działania huntingtyny i jej zmutowanej wersji

Z przedstawionych powyżej informacji wynika, że kanał VDAC ma fundamentalne znaczenie dla funkcjonowania mitochondriów (p.2.2), a organelle te odgrywają kluczową rolę w przeżywalności komórek (p.2.3) i patogenezie HD (p.2.4). Istniejące współzależności między procesami pozostającymi pod kontrolą kanału VDAC i ulegającymi upośledzeniu w przebiegu HD przedstawiono na Rys.8. Należy także zaznaczyć, że istnieją dane wskazujące na możliwość bezpośredniego oddziaływania Htt i/lub mHtt z wszystkimi izoformami ludzkich białek VDAC (tj. hVDAC1-3) (Kaltenbach i in., 2007). Jednakże, stosując słowa kluczowe „VDAC AND Huntington disease”, w bazie danych PubMed można znaleźć tylko jedną pracę przeglądową, w której wspomina się o możliwej roli białka VDAC w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym HD (Gellerich i in., 2010) i jedną pracę eksperymentalną, w której wskazuje się między innymi na obniżony poziom białka VDAC w modelu mysim HD (Lou i in., 2016). Co ciekawe, uzyskane przez nas wyniki wskazują na związek obecności Htt lub mHtt w komórkach z aktywnością kanałową białka VDAC, rejestrowaną po rekonstytucji w systemie BLM (Karachitos i in., 2016a).

³⁹ <https://thebiogrid.org/200268/summary/mus-musculus/htt.html>

Istnieje zatem konieczność dalszego badania możliwej roli kanału VDAC w patogenezie HD.



Rysunek 8. Rola kanału VDAC w procesach zaangażowanych w patogenezę HD.

2.6. Modele w badaniach choroby Huntingtona

Poznanie podłoża genetycznego HD umożliwia zastosowanie technik biologii molekularnej do tworzenia modeli zwierzęcych i komórkowych tej choroby. Uzyskanie mHtt możliwe jest dzięki zastosowaniu transgenezy, jak i modyfikacji endogennego genu. Obecnie możliwe jest wprowadzenie genu *HTT* ze zwielokrotnioną liczbą kodonów glutaminy do wielu wyższych organizmów. Jednak długi czas rozwoju choroby, jak i wysokie koszty prowadzenia takich badań zachęcają do szukania alternatywnych modeli (Morton i Howland, 2013). Stwierdzono także, że różne gatunki mogą wykazywać różne reakcje na ekspresję mHtt, jak to na przykład zaobserwowano dla myszy i miniaturowych świnek (Menalled i Brunner, 2014). Co więcej, ponieważ HD jest chorobą charakterystyczną dla ludzi, w świecie zwierząt nie znajdziemy modelu idealnego, pozwalającego jednoznacznie wyjaśnić patogenezę tej choroby. Jednak modele HD umożliwiają badanie różnych jej aspektów, przy czym manifestacja objawów zależy od ograniczeń danego gatunku, użytego konstruktu genetycznego (w tym zastosowanego promotora, rozmiaru ekspymowanego białka, ilości powtórzeń CAG i elementów dodatkowych), a także czasu ujawnienia choroby (Morton i Howland, 2013; Howland i Munoz-Sanjuan, 2014; Chang i in., 2015). Zatem, wybór modelu w badaniach HD, podobnie jak w przypadku innych chorób genetycznych, jest związany z poszukiwaniem odpowiedzi na konkretne pytania badawcze (Menalled i Brunner, 2014).

Jak wspomniano wcześniej (p.2.1), przyczyną powstania mHtt jest zwiększenie liczby kodonów dla glutaminy w egzonie 1 genu *HTT*. Jest ona następnie cięta na mniejsze fragmenty, które mogą wiązać się ze sobą i podlegać agregacji w neuronach, zakłócając ich normalne funkcjonowanie (Barnard i in., 2011). W modelach HD stosuje się ekspresję całego białka mHtt, jak i ekspresję egzonu 1 zmutowanej wersji genu *HTT*, kodującego koniec aminowy mHtt, zawierający wydłużony ciąg reszt glutaminy. Wystarcza on bowiem do zaobserwowania zmian charakterystycznych dla HD, takich jak powstawanie agregatów i cytotoksyczność, prowadząca do śmierci komórek (Paulson i in., 1997; Cooper i in., 1998; Igarashi i in., 1998; Wyttenbach i in., 2001; Mochly-Rosen i in., 2014; Hwang i in., 2015).

W tworzeniu modeli zwierzęcych HD najczęściej wykorzystuje się gryzonie, tj. myszy i szczury. Istnieją także modele oparte na dużych zwierzętach, takich jak naczelnie, owce, świnie oraz na bezkręgowcach, w tym muszce owocowej (*D. melanogaster*) i *Caenorhabditis elegans*. W tabeli 1 zebrano i krótko opisano dostępne zwierzęce modele HD. Biorąc pod uwagę zastosowane rozwiązanie dotyczące ekspresji mHtt i/lub Htt, modele te można podzielić na trzy rodzaje: (1) transgeniczne,

gdy gen kodujący Htt/mHtt zostaje wprowadzony w losowym miejscu w linię zarodkową; (2) tzw. knockin (KI), w przypadku których gen kodujący mHtt zostaje wprowadzany do konkretnego locus i (3) tzw. knockout (KO), pozbawione funkcjonalnego genu *HTT* (Menalled, 2014). Model KO posiada pewne ograniczenia, gdyż ekspresja Htt jest konieczna dla prawidłowej embriogenezy, a zarodki myszy w takim modelu nie przeżywają dłużej niż 7-8 dni. Możliwe jest jednak wyciszenie genu kodującego Htt u osobników dorosłych, które skutkuje pojawieniem się objawów neurodegeneracji (Landles i Bates, 2004).

Modele zwierzęce				
	Organizm	Nazwa modelu	Wersja Htt i mHtt	Źródła literaturowe
Modele transgeniczne	Mysz	N171-18Q N171-44Q N171-82Q	koniec aminowobiałka; liczba reszt glutaminy: 18, 44 lub 82	Schilling i in., 1999
		BACHD	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 97	Gray i in., 2008
		YAC18 YAC46 YAC72 YAC128	pełna wersja białka; liczba reszt glutaminy: 18, 46, 72 lub 128	Slow i in., 2003
		R1/6 R2/6	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 116 (R2/6) lub 144 (R1/6)	Mangiarini i in., 1996
	Szczur	LV-N171-Q19, LV-N171-Q44, LV-N171-Q66, LV-N171-Q82, LV-N853-Q19, LV-N853-Q44, LV-N853-Q66, LV-N853-Q82, LV-N1520-Q19, LV-N1520-Q44, LV-N1520-Q66, LV-N1520-Q82	koniec aminowy białka; liczba reszt glutaminy: 19, 44, 66 lub 82	de Almeida i in., 2002
		tgHD	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 51	von Horsten i in., 2003
		BACHD	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 97	Yu-Taeger i in., 2012

	Makak	LV-Htt171-19Q LV-Htt171-82Q	koniec aminowy białka; liczba reszt glutaminy: 19 lub 82	Palfi i in., 2007
		LV-Exon1 Htt	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 84	Yang i in., 2008
	Owca	OVT73	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 73	Jacobsen i in., 2010
	Świnia	N208HTT	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 105	Yang i in., 2010
	Danio pręgowany	Q4 Q25 Q102	koniec aminowy białka; liczba reszt glutaminy: 4, 25 lub 102	Schiffer i in., 2007
	Muszka owocowa	pGMRQ2 pGMRQ75 pGMRQ120	koniec aminowy białka; liczba reszt glutaminy: 2, 75 lub 120	Jackson i in., 1998
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Htn-Q150	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 150	Faber i in., 1999
Modele KI	Mysz	Hdh(CAG)80 Hdh(CAG)150	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 80 lub 150	Lin i in., 2001
		HdhQ50 HdhQ92 HdhQ111	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 48,90 lub 109	Wheeler i in., 1999, 2000
		HdhQ71 Hdh94	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 71 lub 94	Menalled i in., 2002
		Hdh140	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 140	Menalled i in., 2003
		Hdh6/72	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 72-80	Shelbourne i in., 1999

Modele KO	Mysz	Hdh(-/-)	brak białka	Duyao i in., 1995; Zeitlin i in., 1995; Dragatsis i in., 1998
------------------	-------------	----------	-------------	---

Tabela 1: Zwierzęce modele HD (lista niepełna)

Z kolei w tabeli 2 przedstawiono krótko dostępne komórkowe modele HD, wśród których można wyróżnić dwie grupy: (1) modele oparte na liniach komórkowych, wykorzystujące komórki somatyczne oraz zarodkowe, w tym ESC, jak i indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC⁴⁰) i (2) modele oparte na organizmach jednokomórkowych.

Modele komórkowe			
	Komórki	Wersja Htt i mHtt	Źródła literaturowe
Komórki somatyczne	HeLa (komórki raka szyjki macicy) A459 (ludzkie komórki gruczolakoraka gruczołu nabłonkowego) Sh-SY5Y (ludzkie komórki nerwiaka)	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 128	Huang i in., 2007
	Cos-7 (małpie komórki fibroblastopodobne z nerki) SH-SY5Y (ludzkie komórki nerwiaka) neuro-2A (mysie komórkinerwiaka)	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 49, 72 lub 151	Liu i in., 2003
	PC-12 (szczurze komórki barwiaka izolowane z kory nadnerczy)	koniec aminowy białka; liczba reszt glutaminy: 23,74,103 lub 150	Li i Li, 2003; Yohrling i in., 2003; Wyttenbach i in., 2001
	HN33 (komórki hipokampu szczura)	pełna wersja białka; liczba reszt glutaminy: 16,48 lub 89	Liu, 1998

⁴⁰ ang. *induced pluripotent stem cells*; pol. indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste

Komórki zarodkowe	mysie ESC	Hdh CAG150, HdhQ20/7, HdhQ50/7, HdhQ91/7, HdhQ140/7, HttF140Q/7Q	pełna wersja białka; liczba reszt glutaminy: 20, 50, 91, 140, 150,	Lorincz i Zawistowski 2009; Jacobsen i in., 2011
		HD ESC	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 127	Wiatr i in., 2017
	małpie ESC	TrES1	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 72	Laowtammathron i in., 2009;
		rHD-ES—7x	koniec aminowy białka; liczba reszt glutaminy: 28-48	Putkhao i in., 2013; Wiatr i in., 2017
	ludzkie ESC	hESC-184, hESC-196, VUB05_HD, SI-186, SI-187, STR-155-HD, SIVF017-HD, SIVF018-HD, SIVF020-HD, SIVF046-HD, Q23, GENE089, GENE090, GENE091, KCL027, KCL028, KCL036	pełna wersja białka; liczba reszt glutaminy: 23-51	Feyeux i in., 2012; Wiatr i in., 2017
		HEK 293	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 60, 82 lub 150	Harper i in., 2005; Li i Li, 2003; Machida i in., 2006
	mysie iPSC	HD-iPS	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 144	Wiatr i in., 2017
		YAC-HD-iPS	pełna wersja mHtt; liczba reszt glutaminy: 128	
	małpie iPSC	RiPS-3	koniec aminowy mHtt; liczba reszt glutaminy: 72	Chan i in., 2010; Carter i in., 2014; Wiatr i in., 2017
		HD-14	koniec aminowy białka; liczba reszt glutaminy: 27 lub 65	
	ludzkie iPSC	HD-iPS-4, Corrected-HD-iPS4 clones C127, HD-iPSHOM 4F/3FHD-iPSHOM 4F, HD-iPSHET 3F, F-HD-iPSC, D-HD-iPSC, HD60i, HD109i.1, HD180i, HD2—5x, HD70, HD180, HD60n, HD109n, HD180n	pełna wersja białka; liczba reszt glutaminy: 20-180	Park i in., 2008; Juopperi i in., 2012; HD iPSC Consortium, 2012; Ring i in., 2015; Wiatr i in., 2017
Organizmy jednokomórkowe	Model drożdżowy: Q25 Q103		koniec aminowy białka; liczba reszt glutaminy: 25 lub 103	Solans i in., 2006

Tabela 2: Komórkowe modele HD (lista niepełna)

Dostępne modele HD umożliwiają badanie wielu aspektów HD, przy czym badanie relacji między efektem Htt i/lub mHtt a innymi białkami nie zawsze jest możliwe. Co warto podkreślić, do tej pory nie skonstruowano modelu umożliwiającego badanie wpływu ekspresji Htt/mHtt na funkcjonowanie izoform ludzkiego białka VDAC. W niniejszej pracy przygotowano taki model oparty na komórkach *S.cerevisiae* z ekspresją ludzkich izoform białka VDAC.

3. Cel pracy

Nie ulega wątpliwości, że mitochondria odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu komórek nerwowych, a choroby neurodegeneracyjne, w tym HD, mogą mieć podłoże mitochondrialne. Do tej pory wykazano bowiem wiele nieprawidłowości związanych z funkcjonowaniem mitochondriów w przebiegu HD, przy czym prawdopodobnym wydaje się być, iż zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów są pierwotną przyczyną neurodegeneracji i poprzedzają w czasie inne zmiany (Pandey i in., 2010).

Wiele przesłanek pozwala przypuszczać, iż Htt i/lub mHtt może oddziaływać z zewnętrzną błoną mitochondrialną bezpośrednio lub poprzez zestaw białek mitochondrialnych. Kanał VDAC uznawany jest obecnie za kluczowy regulator funkcji mitochondrialnych. Wykazano m.in., że izoformy białka VDAC mogą być różnie modulowane przez białka komórkowe, a co za tym idzie, oddziaływania VDAC z białkami komórkowymi mogą prowadzić do zmian w funkcjonowaniu mitochondriów (Madamba i in., 2015). Co istotne, Dostępne dane, oparte na chromatografii powinowactwa i spektrometrii mas, sugerują możliwość oddziaływania Htt (jak i mHtt) z białkiem VDAC (Kaltenbach i in., 2007), jednak znaczenie obecności białka VDAC dla efektu działania Htt i mHtt w komórkach nie zostało do tej pory zbadane. W związku z tym, celem pracy było sprawdzenie czy Htt i mHtt, może wpływać na procesy przebiegające z udziałem białka VDAC, w tym jego izoform. W konsekwencji sformułowano następujące cele badawcze:

1. skonstruowanie drożdżowego modelu HD, reprezentującego różne warianty indukowanej ekspresji Htt i mHtt w warunkach obecności lub braku funkcjonalnego drożdżowego kanału VDAC (yVDAC) oraz izoform ludzkiego białka VDAC (hVDAC1-hVDAC3),
2. zbadanie funkcjonalności komórek drożdżowego modelu HD obejmujące potwierdzenie ekspresji białek VDAC oraz Htt i mHtt, charakterystykę ekspresji Htt i mHtt oraz wzrostu otrzymanych komórek transformantów,
3. zbadanie wpływu ekspresji Htt i mHtt na wzrost, przeżywalność i parametry bioenergetyczne komórek drożdżowego modelu HD, z uwzględnieniem aspektu stresu temperaturowego,
4. zbadanie przeżywalności komórek ssaczego modelu HD (komórki PC12) w warunkach braku i obecności ekspresji Htt/mHtt,
5. zbadanie relacji ilościowych między izoformami białka VDAC w komórkach PC12 i określenie wpływu ekspresji Htt i mHtt na te relacje,

6. wyznaczenie parametrów biofizycznych opisujących aktywność kanałową białek VDAC izolowanych z komórek PC12 w warunkach braku i obecności ekspresji Htt/mHtt.

4. Materiały

4.1. Materiał biologiczny

- konstrukty plazmidowe YIp351Q25 i YIpQ103, służące do transformacji komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w celu wprowadzenia sekwencji kodujących natywną i zawierającą mutację wersję białka huntingtyny
- konstrukty plazmidowe pYX212hVDAC1-3, służące do transformacji komórek drożdży *S.cerevisiae* w celu wprowadzenia sekwencji kodujących izoformy ludzkiego białka VDAC, odpowiednio: hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3;
- wektor plazmidowy pYX142, służący do transformacji komórek drożdży *S.cerevisiae* w celu wprowadzenia sekwencji genu *LEU2*;
- bakterie *Escherichia coli* szczepu DH5 α , wykorzystane do namnożenia wektora plazmidowego i konstruktów plazmidowych;
- komórki drożdży *S.cerevisiae* szczepu dzikiego M3 i wyprowadzonego z niego mutantu delecyjnego $\Delta por1T4$, pozbawionego funkcjonalnego genu *POR1* wykorzystane do konstrukcji modelu drożdżowego HD
- linie komórkowe PC12-HD-Q23 i PC12-HD-Q74.

Konstrukty YIp351Q25 i YIp351Q103 otrzymano od prof. A. Barientosa (Uniwersytet w Miami, USA). Konstrukty pYX212hVDAC1-3 otrzymano od prof. V. De Pinto (Uniwersytet w Katanii, Włochy). Wektor plazmidowy pYX142 zakupiono w firmie Novagen. Bakterie *E.coli* szczepu DH5 α były dostępne w Zakładzie Bioenergetyki UAM. Szczep drożdży M3 otrzymano dzięki uprzejmości prof. M. Forte (OHSU, Uniwersytet w Portland, USA). Mutant $\Delta por1T4$ został skonstruowany na bazie szczepu M3 przez dra A. Karachitosa (Zakład Bioenergetyki UAM). Linie komórkowe PC12 zostały pozyskane dzięki uprzejmości prof. Davida Rubinszteina oraz dra Andreasa Wytenbacha (Uniwersytet w Cambridge, Wielka Brytania).

4.1.1. Konstrukty plazmidowe

4.1.1.1. Ylp351Q25, Ylp351Q103

Konstrukty plazmidowe Ylp351Q25 i Ylp351Q103 zawierają inserty w postaci sekwencji egzonu 1 genu *HTT* z odpowiednio 25 i 103 powtórzeniami dla glutaminy wprowadzone do integracyjnego wektora plazmidowego Ylp351. W swojej budowie wektor plazmidowy Ylp351 zawiera marker selekcyjny *LEU2*. Gen ten koduje enzym odpowiedzialny za trzeci etap syntezy leucyny, a obecność tego enzymu umożliwia komórkom *S.cerevisiae* wzrost na pożywkach selekcyjnych pozbawionych leucyny.

Konstrukty te linearyzowano, po uprzednim ich namnożeniu w komórkach bakterii *E.coli* szczepu DH5 α , a następnie po oczyszczeniu, wykorzystywano do transformacji komórek drożdży *S.cerevisiae*.

4.1.1.2. pYX212hVDAC1, pYX212hVDAC2, pYX212hVDAC3

Konstrukty plazmidowe pYX212hVDAC1, pYX212hVDAC2 i pYX212hVDAC3 zawierają inserty w postaci genu kodującego poszczególne izoformy ludzkiego białka VDAC (hVDAC1, 2 lub 3) wprowadzone do episomalnego wektora plazmidowego pYX212. W swojej budowie wektor plazmidowy pYX212 zawiera marker selekcyjny *URA3*. Gen ten koduje enzym odpowiedzialny za szósty etap syntezy uracylu, a jego obecność umożliwia komórkom *S.cerevisiae* wzrost na pożywkach selekcyjnych pozbawionych uracylu.

Konstrukty te wykorzystano do transformacji komórek drożdży *S.cerevisiae*, po uprzednim ich namnożeniu w komórkach bakterii *E.coli* szczepu DH5 α .

4.1.1.3. pYX142

Wektor plazmidowy pYX142 (Novagen) zaliczany jest do wektorów centromerowych i zawiera w swojej budowie marker selekcyjny *LEU2*, podobnie jak wcześniej opisane konstrukty Ylp351.

Wektor ten najpierw namnożono w komórkach bakterii *E.coli* szczepu DH5 α , a następnie wykorzystano do transformacji komórek drożdży *S.cerevisiae*.

4.1.2. Bakterie *Escherichia coli* szczepu DH5α

Do powielania stosowanych konstruktów plazmidowych i wektora plazmidowego wykorzystano szczep DH5α o genotypie: fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.

Komórki szczepu DH5α zawierają wiele mutacji, m.in. insercję genu oporności na ampicylinę, pozwalającą na łatwe rozróżnienie komórek, które uległy transformacji na pożywkach z dodatkiem tego aminokwasu, a także mutacje powodujące zmniejszenie aktywności endonukleaz i enzymów restrykcyjnych, co w konsekwencji pozwala na namnożenie wprowadzonych wektorów plazmidowych i konstruktów plazmidowych z większą wydajnością.

4.1.3. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

W badaniach wykorzystano 19 szczepów drożdży *S.cerevisiae*, stanowiących łącznie drożdżowy model HD (p.6.2.3.1). Do konstrukcji modelu wykorzystano szczep drożdży M3 (*MATa can1 lys2 his4 trp1Δ ade2 leu2 ura3*) i wyprowadzony z niego szczep mutanta $\Delta por1T4$ (*MATa can1 lys2 his4 trp1Δ ade2 leu2 ura3 POR1::KanMX*). Jak pokazano w Tabeli 3, otrzymane w wyniku kolejnych transformacji szczepy drożdży reprezentują różne warianty indukowanej ekspresji natywnej i zawierającej mutację wersji huntingtyny (odpowiednio: Htt i mHtt) w warunkach obecności lub braku funkcjonalnego drożdżowego kanału VDAC (yVDAC1) oraz izoform ludzkiego białka VDAC (hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3), jak i markera auksotroficznego *LEU2*.

	yVDAC1	$\Delta por1$	hVDAC1	hVDAC2	hVDAC3
Kontrola	1	2	7	8	9
+Htt	3	5	10	11	12
+mHtt	4	6	13	14	15
+ <i>LEU2</i>	16	---	17	18	19

Tabela 3. Drożdżowy model HD. Numerami od 1 do 19 oznaczono kolejne szczepy konstruowane w ramach modelu HD.

4.1.4. Linie komórkowe PC12

Linie komórkowe PC12, składające się na szczurzy model HD zostały wyizolowane z guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy szczura (Wyttenbach i in., 2001). W wykorzystanych liniach PC12-HD-Q23 oraz PC12-HD-Q74, spod silnego promotora Tet-on zachodzi ekspresja egzonu 1 genu *HTT* kodującego białko huntingtynę, zawierającego odpowiednio 23 (Htt) lub 74 (mHtt) powtórzeń kodonu dla glutaminy. Białka Htt i mHtt są znakowane białkiem zielonej fluorescencji (GFP⁴¹), a ich ekspresja jest indukowana przez doksycyklinę.

⁴¹ ang. *green fluorescent protein*

4.2. Stosowane pożywki

4.2.1. Pożywka do otrzymania bakteryjnych komórek kompetentnych

Pożywka LB	Stężenie końcowe
Ekstrakt drożdżowy	0,5% (w/o)
Trypton	1% (w/o)
NaCl	1% (w/o)
Agar (w przypadku pożywek stałych)	1,5% (w/o)
pH	7,0

Składniki pożywki rozpuszczano w ddH₂O (podwójnie destylowanej). Pożywkę sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C.

4.2.2. Pożywki do transformacji komórek bakterii i selekcji otrzymanych transformantów

Pożywka SOC	Stężenie końcowe
Trypton	2% (w/o)
Ekstrakt drożdżowy	0,5% (w/o)
NaCl	0,05% (w/o)
KCl	2,5 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mM
Glukoza	20 mM
pH	7,0

Składniki pożywki rozpuszczano w ddH₂O. Pożywkę sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C. Roztwór glukozy podawano po sterylizacji. Do sterylizacji roztworu glukozy stosowano filtr bakteriologiczny Ø 0,22 µm.

Pożywka LB + ampicylina	Stężenie końcowe
Ekstrakt drożdżowy	0,5% (w/o)
NaCl	1% (w/o)
Trypton	1% (w/o)
Agar (w przypadku pożywek stałych)	1,5% (w/o)
Ampicylina	100 µg/ml

Składniki pożywki rozpuszczano w ddH₂O. Pożywkę sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C. Ampicylinę podawano po sterylizacji.

4.2.3. Pożywki do selekcji transformantów drożdżowych

Mieszanina do selekcji 100x	Stężenie końcowe (w/o)
Mieszanina aminokwasów:	
L – Arginina	1%
L – Isoleucyna	0,5%
L – Fenyloalanina	0,5%
L – Prolina	0,5%
L – Seryna	0,5%
L – Treonina	1%
L – Kwas Asparaginowy	0,5%
L – Lizyna	1%
L – Metionina	0,5%
L – Histydyna	0,5%
Składniki dodawane osobno:	
L – Walina	0,5%
L – Tryptofan	1%
L – Leucyna	1%
Uracyl	0,2%
Adenina	1%

Składniki Mieszaniny do selekcji 100x rozpuszczano w ddH₂O. Mieszaninę aminokwasów oraz roztwory waliny, leucyny, uracylu i adeniny sterylizowano w osobnych butelkach przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C. Do sterylizacji roztworu tryptofanu stosowano filtr bakteriologiczny Ø 0,22 µm. **Uracyl i leucyna stanowiły czynniki selekcyjne, które dodawano do odpowiednich pożywek w zależności od prowadzonych hodowli.**

Pożywka selekcyjna glukozowa (SM Glukoza)	Stężenie końcowe
Yeast Nitrogen Base	1,34% (w/o)
Glukoza	2% (w/o)
Agar (w przypadku pożywek stałych)	1,5% (w/o)
Mieszanina do selekcji 100x	2x

Składniki pożywki rozpuszczano w ddH₂O. Pożywkę sterylizowano przez 15 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C. Mieszaninę do selekcji 100 x podawano po sterylizacji.

Pożywka selekcyjna glicerolowa (SM Glicerol)	Stężenie końcowe
Yeast Nitrogen Base	1,34% (w/o)
Glicerol	3% (o/o)
Agar (w przypadku pożywek stałych)	1,5% (w/o)
Mieszanina do selekcji 100x	2x

Składniki pożywki rozpuszczano w ddH₂O. Pożywkę sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C. Mieszaninę do selekcji 100 x podawano po sterylizacji.

4.2.4. Pożywki do hodowli komórek drożdży

YPD	Stężenie końcowe
Ekstrakt drożdżowy	1% (w/o)
Bactopepton	2% (w/o)
Glukoza	2% (w/o)
Agar (w przypadku pożywek stałych)	1,5% (w/o)

Składniki pożywki rozpuszczano w ddH₂O. Pożywkę sterylizowano przez 15 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C.

YPG	Stężenie końcowe
Ekstrakt drożdżowy	1% (w/o)
Bactopepton	2% (w/o)
Glicerol	3% (o/o)
Agar (w przypadku pożywek stałych)	1,5% (w/o)
pH	5,5

Składniki pożywki rozpuszczano w ddH₂O. Do ustalenia pH wykorzystano 5 N HCl. Pożywkę sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C.

YPG+Gal	Stężenie końcowe
Ekstrakt drożdżowy	1% (w/o)
Bactopepton	2% (w/o)
Glicerol	3% (o/o)
Agar (w przypadku pożywek stałych)	1,5% (w/o)
Galaktoza 20%	3%

Składniki pożywki rozpuszczano w ddH₂O. Pożywkę sterylizowano przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atmosfery w 120°C. Roztwór galaktozy podawano po sterylizacji. Do sterylizacji roztworu galaktozy stosowano filtr bakteriologiczny Ø 0,22 µm.

4.2.5. Pożywki do hodowli komórek PC12

Pożywka kompletna	Stężenie końcowe
DMEM (4,5 g glukozy/l)	
Płodowa surowica bydlęca (FBS)	5% (o/o)
Końska surowica (HS)	10% (o/o)
L-glutamina	2 mM
Antybiotyk/Antybaktyk 100x	1x

Pożywka do tworzenia banków	Stężenie końcowe
DMEM (4,5 g glukozy/l)	70% (o/o)
Płodowa surowica bydlęca (FBS)	20% (o/o)
DMSO	10% (o/o)

4.2.6. Pozostałe płyny

- Płyn PBS (pH=7,4) przygotowywano z tabletek PBS, Bioshop (nr kat. PBS404.100) wg. zaleceń producenta tj. rozpuszczano 1 tabletkę PBS w 100 ml ddH₂O.
- Mleko do wykonania immunodetekcji przygotowywano przez rozpuszczenie odpowiedniej ilości mleka odtłuszczonego firmy Mlekovita w płynach PBS-T lub TBS-T.

4.3. Stosowane płyny

4.3.1. Płyny do przygotowania bakteryjnych komórek kompetentnych

Płyn transformacyjny I	Stężenie końcowe
RbCl	1,2% (w/o)
MnCl ₂ x H ₂ O	0,99% (w/o)
CH ₃ COOK	0,295% (w/o)
CaCl ₂	0,11% (w/o)
Glicerol	15% (o/o)
pH	5,6

Po doprowadzeniu pH roztworem 0,2 M kwasu octowego, płyn sterylizowano filtrem bakteriologicznym Ø 0,22µm.

Płyn transformacyjny II	Stężenie końcowe
MOPS	0,20% (w/o)
RbCl	0,12% (w/o)
CaCl ₂	1,33% (w/o)
Glicerol	15% (o/o)
pH	6,8

Płyn sterylizowano filtrem bakteriologicznym Ø 0,22µm.

4.3.2. Mieszanina do linearyzacji konstruktów Ylp351

Mieszanina do trawienia	Stężenie końcowe
NEBuffer 4 10x	1x
BSA (dołączone do kitu)	0,01% (o/o)
DNA	1 µg/10 µl
ECO109I	0,02% (o/o)
H ₂ O MiliQ ⁴²	

4.3.3. Płyn do elektroforezy w żelu agarozowym

TAE	Stężenie końcowe
Tris	40 mM
CH ₃ COOH	0,1142% (o/o)
EDTA	1 mM
pH	8,0

Do ustalenia pH wykorzystano 0,1 M Kwas octowy.

⁴² Ultraczysta woda laboratoryjna

4.3.4. Płyny do otrzymania sferoplastów drożdży

Płyn I	Stężenie końcowe
Tris-Cl	0,1 M
DTT	10 mM
pH	9,4

Płyn II	Stężenie końcowe
Sorbitol	1,2 M
Bufor fosforanowy	20 mM
Tris-Cl	12 mM
pH	7,4

4.3.5. Płyny do izolacji mitochondriów z drożdży

Mannitol X	Stężenie końcowe
Mannitol	0,65 M
Tris-Cl	10 mM
pH	7,4

Mannitol A	Stężenie końcowe
Mannitol X	
EDTA	0,5 mM
EGTA	0,1 mM
BSA odtłuszczone	0,1% (w/o)
PMSF	1 mM

Mannitol B	Stężenie końcowe
Mannitol X	
EGTA	0,2 mM
BSA odtłuszczone	0,1% (w/o)

4.3.6. Płyny do izolacji mitochondriów z komórek PC12

Płyn A	Stężenie końcowe
Sacharoza	10 mM
Mannitol	200 mM
HEPES	5 mM
EGTA	1 mM
EDTA	5 mM
Koktajl inhibitorów (Lab Empire, PIC 002.1)	1x
pH	7,4

Do ustalenia pH wykorzystano 0,1 M KOH.

Płyn B	Stężenie końcowe
Sacharoza	10 mM
Mannitol	200 mM
HEPES	5 mM
EGTA	1 mM
pH	7,4

Do ustalenia pH wykorzystano 0,1 M KOH.

4.3.7. Płyn do solubilizacji mitochondriów i elucji białka VDAC z kolumny chromatograficznej

Płyn SE	Stężenie końcowe
Tris-Cl	10 mM
EGTA	1 mM
Triton X100	3%
pH	7,0

4.3.8. Płyny do elektroforezy białek metodą SDS-PAGE

Bufor Lämmli'ego	Stężenie końcowe
Tris-Cl	60 mM
Glicerol	25% (w/o)
β – merkaptotetanol	14 mM
Błękit bromofenolowy	0,1% (w/o)
SDS	2% (w/o)
pH	7,4

Bufor SDS-PAGE	Stężenie końcowe
Glicyna	0,19 M
Tris	25 mM
SDS	0,1% (w/o)
pH	8,3

4.3.9. Płyn do elektrotransferu białek

Bufor do elektrotransferu	Stężenie składników
Glicyna	192 mM
Tris	25 mM
Metanol	20% (o/o)
pH	8,3

4.3.10. Płyny do immunodetekcji białek

Ponceau S	Stężenie składników
Ponceau S	0,2% (w/o)
Kwas trichlorooctowy	3% (w/o)

TBS-T	Stężenie składników
Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05% (w/o)
pH	7,6

Do ustalenia pH wykorzystano 5 N HCl.

PBS-T	Stężenie składników
PBS (p.4.3.11)	
Tween 20	0,05% (w/o)
pH	7,4

4.4. Skład żeli do elektroforezy

4.4.1. Skład żeli do elektroforezy białek metodą SDS-PAGE

Żel rozdzielający	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	14% (o/o)
Tris-Cl	0,25 M
SDS	0,1% (w/o)
APS	0,05% (w/o)
TEMED	0,05% (w/o)
pH	8,8

Żel zagęszczający	Stężenie końcowe
Akrylamid/bisakrylamid	5% (o/o)
Tris-Cl	0,06 M
SDS	0,1% (w/o)
APS	0,05% (w/o)
TEMED	0,05% (w/o)
pH	6,8

4.4.2. Skład żelu agarozowego do rozdziału DNA

Żel agarozowy	Stężenie końcowe
Agaroza	1%
Bromek etydyny	0,2 µg/ml
TAE	

4.5. Stosowane odczynniki

Enzymy:

Zymoliza – 100T – z *Athrobacter luteus* [100000 U/g] (**Seikagaku Corporation**)
EcoO109I (**BioLabs**)

Kity do izolacji i oczyszczania DNA:

Gene MATRIX BASIC DNA PURIFICATION KIT (**EURX**)

Odczynniki firmy Difco:

Agar, baktopenon, baktotrypton, ekstrakt drożdżowy, Yeast Nitrogen Base

Odczynniki firmy Sigma:

APS, BSA odtłuszczone, FCCP, glicerol, HEPES, TEMED, sorbitol, EGTA, EDTA, MOPS, PMSF, TMPD, Triton X-100, ampicylina, Trizma (Tris), aminokwasy, adenina, uracyl, MTT, galaktoza, HS, FBS, Poliornityna, Antibiotic antimycotic solution 100x, MgSO₄, RbCl₂, CH₃COOK, Sacharoza, KOH, CH₃COOH, DMSO, TBT

Odczynniki firmy POCH Gliwice:

β-merkaptotetanol, CaCl₂ bezwodny, NaCl, błękit bromofenolowy

Odczynniki firmy Chempur:

KCl, metanol, etanol, TCA, glukoza

Odczynniki firmy Lonza:

DMEM Glucose 4,5g/L, L-glutamina

Odczynniki firmy FLUKA:

mannitol, Comassye Brilliant Blue R

Odczynniki firmy BioShop:

PBS, Akrylamid/bisakrylamid,, MgCl₂

Odczynniki firmy Serva:

SDS, Celit, Ponceau S

Odczynniki firmy Bio-Rad:

Hydroksyapatyt, Bio –Rad protein assay (odczynnik do Bradforda)

Odczynniki firmy Thermo Science:

6xLD, marker mas 1kB (nr kat. #SM1163)

Inne odczynniki:

DTT (**Promega**), odczynniki ECL (**Amersham**), Tween 20 (**Thermo Fisher Scientific**), Azolektyna (**Avanti Polar Lipids**), Koktajl inhibitorów (**Lab Empire**), Agaroza (**ABO**), 2,5% Trypsyna 10X (**Invitrogen**)

4.6. Stosowane przeciwciała

Przeciwciała pierwszorzędowe

- Anty-VDAC1, przeciwciało monoklonalne, Abcam (nr kat. ab14734);
- Anty-VDAC2, przeciwciało poliklonalne, Proteintech (nr kat. 11663-1-AP);
- Przeciwciało skierowane przeciwko γ VDAC1; otrzymano od prof. W. Neupert (obecnie: Instytut Maxa Plancka, Martinsried, Niemcy).

Przeciwciała drugorzędowe

- Kozie Anty-Królicze IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową, Bio-Rad (nr kat. #170-6515);
- Owcze Anty-Mysie IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową; GE Healthcare (nr kat. NA931V).

5. Metody

5.1. Otrzymanie konstruktów plazmidowych i namnożenie wektora plazmidowego pYX142 do transformacji komórek drożdży

5.1.1. Przygotowanie komórek kompetentnych bakterii

Do kolb zawierających 165 ml pożywki LB (p.4.2.1) dodawano 800 µl całonocnej hodowli bakterii *E.coli* szczepu DH5α, a następnie wytrząsano przy 114 rpm w inkubatorze stołowym typu Brunswick C-24, w 37°C, do otrzymania gęstości hodowli odpowiadającej $OD_{600nm}^{43}=0,3$. Hodowlę bakterii przenoszono do falkonów o objętości 50 ml i chłodzono w lodzie przez 15 min. Falkony wirowano przy 2000 g w 4°C przez 10 min. Supernatant usuwano, a osad otrzymany z 50 ml hodowli zawieszano w 10 ml Płynu transformacyjnego I (p.4.3.1), po czym komórki chłodzono w lodzie przez 15 min. Następnie falkony wirowano przy 2000 g w 4°C przez 10 min. Osad odpowiadający 150 ml wyjściowej hodowli zawieszano w 3 ml Płynu transformacyjnego II (p.4.3.1), po czym porcjowano po 100 µl do probówek Eppendorfa, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

5.1.2. Transformacja komórek bakterii metodą szoku cieplnego i selekcja otrzymanych transformantów w obecności ampicyliny

Do probówek typu Eppendorf zawierających 100 µl komórek kompetentnych (p.5.1.1), umieszczonych w lodzie, dodawano 1 µl DNA (ok. 100 ng) i prowadzono inkubację przez 5 min. Następnie na 55 s komórki przenoszono do 42°C celem zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej. Po tym czasie przenoszono probówki z zawiesiną komórek do lodu na 2 min. W kolejnym kroku podawano 200 µl pożywki SOC (p.4.2.2), która umożliwia naprawę błon uszkodzonym komórkom i przenoszono probówki do 37°C, na 30 min, z wytrząsaniem przy 300 rpm (Termomixer Eppendorf Mastercycler). Następnie komórki przenoszono na pożywkę stałą LB z ampicyliną (p.4.2.2) i prowadzono całonocną hodowlę w ciemności, w 37°C. Hodowlę wykorzystywano następnie do izolacji konstruktów plazmidowych i wektora plazmidowego pYX142.

⁴³ ang. *Optical Density*; pol. gęstość optyczna

5.1.3. Izolacja konstruktów plazmidowych i wektora plazmidowego pYX142

Do izolacji plazmidowego DNA wykorzystano zestaw Gene MATRIX BASIC DNA PURIFICATION KIT firmy EURX. Całość procedury wykonywano w temperaturze pokojowej.

Na kolumnę wiążącą nanoszono 40 µl buforu aktywacyjnego Buffer Uni. Następnie kilkakrotnie wirowano komórki przy 12000 g przez 2 minuty tak, aby końcowo osad z 4 ml hodowli znalazł się w jednej probówce Eppendorfa. Supernatant usuwano, a do osadu bakteryjnego dodawano 250 µl buforu do zawieszania Cell R. Następnie do próbki dodawano 200 µl buforu lizującego Lysis Blue i zawartość powoli mieszano do uzyskania niebieskiej barwy roztworu. Do roztworu podawano 350 µl buforu neutralizującego Neutral B i probówkę powoli mieszano aż do całkowitej utraty barwy. Zawartość wirowano przez 8 minut przy 12000 g. Supernatant przenoszono do kolumny wiążącej i wirowano przez 2 minuty przy 12000 g. Przesącz wylewano, a do kolumny podawano 500 µl buforu płuczącego Wash UX1 i wirowano 2 minuty przy 11000 g. Przesącz powtórnie usuwano, do kolumny podawano 650 µl buforu płuczącego Wash UX2 i wirowano jak wyżej. W celu dokładniejszego wypłukania minikolumny przesącz wylewano i powtórnie wirowano przez 3 minuty przy 11000 g. Następnie minikolumnę umieszczano w nowej probówce typu Eppendorf. Do kolumny podawano 100 µl H₂O MiliQ i inkubowano 2 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 2 minuty przy 11000 g. Ilość oraz jakość wyizolowanego DNA badano przy użyciu spektrofotometru typu NanoDrop.

5.1.4. Lienaryzacja konstruktów Ylp351Q25 i Ylp351Q103

Konstrukty Ylp351Q25 i Ylp351Q103 po izolacji z komórek *E.coli* szczepu DH5α trawiono w obszarze promotora genu *LEU2* w unikatowym miejscu cięcia z wykorzystaniem enzymu EcoO109I (nr kat. #RO5O3S, BioLabs) zgodnie z protokołem rekomendowanym przez producenta.

Przygotowano 50 µl mieszaniny do trawienia (p.4.3.2), którą inkubowano 1h w temperaturze 37°C. Skuteczność trawienia weryfikowano przez rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (p.5.2). Produkt trawienia następnie oczyszczano (p.5.1.5).

5.1.5. Oczyszczanie DNA

Do oczyszczania trawionego DNA wykorzystano zestaw Gene MATRIX BASIC DNA PURIFICATION KIT firmy EURX. Całość procedury wykonywano w temperaturze pokojowej.

Na kolumnę wiążącą nanoszono 40 µl buforu aktywacyjnego Buffer Uni. Następnie do mieszaniny DNA (Mieszanina do trawienia, p.5.1.4), znajdującej się w osobnej probówce Eppendorfa, dodawano 400 µl buforu Basic i mieszano. Mieszaninę przenoszono do kolumny wiążącej i wirowano przez 1 minutę przy 11000 g. Przesącz wylewano, a do kolumny podawano 500 µl buforu płuczącego Wash UX1 i wirowano 1 minutę przy 11000 g. Przesącz powtórnie usuwano, do kolumny podawano 650 µl buforu płuczącego Wash UX2 i wirowano jak wyżej. W celu dokładniejszego wypłukania minikolumny przesącz wylewano i powtórnie wirowano przez 2 minuty przy 11000 g. Następnie minikolumnę umieszczano w nowej probówce typu Eppendorf. Do kolumny podawano 100 µl H₂O MiliQ i inkubowano 2 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 2 minuty przy 11000 g.

Otrzymany roztwór oczyszczonego DNA zagęszczano poprzez liofilizację do stężenia 1 µg/µl. Ilość oraz jakość wyizolowanego DNA badano przy użyciu spektrofotometru typu NanoDrop. Oczyszczone DNA wykorzystywano do elektroporacji drożdży *S.cerevisiae*. DNA przechowywano w -20°C.

5.2. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych

Przygotowywano DNA przez dodanie do próby barwnika 6xLD. Stosowano marker mas 1kB. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych przeprowadzano w 1% żelu agarozowym (p.4.4.2) w buforze TAE (p.4.3.3) przy natężeniu 60 mA przez około 30 min.

5.3. Otrzymanie transformantów drożdży

5.3.1. Transformacja komórek drożdży metodą elektroporacji

Hodowlę komórek drożdży prowadzono w 25 ml pożywki YPD (p.4.2.4) w 28°C do wczesnej fazy stacjonarnej ($OD_{550nm} = 4$). Hodowlę wirowano w sterylnych falkonach przy 3000 g, przez 5 min, w 4°C. Następnie osad komórek przemywano 40 ml lodowatej, sterylnej ddH₂O i wirowano przy 3000 g, przez 5 min, w 4°C. Supernatant wylewano, a otrzymany osad ponownie przemywano 20 ml lodowatej, sterylnej ddH₂O. Supernatant usuwano, a osad otrzymany po wirowaniu rozpuszczano w 5 ml 1 M lodowatego sorbitolu i ponownie wirowano przy 3000 g, przez 5 min, w 4°C. W kolejnym kroku po usunięciu supernatantu osad rozpuszczano w 80 µl 1 M lodowatego sorbitolu i przenoszono do schłodzonej kuwety do elektroporacji (0,4 cm). Do otrzymanej zawiesiny dodawano 40 µl zawiesiny zawierającej ok. 5 µg DNA. Do elektroporacji używano jednego pulsu: V= 2.5 kV, 25 µF, 200 W, w czasie 4-5 s. Następnie do zawiesiny podawano 1 ml 1 M lodowatego sorbitolu i zawartość kuwety przenoszono do sterylnej probówki Eppendorfa, po czym komórki przenoszono na stałą pożywkę selekcyjną.

5.3.2. Selekcja transformantów

Selekcję transformantów drożdży prowadzono na stałych pożywkach selekcyjnych, glukozowych z dodatkiem odpowiednich czynników selekcyjnych (SM Glukoza, p.4.2.3), przez 4 dni w 28°C. Pojedyncze kolonie przeszczepiano na świeże stałe pożywki SM Glukoza, celem ich namnożenia.

5.4. Przygotowywanie i uruchamianie banków komórek

5.4.1. Przygotowywanie i uruchamianie banków komórek drożdży

Komórki drożdży hodowano na pożywce SM Glukoza (p.4.2.3), przez 2 dni w 28°C, w ciemności. Z szalki pobierano materiał i zawieszano w sterylnym roztworze 15% glicerolu. Materiał przenoszono do krioprobówek i intensywnie wytrząsano kilka sekund. Krioprobówki zamrażano i przechowywano w -80°C.

Celem uruchomienia hodowli komórki drożdży wyszczepiano z banków na stałą pożywkę SM Glukoza (jw.). Hodowle prowadzono przez 2 dni w 28°C, w ciemności. Z pożywki pobierano jedną kolonię i dalej hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmayera (100 ml), w 25 ml pożywki SM Glukoza. Hodowlę prowadzono w 28°C z wytrząsaniem 180 rpm do osiągnięcia OD_{550nm} ok. 5 (wytrząsarka Certomat R). Po osiągnięciu zakładanej gęstości, hodowle drożdży w pożywce SM Glukoza, nazywane dalej inokulum glukozowym, przechowywano w temperaturze 4°C i stosowano do zakładania dalszych hodowli przez okres 3 tygodni. Po tym czasie procedurę powtarzano.

5.4.2. Przygotowywanie i uruchamianie banków komórek PC12

Linie komórkowe PC12 otrzymano w postaci banków komórek transportowanych w -80°C. Celem uruchomienia hodowli banki te inkubowano w 37°C aż do całkowitego ich rozpuszczenia. Następnie komórki z krioprobówek przenoszono do falkonów o objętości 15 ml, zawierających 4 ml Pożywki kompletnej (p.4.2.5) i wirowano 5 min, 500 g w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu supernatant usuwano, a komórki zawieszano w 5 ml Pożywki kompletnej i przenoszono do butelek T25, o powierzchni wzrostowej 25 cm², w których kontynuowano hodowlę do konfluencji 90%. Warunki hodowli opisano w p.5.6.2.

Po osiągnięciu żądanej konfluencji komórki pasażowano do butelek T75 celem namnożenia i zabezpieczenia materiału do badań. Z jednej butelki, o powierzchni wzrostowej 75 cm², przygotowywano 2 banki. Po uzyskaniu żądanej konfluencji komórki przemywano 5 ml PBS (p.4.3.11) w 37°C i traktowano 2 ml trypsyny 1x przez 3 min, w 37°C i w obecności 5% CO₂. Następnie odklejone komórki zawieszano w 5 ml pożywki DMEM, przenoszono do falkonów o objętości 15 ml i wirowano 5 min, 500 g w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu supernatant usuwano, a komórki zawieszano w 1800 µl Pożywki do tworzenia banków (p.4.2.5) i przenoszono do krioprobówek

w objętości 900 μ l. Do każdej krioprobówki dodawano 100 μ l DMSO, po czym natychmiast umieszczano je w lodzie i przenoszono do dewaru z ciekłym azotem (- 196°C), w którym przechowywano banki przez cały okres trwania badań.

5.5. Weryfikacja ekspresji natywnej (Htt) i zawierającej mutację (mHtt) wersji huntingtyny z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego

Obserwacje mikroskopowe prowadzono za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (ZEISS Observer.Z1) z filtrem dla białka GFP, którym znakowane są Htt i mHtt. W obserwacjach tych wykorzystano płytki 96-dołkowe ze szklanym dnem (greiner bio-one; nr kat. 655892).

5.6. Hodowla komórek

5.6.1. Hodowla komórek drożdży

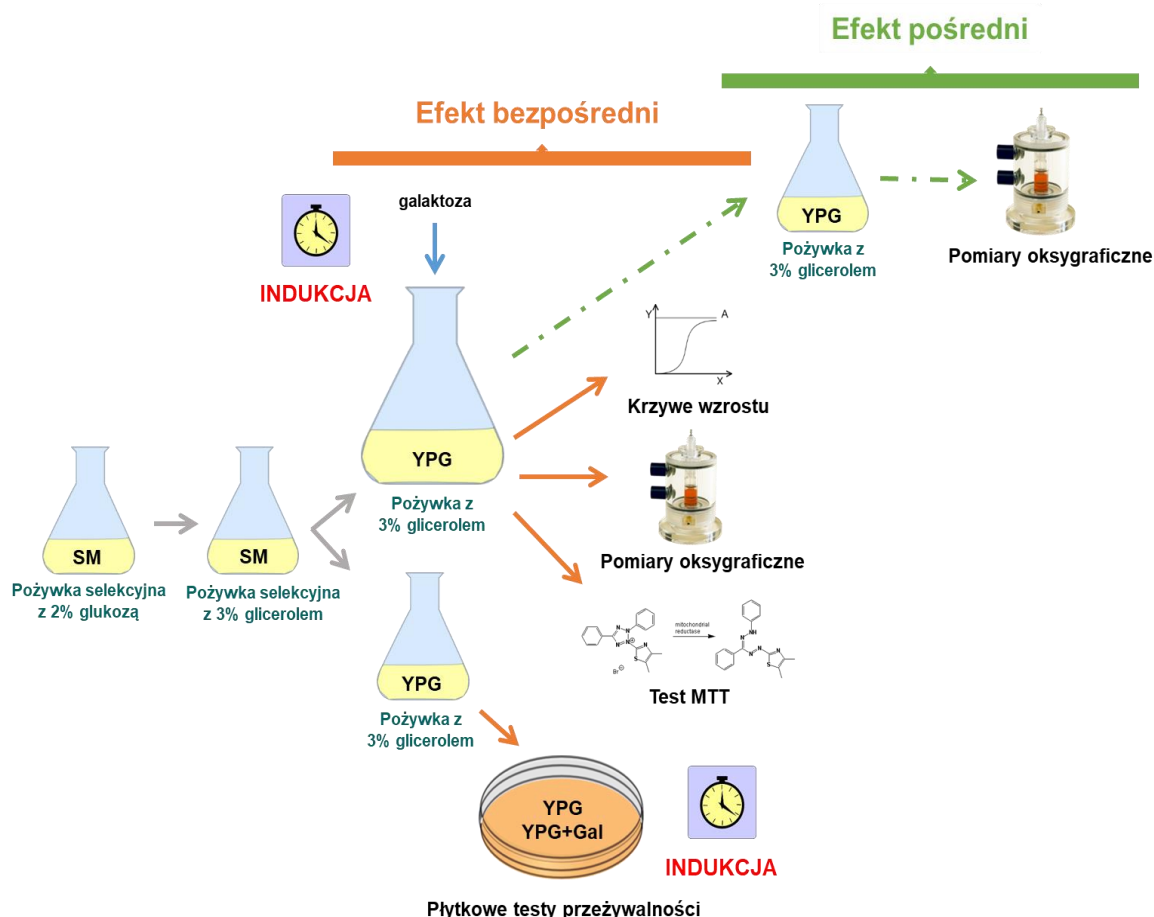
Hodowlę komórek drożdży prowadzono w celu: (1) weryfikacji indukcji ekspresji Htt i mHtt; (2) zbadania wpływu ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność i funkcje bioenergetyczne komórek i (3) izolacji mitochondriów. Hodowlę prowadzono w Erlenmayera o pojemności 100 ml (25 ml pożywki), 1 l (250 ml pożywki) i Farenbacha o pojemności 2 l (850 ml pożywki) w 28°C lub 37°C z ciągłym wytrząsaniem przy 180 rpm (wytrząsarka Certomat R).

5.6.1.1. Hodowla komórek drożdży w celu weryfikacji ekspresji Htt i mHtt z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego

Stosując tzw. inokulum glukozowe (p.5.4.1), komórki badanych szczepów drożdży wyszczepiano na płynną glicerolową pożywkę selekcyjną z dodatkiem odpowiednich czynników selekcyjnych (SM Glicerol; p.4.2.3). Hodowlę prowadzono w 25 ml pożywki, w 28°C, ok. 12 h do gęstości odpowiadającej $OD_{550nm}=0,1$. Po uzyskaniu zakładanego OD pobierano próby (1 ml) określane jako $t=0h$. Do pozostałej części hodowli podawano galaktozę (stężenie końcowe $C=3\%$), w celu indukcji ekspresji Htt i mHtt. Następnie pobierano próby w różnych czasach od indukcji ekspresji, określane jako: $t=4h$, $t=12h$, $t=24h$, $t=48h$.

5.6.1.2. Hodowla komórek drożdży w celu badania wpływu ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność i funkcje bioenergetyczne tych komórek

Inokulum glukozowe (p.5.4.1) w objętości ok. 0,5 ml przeszczepiano na płynną SM glicerol (p.4.2.3), tak, aby uzyskać wyjściową gęstość hodowli odpowiadającą $OD_{550nm}=0,15$. Hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmayera (100 ml), w 28°C z wytrząsaniem przy 180 rpm (wytrząsarka Certomat R), do gęstości odpowiadającej $OD_{550nm}=1,2$, po czym postępowano zgodnie ze strategią przedstawioną na Rysunku 9.



Rysunek 9: Przyjęta strategia hodowli komórek drożdży do badania wpływu ekspresji Htt i mHtt na ich przeżywalność i funkcje bioenergetyczne.

5.6.1.2.1. Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt

Hodowlę prowadzoną w pożywce SM Glicerol (p.5.6.1.2), przeszczepiano do 25 ml (płytkowy test przeżywalności) lub 250 ml (krzywe wzrostu, pomiary oksygraficzne, test MTT) pożywki YPG (p.4.2.4) tak aby gęstość początkowa hodowli odpowiadała $OD_{550nm} = 0,15$. Hodowlę tę prowadzono jak wyżej, do momentu uzyskania gęstości odpowiadającej OD_{550nm} ok. 1,2 przy czym prowadzono ją w 28°C lub 37°C, w zależności od warunków eksperymentu. Po uzyskaniu zakładanej gęstości pobierano 1 ml próby określane jako $t=0h$. Do pozostałej części hodowli podawano galaktozę (stężenie końcowe $C=3\%$). Następnie, podobnie jak w przypadku próby $t=0$, pobierano materiał do przygotowania krzywych wzrostu (p.5.6.1.2.3), pomiarów oksygraficznych (p.5.9) i testu MTT (p.5.8.2.1), po upływie 12, 24 i 48 godzin od podania galaktozy, tj. indukcji ekspresji Htt lub mHtt (próby określono jako: $t=12h$, $t=24h$, $t=48h$).

5.6.1.2.2. Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt

Hodowlę prowadzono jak opisano w punkcie 5.6.1.2.1. Następnie komórki drożdży po 0h, 12h, 24h i 48h hodowli w obecności galaktozy wirowano 10 min przy 3000 g w temperaturze pokojowej, usuwano nadsącz, a osad komórek przeszczepiano na płynną pożywkę YPG (p.4.2.4) tak, aby w 25 ml pożywki otrzymać gęstość odpowiadającą $OD_{550nm}=1,2$. Hodowlę prowadzono 24h w 37°C z wytrząsaniem przy 180 rpm (wytrząsarka Certomat R). Po tym czasie komórki wykorzystywano do przeprowadzenia pomiarów oksygraficznych (p.5.9).

5.6.1.2.3. Przygotowanie krzywych wzrostu

Krzywe wzrostu drożdży na pożywkach YPG i YPG+Gal w warunkach wzrostu w optymalnych temperaturowych, jak i warunkach stresu temperaturowego przygotowywano na podstawie kilku pomiarów OD_{550nm} . Hodowlę prowadzono jak opisano w punkcie 5.6.1.2.1, po czym prowadzono pomiary do osiągnięcia fazy stacjonarnej (tj. fazy zahamowanych podziałów) hodowli.

5.6.1.3. Hodowla masowa komórek drożdży w celu izolacji mitochondriów

Hodowle masowe prowadzono w temperaturze 28°C, w ciemności, przy ciągłym wytrząsaniu (wytrząsarka Certomat R), przy 180 rpm, w kolbach Erlenmeyera (100 ml) i Farenbacha (2 l), zawierających odpowiednio 25 ml i 850 ml pożywki płynnej. Hodowlę stanowiącą inokulum glukozowe (p.5.4.1), przenoszono do 25 ml pożywki płynnej YPG (p.4.2.4) celem adaptacji komórek do nowego źródła węgla. Po ok. 24h, przenoszono hodowlę do 850 ml pożywki płynnej YPG i kontynuowano hodowlę do uzyskania gęstości odpowiadającej OD_{550nm} ok. 1.

5.6.2. Hodowla komórek PC12

Hodowle komórek PC12 prowadzono w inkubatorze CytoGROW™ GLP (Sanyo), w temperaturze 37°C, w 5% CO₂, w butelkach o powierzchni wzrostowej 25 cm² i 75 cm² (odpowiednio, T25 i T75), z nakrętką z filtrem umożliwiającym wymianę gazową. Dno butelek pokrywano warstwą poliornityny (Poly-L-ornithine hydrobromide) celem zapewnienia lepszego przylegania komórek. W tym celu do naczynia hodowlanego wlewano 2 ml wodnego roztworu poliornityny o stężeniu 0,1 mg/ml i inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór usuwano i przepłukiwano naczynie sterylną wodą.

Pożywkę w hodowli wymieniano co 48h. Pasaże przeprowadzano, gdy komórki osiągały ok. 90% konfluencji, która jest wyrażana jako procent powierzchni naczynia hodowlanego zajętego przez komórki. Poziom konfluencji monitorowano za pomocą mikroskopu optycznego z kontrastem fazowym (Axiovert 40 CFL, Zeiss).

W celu przeniesienia komórek do nowych butelek, hodowlę przemywano 5 ml buforu PBS (p.4.3.11) w 37°C i traktowano 2 ml trypsyny 1x przez 3 min, w 37°C i w obecności 5% CO₂. Odklejone komórki zawieszano w Pożywce kompletnej (p.4.2.5) i porcjowano do nowych butelek T75, w objętości 10 ml na butelkę. Hodowle prowadziło jw. do otrzymania żądanej ilości materiału do badań.

5.7. Izolacja mitochondriów

5.7.1. Izolacja mitochondriów z komórek drożdży

Hodowlę komórek drożdży (p.5.6.1.3.3) wirowano przy 3000 g przez 10 min w 4°C. Osad przemywano ddH₂O i ponownie wirowano przy 3000 g przez 10 min, w 4°C. Etap ten powtarzano dwukrotnie. Osad zawieszano w Płynie I (p.4.3.4) w proporcji 6 ml płynu na 1 g osadu komórek. Następnie komórki inkubowano w 28°C z wytrząsaniem przy 125 rpm przez 15 min (wytrząsarka Certomat R). Komórki wirowano przy 3000 g przez 10 min, w 4°C, przeplukiwano 1,2 M sorbitolem i zawieszano w Płynie II (p.4.3.4), w proporcji 6 ml płynu na 1 g osadu. Do zawiesiny dodawano zymoliazę 100T (Seikagau Corporation, 100000 U/g) w proporcji 1 mg na 1 g osadu. Zawiesinę komórek wytrząsano w 28°C jak wyżej. Kontrolę trawienia ściany komórkowej prowadzono przez pomiar spadku OD przy długości fali $\lambda = 550$ nm. Próbkę do pomiarów (10 μ l/1 ml wody) pobierano w odstępach ok. 10 min. Trawienie ściany komórkowej drożdży kończono, gdy wartość OD_{550nm} osiągała ok. 20% wartości początkowej (ok. 30 min). Sferoplasty odwirowywano przy 3000 g przez 10 min, w 4°C. Osad płukano dwukrotnie lodowatym 1,2 M sorbitolem.

Następnie sferoplasty zawieszano w lodowatym Mannitolu A (p.4.3.5) w proporcji 6 ml płynu na 1 g sferoplastów. Homogenizację prowadzono w homogenizatorze szklanym Dounc'a, stosując 10-12 suwów. Otrzymany homogenat wirowano przy 1000 g przez 10 min, w 4°C. Supernatant zbierano, a osad zawieszano ponownie w Mannitolu A i homogenizowano jak wyżej, celem zwiększenia wydajności izolacji. Otrzymaną zawiesinę wirowano jak poprzednio. Uzyskane supernatanty wirowano przy 10000 g przez 10 min, 4°C. Otrzymane osady mitochondriów zawieszano w lodowatym Mannitolu B (p.4.3.5), łączono i wirowano przy 1000 g w 4°C przez 10 min, w celu pozbycia się pozostałości komórkowych. Otrzymany supernatant ponownie wirowano przy 10000 g przez 10 min, w 4°C. Osad, stanowiący frakcję mitochondrialną, dwukrotnie przemywano Mannitolem B i wirowano jak wyżej. Następnie mitochondria zawieszano w Mannitolu B.

5.7.2. Izolacja mitochondriów z komórek PC12

Z 5 butelek T75 zawierających hodowlę komórek PC12 o konfluencji ok. 90% usuwano pożywkę, a komórki przemywano 5 ml lodowatego PBS (p.4.3.11). Do butelek podawano 5 ml płynu PBS w 4°C i następnie skrobaczką ściągano osad komórek. Osad ten przenoszono do falkonów o objętości 50 ml i dwukrotnie

przemywano lodowantym PBS (10 min, 500 g, 4°C). Osad ważono. Na 0,5 g osadu podawano 10 ml Płynu A (p.4.3.6). Przygotowaną zawiesinę komórek homogenizowano za pomocą homogenizatora Dounce (15 ml, typ Tight) w lodzie (minimalna objętość mieszaniny homogenizacyjnej wynosiła 4 ml). Wykonywano ok. 50 suwów (efektywność homogenizacji sprawdzano pod mikroskopem, jeśli obserwowano wiele nienaruszonych komórek homogenizację kontynuowano). Homogenat wirowano przez 10 min, przy 900 g, w 4°C, osad wyrzucano, a supernatant wirowano 10 min, przy 13000 g, w 4°C. Otrzymany osad rozpuszczano w 1 ml lodowatego Płynu B (p.4.3.6), przenoszono do probówek Eppendorfa i następnie wirowano przez 10 min, przy 900 g, w 4°C celem usunięcia resztek komórkowych. Uzyskany supernatant wirowano przez 10 min, przy 13000 g, w 4°C. Otrzymany osad mitochondriów przemywano 1 ml lodowatego Płynu B, osuszano i zamrażano w ciekłym azocie. Próby przechowywano w -80°C.

5.8. Testy przeżywalności komórek

5.8.1. Płytkowy test przeżywalności

Próby pobierane z hodowli opisanych w p.5.6.1.2, doprowadzono do gęstości odpowiadającej $OD_{550nm}=0,8$. Następnie dla każdej z prób wykonywano serię rozcieńczeń (1x, 10x, 100x, 1000x) w sterylnej ddH₂O, po czym na pożywki stałe YPG (test fenotypowy) i YPG+Gal (p.4.2.4) nakrapiano krople o objętości 15 μ l z każdego rozcieńczenia. Płytki inkubowano w 28°C i 37°C, w ciemności. Zdjęcia wykonywano po 4 dniach hodowli.

5.8.2. Test MTT

5.8.2.1. Dla komórek drożdży

Hodowlę komórek prowadzono jak opisano w p.5.6.1.2 i p.5.6.1.2.1. Badane próby doprowadzono do gęstości odpowiadającej $OD_{550nm}=0,8$. Następnie probówki z zawiesiną komórek krótko wirowano w celu osadzenia komórek, supernatant usuwano, a osad zawieszano w 250 μ l pożywki YPG+Gal (p.4.2.4). Do tak przygotowanych prób podawano po 0,25 mg MTT rozpuszczonego w PBS (p.4.3.11) w objętości 50 μ l. Komórki inkubowano w obecności MTT w 28°C lub w 37°C (w zależności od warunków hodowli) przez 3h. Następnie do prób podawano 500 μ l izopropanolu z 0,04 M HCl, po czym intensywnie wytrząsano w celu rozpuszczenia powstałego formazanu. Następnie próby wirowano 2 minuty przy 11000 g, w temperaturze pokojowej. Supernatant zbierano do kuwetek pomiarowych i mierzono OD przy $\lambda=570nm$.

5.8.2.2. Dla komórek PC12

Dzień przed rozpoczęciem eksperymentu przenoszono komórki na płytkę 24 dołkową w takiej ilości, aby konfluencja komórek w następnym dniu wynosiła ok. 80%. W dniu eksperymentu komórkom wymieniano pożywkę na 1 ml czystego DMEM. Doksycyklinę (1 μ g/ml) podawano do dołków tak, aby czas ekspresji Htt i mHtt w dniu zakończenia eksperymentu wynosił, w kolejnych dołkach: 48h, 24h, 8h i 4h. Do komórek po odpowiednim czasie ekspresji Htt i mHtt i do komórek kontrolnych podawano 1 ml roztworu MTT w DMEM (0,25 mg/ml). Komórki inkubowano w obecności MTT, w 37°C przez 3h, po czym powstały formazan rozpuszczano w izopropanolu z 0,04 M HCl. Tak przygotowane próby mierzono

spektrofotometrycznie przy $\lambda=570\text{nm}$. Kontrolę stanowiły komórki hodowane na tej samej płytce w tym samym czasie, do których nie podawano doksycykliny.

Pomiary wykonywano za pomocą spektrofotometru UV – 1650 PC SHIMADZU.

5.9. Pomiary oksygraficzne

5.9.1. Wyznaczenie szybkości zużycia tlenu w wybranych stanach oddechowych rejestrowanych dla komórek

Komórki drożdży dwukrotnie przemywano w ddH₂O i wirowano przy 3000 g w 4°C przez 10 min. Osad resuspendowano w buforze PBS (p.4.3.11) o temperaturze 4°C, wyznaczano gęstość uzyskanej suspensji (pomiar OD przy $\lambda=550\text{nm}$) i przechowywano ją w temperaturze 0-4°C. Pomiary szybkości zużycia tlenu prowadzono z użyciem elektrody tlenowej Clarka w systemie Hansatech, w objętości 500 μl pożywki YPG (p.4.2.4) dla prób $t=0$ lub YPG+Gal (p.4.2.4) dla prób $t=12\text{h}$, $t=24\text{h}$, $t=48\text{h}$. Podawano ok. 20 μl suspensji komórek do każdego z naczynek pomiarowych w ilości 1 OD/0,5 ml pożywki. Pomiar szybkości zużycia tlenu prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Hansatech.

5.9.2. Wyznaczenie statusu sprzężenia energetycznego komórek *S.cerevisiae*

Komórki traktowano TBT (inhibitor syntazy ATP) i FCCP (rozprężacz) w celu rejestracji szybkości odpowiednio stanu 4 i stanu U (Rys.23). Ilość TBT i FCCP wyznaczano niezależnie dla każdego typu komórek. Stan podstawowy mierzono bezpośrednio po dodaniu komórek do naczynka pomiarowego. Stan 4 (stan niefosforylujący) obserwowano po podaniu 2-8 μM TBT, w zależności od czasu trwania hodowli. Prędkość oddychania w stanie fosforylującym obliczano, jako różnicę między stanem basal a stanem 4. Stan U (stan rozprężony, maksymalne oddychanie) obserwowano po podaniu FCCP w stężeniu od 1 μM do 2 μM , w zależności od badanego typu komórek.

5.10. Pomiar stężenia białka metodą Bradford

Krzywą wzorcową otrzymywano stosując rozcieńczenia roztworu odtłuszczonego BSA tak, aby uzyskać stężenia w zakresie od 1,25 do 20 μg białka w 50 μl roztworu. Próby badane przygotowywano przez dodanie 1 μl analizowanego preparatu do 49 μl H_2O MiliQ. Następnie do każdej z badanych prób oraz do prób składających się na krzywą wzorcową dodawano 2,5 ml pięciokrotnie rozcieńczonego odczynnika Bradford. Całość inkubowano przez 15 min i dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda=595\text{ nm}$.

Pomiary wykonywano za pomocą spektrofotometru UV – 1650 PC SHIMADZU.

5.11. Izolacja białka VDAC

Białka VDAC izolowano wg. procedury opisanej przez De Pinto i in. (1987). Zamrożone mitochondria zawieszano w 0,6 ml lodowatego Płynu SE (p.4.3.7). Solubilizację prowadzono w lodzie, ok. 30 min, co 5 min intensywnie wytrząsając zawiesinę przez kilka sekund. Mieszaninę solubilizacyjną wirowano 30 min, przy 13000 g, w 4°C. Otrzymany supernatant w ilości 0,6 ml nakładano na suchą kolumnę zawierającą mieszaninę hydroksypatyty i celitu w stosunku 2:1. Elucję prowadzono w 4°C. Kolumnę przemywano Płynem SE i zbierano 3 frakcje po ok. 200 μl . Otrzymane frakcje przechowywano w -80°C.

5.12. Detekcja białek

5.12.1. Immunodetekcja białek metodą „Western blot”

5.12.1.1. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w obecności siarczanu dodecyłu sodu (SDS-PAGE)

Przygotowywano próby zawierające 30 µg mitochondriów (p.5.7.1) w przypadku detekcji yVDAC oraz 100 µg mitochondriów w pozostałych przypadkach. Próby zawieszano w Buforze Lämmli’ego (p.4.3.8) i denaturowano w 95°C przez 3 min. Elektroforezę prowadzono w żelu poliakryloamidowym (p.4.4.1) w buforze SDS-PAGE (p.4.3.8) przy napięciu 180 V przez około godzinę.

5.12.1.2. Elektrotransfer półsuchy

Wykonywano elektrotransfer półsuchy (aparat do transferu półsuchego Apelex) na membrany nitrocelulozowe, przy natężeniu 250 mA, trwający 75 min. Membrany nitrocelulozowe z przeniesionymi białkami wybarwiano roztworem Ponceau S (p.4.3.10), by ocenić jakość transferu i ułożenie prążków.

5.12.1.3. Immunodetekcja

Membrany nitrocelulozowe blokowano przez 16 godzin w 5% roztworze mleka odtłuszczonego (p.4.3.11), w buforze TBS-T lub PBS-T (p.4.3.10), w zależności od używanych później przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych (p.4.5; Tab.4). Następnie membrany zalewano roztworem przeciwciała pierwszorzędowego i inkubowano 3-16 godzin (w zależności od stosowanego przeciwciała), po czym trzykrotnie płukano (5 min, 5 min, 15 min) odpowiednim dla przeciwciała buforem. Następnie membrany zalewano roztworem przeciwciała drugorzędowego i inkubowano 1 godzinę, po czym ponownie trzykrotnie płukano odpowiednim buforem. Roztwory przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych przygotowano jak podsumowano w tabeli 2, w odpowiednich buforach z dodatkiem 3% mleka odtłuszczonego. Następnie membrany uwrażliwiano roztworami ECL firmy Roche przez 3 min i nakładano na nie klisze fotograficzne (Fuji Medical RX). Czas ekspozycji optymalizowano dla każdego stosowanego przeciwciała. Po tym czasie klisze wywoływano, a wyniki archiwizowano w postaci skanów.

	Blokowanie		Przeciwciało pierwszorzędowe			Przeciwciało drugorzędowe		
	Bufor	Czas inkubacji	Bufor	Stosowane stężenie	Czas inkubacji	Bufor	Stosowane stężenie	Czas inkubacji
yVDAC	TBS-T w 5% mleku	16h	TBS-T w 3% mleku	1:1000	3h	TBS-T w 3% mleku	1:10000	1h
hVDAC1	TBS-T w 5% mleku	16h	TBS-T w 3% mleku	1:1000	16h	TBS-T w 3% mleku	1:10000	1h
hVDAC2	PBS-T w 5% mleku	16h	PBS-T w 3% mleku	1:500	16h	PBS-T w 3% mleku	1:10000	1h
hVDAC3	TBS-T w 5% mleku	16h	TBS-T w 3% mleku	1:1000	16h	TBS-T w 3% mleku	1:10000	1h

Tabela 4. Warunki immunodetekcji. TBS-T i PBS-T, bufor TBS i PBS z dodatkiem 0,05% Tween 20

5.12.2. Detekcja białek metodą spektrofotometrii mas

Próby do analizy przygotowywano przez zawieszenie 20 µl frakcji 1 (p.5.11) w Buforze Lämmliego (p.4.3.8), denaturację w 95°C i krótki rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym (p.5.12.1), w celu usunięcia TritonuX100, którego obecność w próbach mogłaby zaburzać wyniki chromatografii. Elektroforezę prowadzono ok. 15 min, do momentu „wejścia” prób w żel rozdzielający, po czym wycinano prążki odpowiadające całości białek w próbach nakładanych na żel. Analizę wyciętych prążków przeprowadziło Laboratorium Spektrometrii Mas, Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Warszawa). Analiza ta została przeprowadzona metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Wyznaczone wartości indeksu emPAI⁴⁴ wykorzystano do detekcji białek i określenia ich relacji ilościowych.

⁴⁴ ang. *Exponentially Modified Protein Abundance Index*; pol. zmieniony wykładniczo indeks zawartości białka

5.13. Pomiar aktywności kanałowej białka VDAC

5.13.1. Pomiar przewodnictwa kanałów w sztucznych błonach lipidowych

Pomiary przeprowadzono w systemie BLM⁴⁵ przy udziale dr Andonisa Karachitosa.

Dwuwarstwę lipidową tworzą w otworze o średnicy około 0,25 mm, który znajduje się w cienkiej ścianie teflonowej, dzielącej naczynie pomiarowe (Warner instruments) na dwie komory. Kontakt elektryczny był zapewniony dzięki elektrodom Ag/AgCl za pośrednictwem mostków agarowych, wypełnionych 3 M KCl. Dwuwarstwę formowano poprzez nałożenie na otwór 2,5 % roztworu azolektyny (mieszaniny fosfolipidów izolowanych z nasion soi) o stężeniu 25 mg/ml w n-dekanie. W pomiarach stosowano zwykle 1 µg oczyszczonego białka (p.0), które podawano do komory cis. Pomiary prowadzono w 1 M KCl pH 7,0, w objętości 1 ml, w każdej komorze. Białko o aktywności kanałowej podczas wbudowania w sztuczną błonkę umożliwia przepływ jonów rejestrowany przez wzmacniacz pomiarowy BLM-120 (Bio-LOGIC Science Instruments) (Karachitos i in., 2016a).

5.13.2. Wyznaczenie parametrów określających funkcjonowanie kanału

Przewodnictwo kanału obliczano jako odwrotność oporności układu przy potencjale błonowym równym +10 mV, z zastosowaniem wzoru: $G(S) = \frac{1}{R(\Omega)} = \frac{I(A)}{U(V)}$,

gdzie: G oznacza przewodnictwo elektryczne, R – opór elektryczny, I – natężenie mierzonego prądu elektrycznego, a U – napięcie elektryczne w poprzek błony. Otrzymane wyniki wyrażone w nS posłużyły do przygotowania histogramów przewodnictwa kanału VDAC.

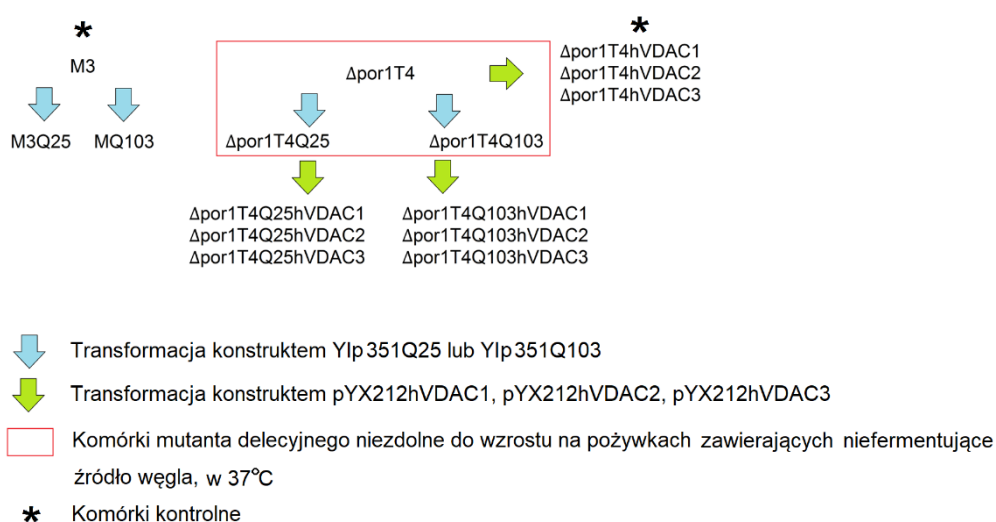
Zależność od potencjału wyrażano jako stosunek przewodnictwa kanału przy danym potencjale (G(V)) do przewodnictwa kanału w stanie otwartym (G_{max} przy +10 mV). Zależność od potencjału mierzono z wykorzystaniem fali trójkątnej o częstotliwości 10 mHz, w przedziale od – 60 mV do + 60 mV.

⁴⁵ ang. *black lipid membrane*; pol. czarna błona lipidowa

6. Wyniki

6.1. Charakterystyka otrzymanego modelu drożdżowego choroby Huntingtona

Drożdżowy model HD skonstruowano w oparciu o szczep M3 (szczep dziki) i $\Delta por1T4$ (mutant delecyny pozbawiony genu *POR1*), wykorzystując ponadto konstrukty YIP351Q25 i YIP351Q103 (wprowadzające sekwencje kodujące, odpowiednio, Htt i mHtt) oraz pYX212hVDAC1, pYX212hVDAC2 i pYX212hVDAC3 (wprowadzające sekwencje ludzkich izoform VDAC). Szczegółowe informacje dotyczące wykorzystanych szczepów i konstruktyw oraz zastosowanej strategii przedstawiono w materiałach i metodach (p.4.1, p.5.3).



Rysunek 10. Schemat ilustrujący strategię zastosowaną do konstrukcji drożdżowego modelu HD. $\Delta por1T4$ – mutant pozbawiony genu *POR1*; Yip351 – wektor, do którego wprowadzono sekwencje egzonu 1 Htt (25 powtórzeń kodonu glutaminy; 25Q) lub mHtt (103 powtórzeń kodonu glutaminy; 103Q); pYX212 – wektor, do którego wprowadzono sekwencję kodującą danej izoformy ludzkiego białka VDAC (hVDAC1, hVDAC2, hVDAC3).

6.1.1. Selekcja otrzymanych komórek transformantów na pożywkach selekcyjnych

Selekcję oparto na braku lub obecności zastosowanych konstruktyw i zawartych w nich markerów auktotroficznych, tj: Ylp351Q25 i Ylp351Q103, zawierających funkcjonalny gen *LEU2* oraz pYX212hVDAC1, pYX212hVDAC2 i pYX212hVDAC3, zawierających funkcjonalny genu *URA3* (Tab.5).

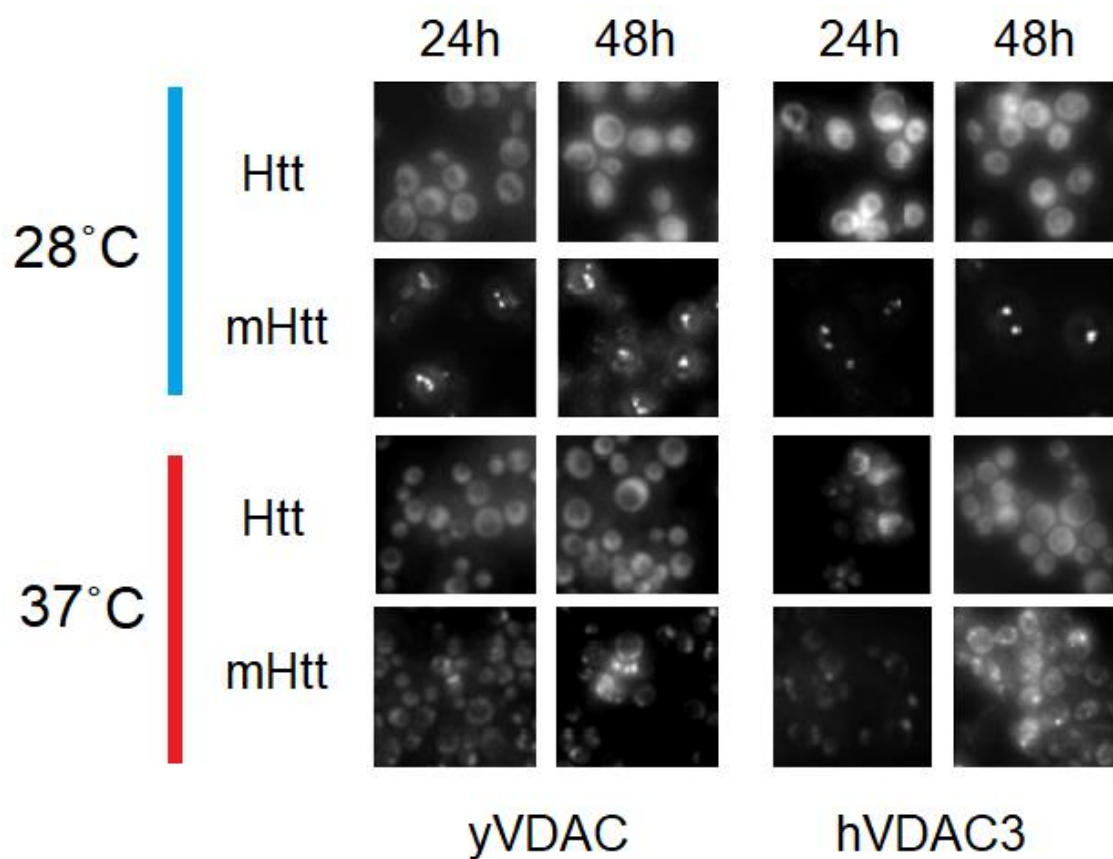
	+URA + LEU	- URA + LEU	- LEU + URA	- URA - LEU
Szczepy	M3 <i>Δpor1T4</i>	<i>Δpor1T4hVDAC1</i> <i>Δpor1T4hVDAC2</i> <i>Δpor1T4hVDAC3</i>	M3Q25 M3Q103 <i>Δpor1T4Q25</i> <i>Δpor1T4Q103</i>	<i>Δpor1T4Q25hVDAC1</i> <i>Δpor1T4Q103hVDAC1</i> <i>Δpor1T4Q25hVDAC2</i> <i>Δpor1T4Q103hVDAC2</i> <i>Δpor1T4Q25hVDAC3</i> <i>Δpor1T4Q103hVDAC3</i>

Tabela 5. Wymagana suplementacja zastosowanej pożywki selekcyjnej w przypadku komórek drożdżowego modelu HD. Skład pożywki opisano w Materiałach (p.4.2.3). URA - uracyl; LEU - leucyna.

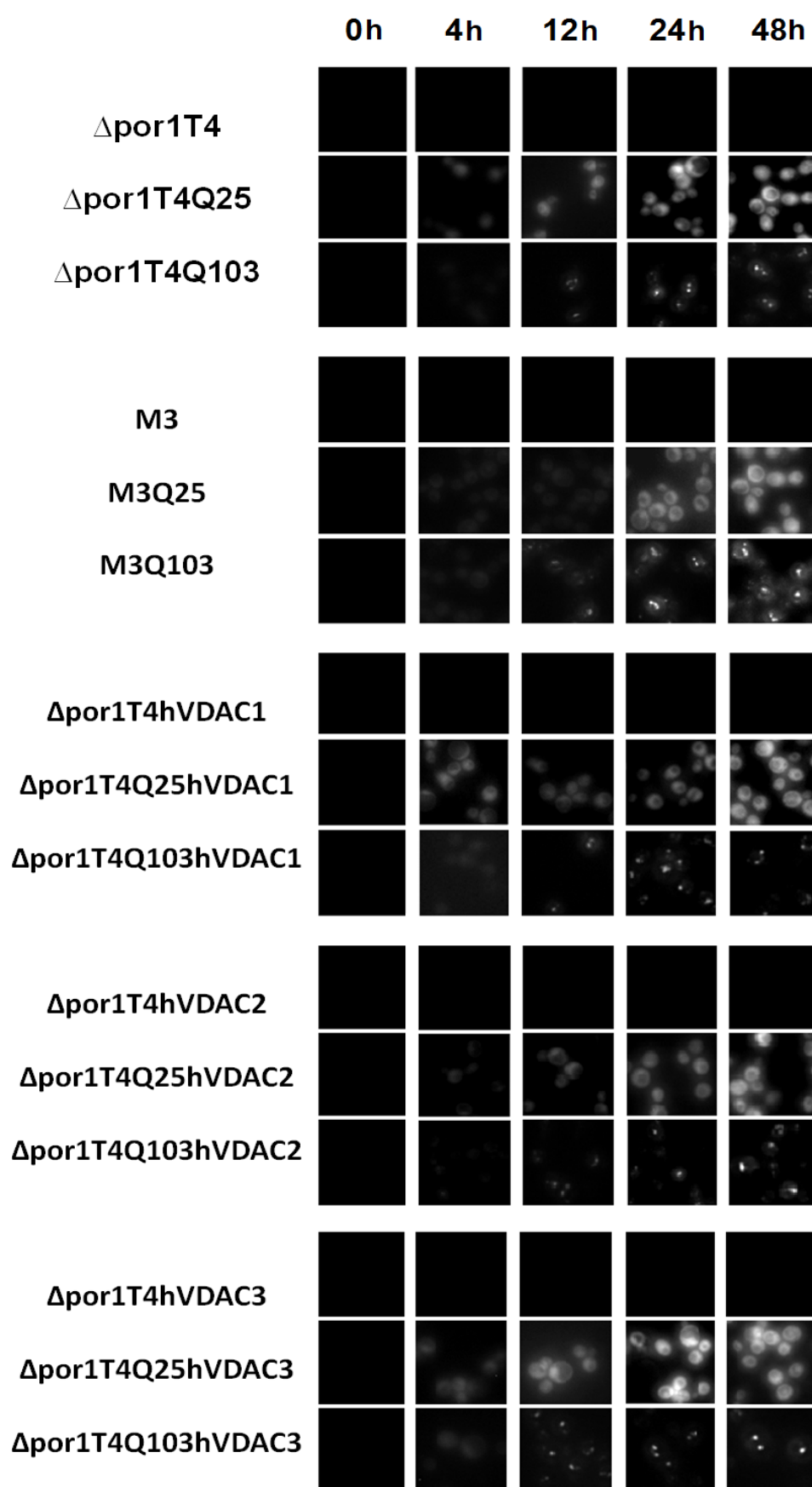
6.1.2. Weryfikacja ekspresji Htt i mHtt z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

Znacznik w postaci GFP (p.4.1.1.1) umożliwił wykorzystanie mikroskopii fluorescencyjnej do sprawdzenia czy w komórkach modelu drożdżowego HD zachodzi indukowana podaniem galaktozy ekspresja konstruktyw Ylp351Q25 i Ylp351Q103. W tym celu wykonano serię zdjęć za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (ZEISS Observer.Z1), po różnym czasie od podania galaktozy (t=0h, 4h, 12h, 24h, 48h), w warunkach optymalnych dla wzrostu drożdży (28°C), jak i warunkach stresu temperaturowego (37°C).

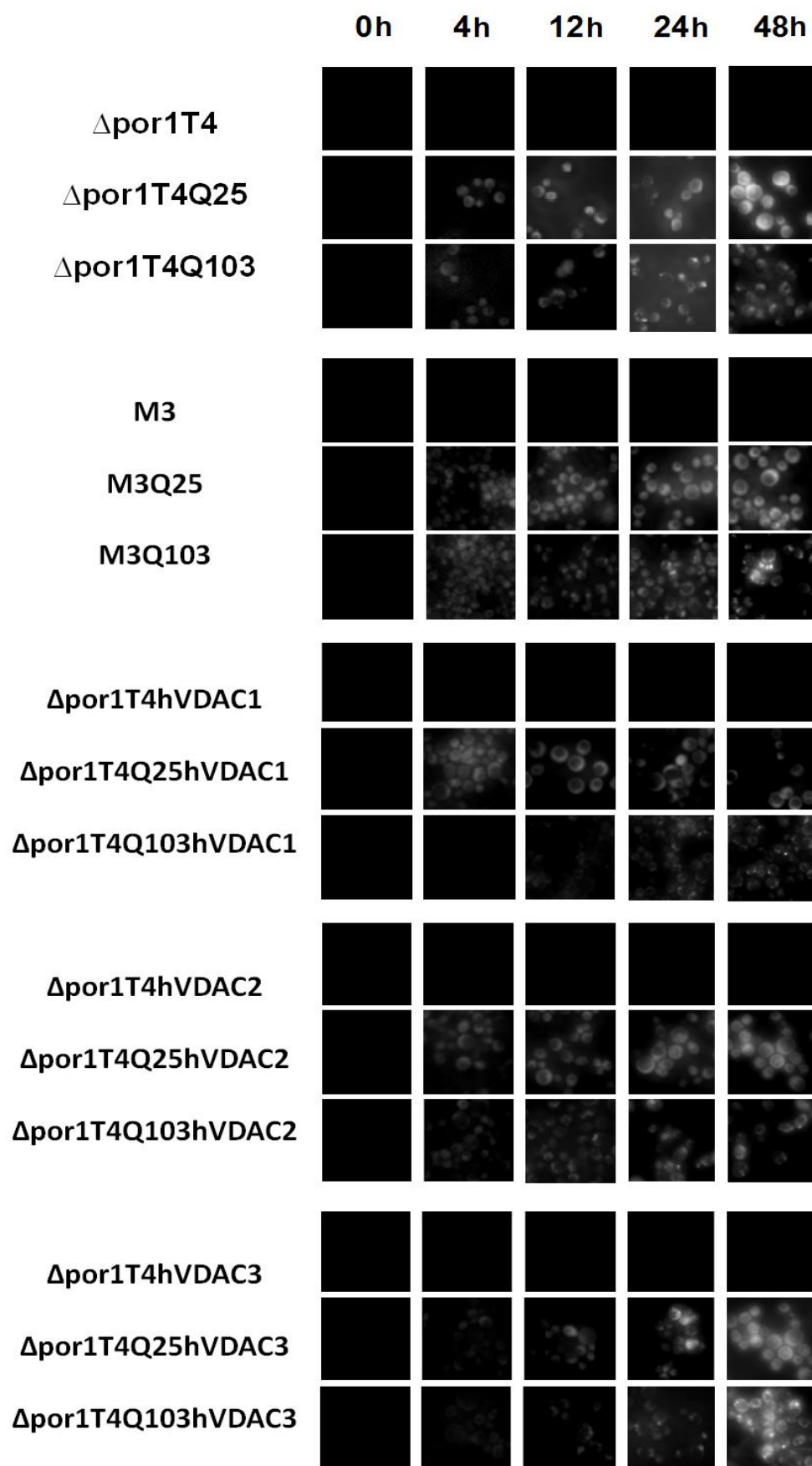
Przykładowe zdjęcia potwierdzające ekspresję Htt i mHtt w różnych warunkach temperaturowych pokazano na rysunku 11, natomiast zbiór zdjęć ilustrujących wszystkie badane warunki zawierają rysunki 12 i 13. Zgodnie z przewidywaniami opartymi na dostępnych danych literaturowych (Solans i in., 2006), obserwowano agregację mHtt. Co ciekawe, zauważono, iż w 37°C, w porównaniu z 28°C, agregacja mHtt zachodzi wolniej i w mniejszym stopniu. Efekt ten jest niezależny od białka VDAC, ponieważ występuje zarówno w komórkach pozbawionych yVDAC, komórkach z ekspresją tego białka, jak i w komórkach z ekspresją izoform ludzkiego białka VDAC.



Rysunek 11. Przykładowe zdjęcia ilustrujące ekspresję Htt i mHtt w komórkach modelu drożdżowego HD przy zastosowaniu temperatury optymalnej dla wzrostu i szoku termicznego. Do przygotowania rysunku zastosowano komórki z ekspresją yVDAC tj. M3Q25 (Htt) i M3Q103 (mHtt) oraz komórki z ekspresją hVDAC3 tj. $\Delta por1T4Q25hVDAC3$ (Htt) i $\Delta por1T4Q103hVDAC3$ (mHtt).



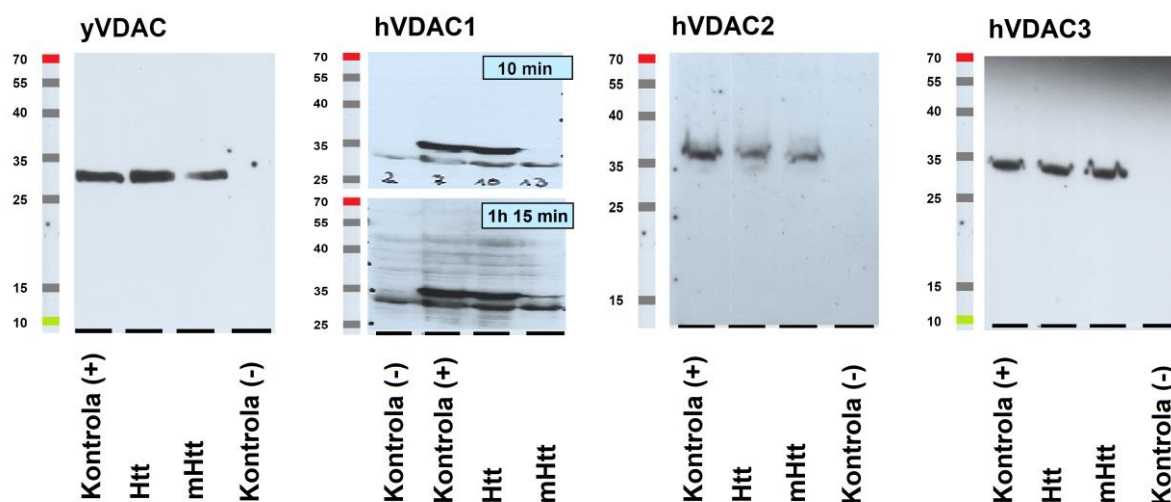
Rysunek 12. Ekspresja Htt i mHtt w komórkach modelu drożdżowego HD, hodowanych w temperaturze 28°C. Przedstawione zdjęcia są reprezentatywne dla 3 powtórzeń.



Rysunek 13. Ekspresja Htt i mHtt w komórkach modelu drożdżowego HD, hodowanych w temperaturze 37°C. Przedstawione zdjęcia są reprezentatywne dla 2 powtórzeń.

6.1.3. Weryfikacja ekspresji białek VDAC metodą Western Blot

Ekspresję białek VDAC w komórkach drożdżowego modelu HD weryfikowano metodą Western Blot (p.5.12.1) stosując jako kontrolę negatywną mitochondria izolowane z komórek mutantu delecyjnego ($\Delta por1T4$), pozbawionego genu *POR1*, a jako kontrolę pozytywną mitochondria izolowane z komórek danego szczepu, pozbawione jednak konstruktów umożliwiających ekspresję Htt i mHtt. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 14.

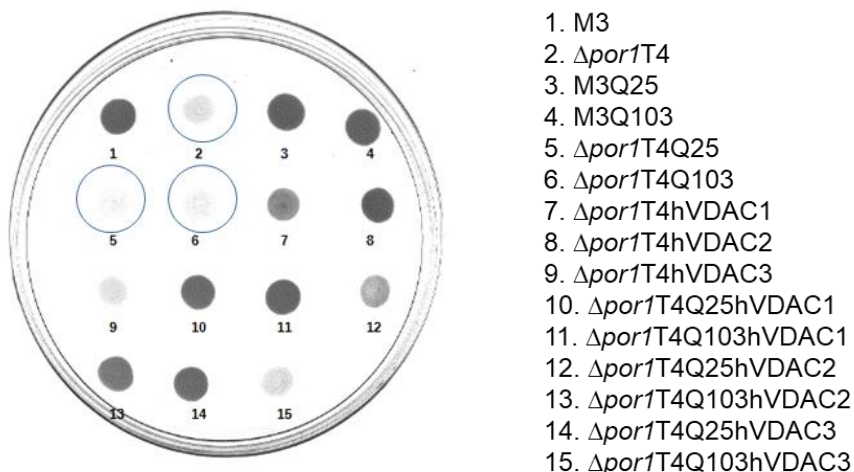


Rysunek 14. Weryfikacja ekspresji białek VDAC w komórkach modelu drożdżowego HD metodą Western Blot. Kontrola (+), mitochondria wyizolowane z komórek kontrolnych (patrz Rys.10), Kontrola (-), mitochondria wyizolowane z komórek $\Delta por1T4$; Htt, mitochondria wyizolowane z komórek zawierających konstrukt YIp351Q25; mHtt, mitochondria wyizolowane z komórek zawierających konstrukt YIp351Q103. Przedstawione zdjęcia są reprezentatywne dla 2 powtórzeń.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że, wykazano obecność białek VDAC (zarówno drożdżowej jak i ludzkich), w mitochondriach wszystkich komórek uzyskanych na drodze transformacji komórek szczepu dzikiego M3 (M3, M3Q25, M3Q103) jak i mutantu delecyjnego transformowanych konstruktami pYX212hVDAC1, pYX212hVDAC2 i pYX212hVDAC3. Zaobserwowano jednakże pewne różnice ilościowe, szczególnie w przypadku komórek z ekspresją hVDAC1.

6.1.4. Weryfikacja ekspresji białek VDAC metodą testu fenotypowego

Aby potwierdzić obecność funkcjonalnych białek VDAC w mitochondriach komórek drożdżowego modelu HD, przeprowadzono test fenotypowy na pożywce YPG, w warunkach stresu temperaturowego, tj. 37°C (p.5.8.1). Dostępne dane literaturowe wskazują bowiem, iż komórki mutanta delecyjnego drożdży pozbawionego funkcjonalnego genu *POR1* nie są zdolne do wzrostu w 37°C na pożywce zawierającej niefermentujące źródło węgla (glicerol), podczas gdy obecność funkcjonalnych białek hVDAC1 i hVDAC2 przywraca tę możliwość (De Pinto i in., 2010). Efekt ten w komórkach z ekspresją hVDAC3 nadal jest dyskutowany.



Rysunek 15. Wzrost komórek modelu drożdżowego HD w warunkach stresu temperaturowego na pożywce YPG. Hodowlę prowadzono przez 4 dni. Poszczególne szczepy oznaczono numerami od 1 do 15. Niebieskimi kołami oznaczono komórki mutantu delecyjnego, w których nie zachodzi ekspresja białka VDAC. Przedstawiony wynik testu fenotypowego jest reprezentatywny dla 3 powtórzeń.

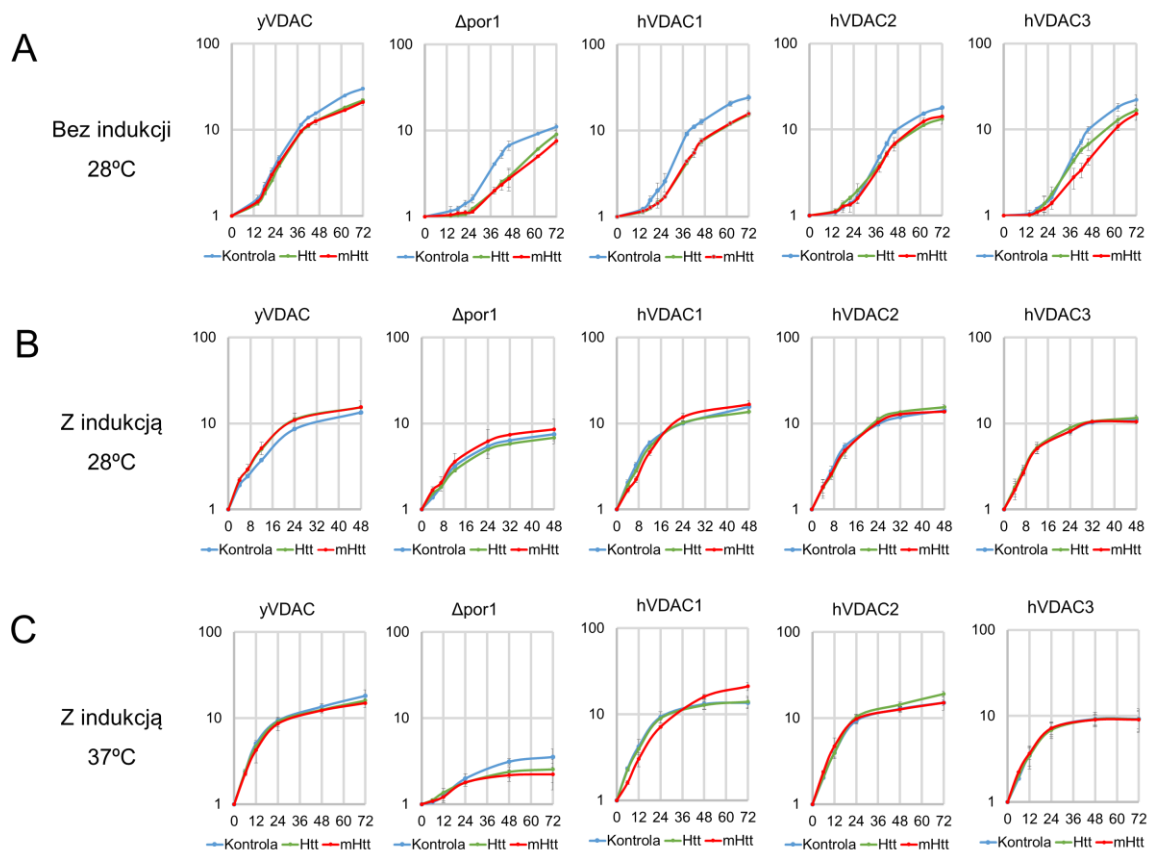
Otrzymane wyniki wskazują, że komórki drożdżowego modelu HD z ekspresją yVDAC, hVDAC1, hVDAC2 i mniejszym stopniu hVDAC3 są zdolne do wzrostu w zastosowanych warunkach, co potwierdza obecność w tych komórkach funkcjonalnych białek VDAC.

6.2. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na funkcjonowanie komórek drożdżowego modelu choroby Huntingtona

Wpływ ekspresji Htt i mHtt na komórki otrzymanego modelu HD badano uwzględniając ich wzrost na pożywce zawierającej niefermentujące źródło węgla (YPG), przeżywalność i parametry bioenergetyczne. Dla uproszczenia nazwy badanych szczepów komórek skrócono do symbolu określającego ulegające ekspresji białko VDAC (yVDAC i hVDAC1-hVDAC3), a w przypadku jego braku zastosowano skrót $\Delta por1$.

6.2.1. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przebieg wzrostu komórek drożdżowego modelu HD

Krzywe wzrostu przygotowywano na podstawie pomiaru gęstości optycznej (OD) hodowli (p.5.6.1.2.1) prowadzonych w warunkach braku indukcji ekspresji Htt i mHtt (16A) i po podaniu galaktozy (16B i 16C).



Rysunek 16. Krzywe wzrostu komórek drożdżowego modelu HD w warunkach braku i indukcji ekspresji Htt i mHtt. A, wzrost komórek na pożywce YPG w 28°C; B, wzrost komórek na pożywce YPG+Gal w 28°C; C, wzrost drożdży na pożywce YPG+Gal w 37°C. Galaktozę, podano do pożywki YPG w celu indukcji ekspresji Htt i mHtt. Na osi y przedstawiono wartości $\lg_{10}X$, oś X reprezentuje czas (h). Przedstawione wykresy skonstruowano na podstawie 3 powtórzeń.

Z powyższych danych wynika, iż w 28°C, w warunkach braku ekspresji Htt i mHtt, wszystkie komórki kontrolne (nietransformowane konstrukcjami zawierającymi sekwencje kodujące Htt i mHtt) rosną szybciej, niż odpowiednie komórki transformowane tymi konstrukcjami (Rys.16A). Przy czym należy zwrócić uwagę, iż komórki *Δpor1T4* szybciej osiągają fazę stacjonarną. Po podaniu galaktozy, czyli indukcji ekspresji Htt i mHtt, efekt ten znika (Rys.16B). Nie obserwuje się bowiem różnic we wzroście komórek z ekspresją Htt i mHtt oraz komórek kontrolnych.

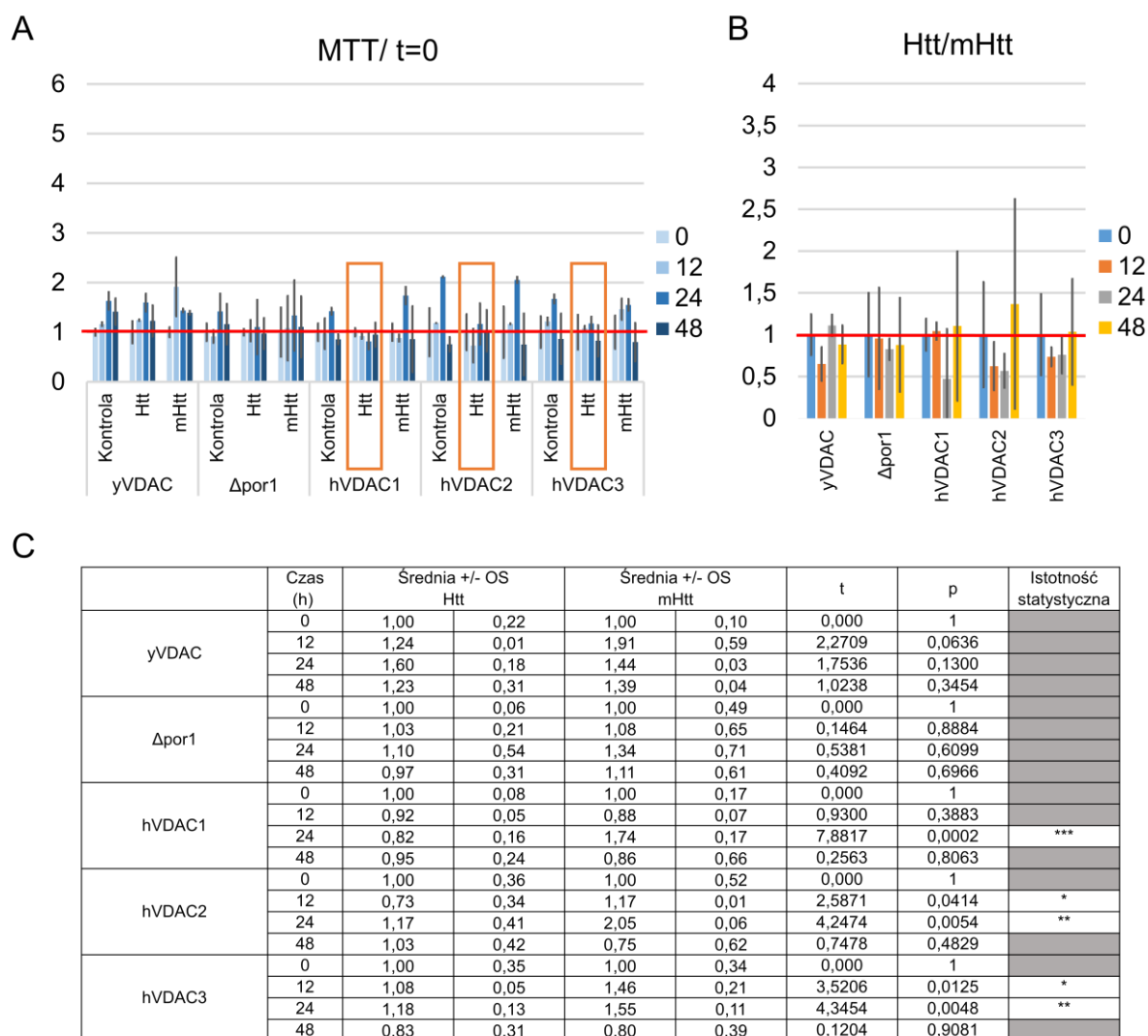
Natomiast w temperaturze 37°C, ekspresja Htt i mHtt nie wpływa na wzrost komórek z ekspresją yVDAC, hVDAC2 i hVDAC3. W przypadku komórek z ekspresją hVDAC1 i mHtt (*Δpor1T4Q103hVDAC1*), początkowo obserwuje się zwolniony wzrost, jednak po ok. 36h komórki z ekspresją mHtt rosną szybciej od komórek z ekspresją Htt i komórek kontrolnych (Rys.16C). W przypadku komórek bez ekspresji białka VDAC, wzrost w 37°C jest minimalny. Podobnie jak w 28°C, przy braku ekspresji Htt i mHtt, komórki kontrolne później wchodzi w fazę stacjonarną, a co za tym idzie, mają większy przyrost masy od komórek zawierających sekwencje kodujące Htt i mHtt.

6.2.2. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek modelu drożdżowego HD badany metodą MTT

Metoda MTT to test kolorymetryczny oparty na reakcji, która zachodzi w żywych komórkach, zależny jest od aktywności mitochondriów i polega na redukcji żółtego rozpuszczalnego bromku 3-(4,5-dimetylo-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT) do błękitnego formazanu (p.5.8.2.1). Zatem wzrost wyniku testu MTT odpowiada zwiększonej aktywności mitochondriów/przeżywalności komórek podczas gdy jego spadek uznaje się za wskaźnik obniżonej aktywności mitochondriów/przeżywalności. Pomiary prowadzono na pożywce YPG (p.4.2.4), w warunkach braku ekspresji Htt i mHtt ($t=0h$) oraz po 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt (indukowanej podaniem galaktozy), stosując kontrolę w postaci komórek nietransformowanych konstrukcjami zawierającymi sekwencje kodującą tych białek. Badania prowadzono w temperaturze optymalnej dla wzrostu komórek drożdży, tj. w 28°C i warunkach stresu temperaturowego, tj. w 37°C. Uzyskane wyniki normalizowano uwzględniając wartości uzyskane w czasie $t = 0h$, tj. przed podaniem galaktozy (Rys.17A i Rys.18A). Na rysunkach 17B i 18B porównano wartości uzyskane dla komórek z ekspresją Htt i komórek z ekspresją mHtt. Istotność statystyczną wyników analizowano porównując wartości średnie dla komórek z ekspresją Htt i mHtt (Rys.17C i 18C).

6.2.2.1. Przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w 28°C

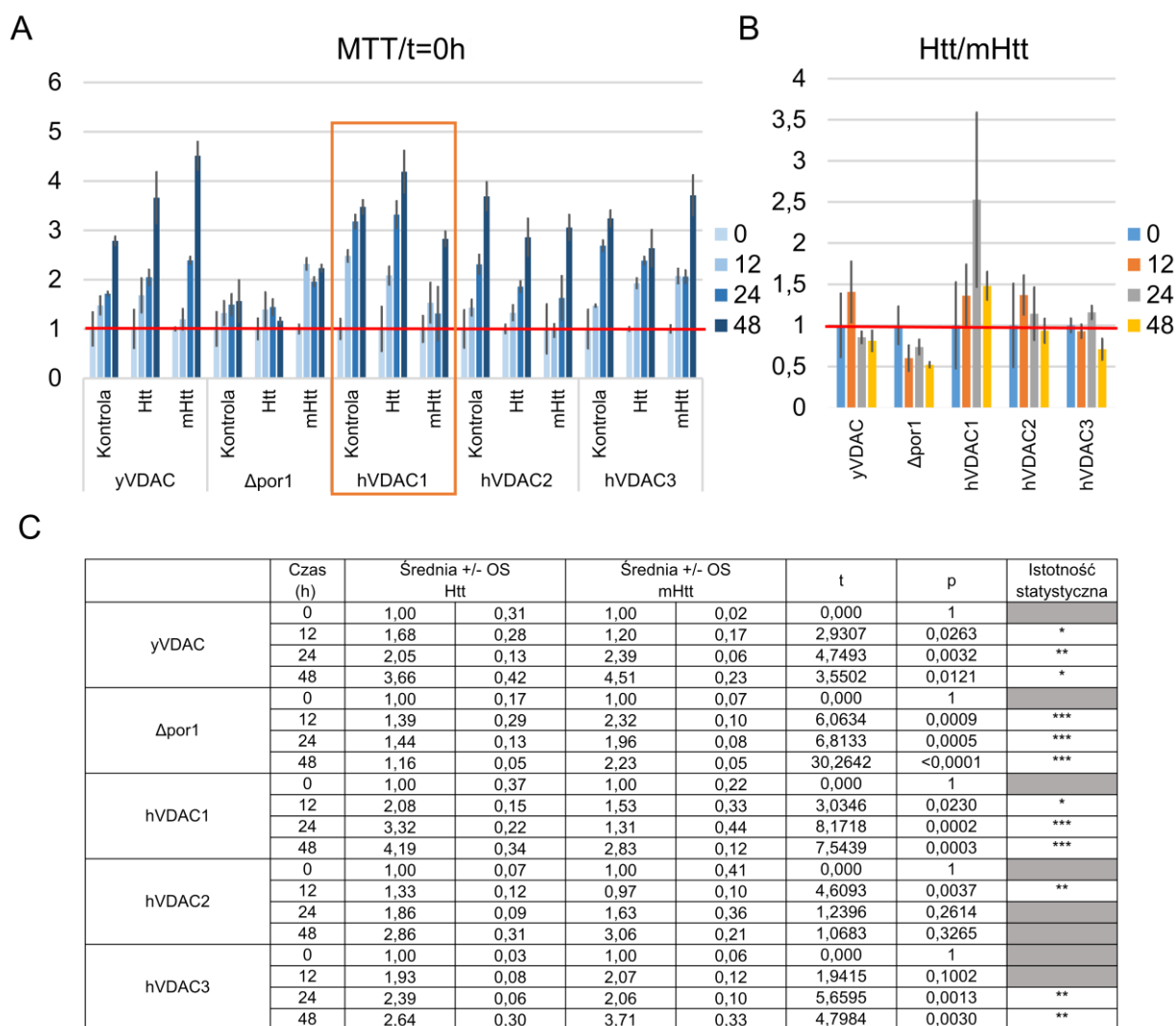
Uzyskane wyniki wskazują na niewielkie zmiany w przeżywalności komórek modelu drożdżowego HD w badanych warunkach. Przy uwzględnieniu czasu trwania ekspresji Htt i mHtt, w przypadku komórek z ekspresją yVDAC i komórek $\Delta por1$ nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w przeżywalności między komórkami bez i z ekspresją Htt lub mHtt. Z kolei, w przypadku komórek z ekspresją hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3 zauważono pewne fluktuacje zachodzące w komórkach kontrolnych i komórkach z ekspresją mHtt, niewystępujące w komórkach z ekspresją Htt (Rys.17A, czerwone ramki). W przypadku porównania efektu Htt i mHtt (proporcja Htt/mHtt; Rys.17B), nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic dla komórek z ekspresją yVDAC i komórek $\Delta por1$ (Rys.17B). Wykazano jednakże istotne statystycznie różnice dla komórek z ekspresją izoform ludzkiego białka VDAC po 12h (hVDAC1) oraz po 12h i 24h (hVDAC2 i hVDAC3) ekspresji Htt i mHtt (Rys.17C). Różnice te wynikają z wyżej wskazanych fluktuacji.



Rysunek 17. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD, hodowanych na pożywce YPG w 28°C. A, Wpływ ekspresji Htt i mHtt, zależnie od czasu jej trwania (dane normalizowano o wartości uzyskane w czasie t=0); B, Stosunek przeżywalności komórek z ekspresją Htt do przeżywalności komórek z ekspresją mHtt (obliczany na podstawie wyników z wykresu A, z uwzględnieniem propagacji błęd); C, Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu B, wykonana dwustronnym testem t-Studenta na podstawie 4 powtórzeń. OS - odchylenie standardowe, t – wartość statystyki t, p – poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

6.2.2.2. Przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w 37°C

Otrzymane dane wskazują w przypadku wszystkich komórek na współwystępujący z czasem trwania ekspresji Htt i mHtt postępujący wzrost wartości wyniku testu MTT (Rys.18), co sugeruje wskazuje na zwiększoną aktywność mitochondriów/przeżywalność komórek. W przypadku komórek $\Delta por1$ efekt ten wydaje się być znacznie słabszy, co wskazuje na jego związek z obecnością funkcjonalnego białka VDAC. W analizie proporcji Htt/mHtt (Rys.18B), zaobserwowano tylko niewielką zmianę, acz w kilku przypadkach istotną statystycznie, w przypadku komórek z ekspresją yVDAC, hVDAC2 i hVDAC3. Natomiast dla komórek z ekspresją hVDAC1 stwierdzono istotny statystycznie wzrost wartości badanego parametru po 12h, 24h i 48h ekspresji Htt, co może odpowiadać zwiększonej przeżywalności w obecności Htt, podczas gdy dla komórek $\Delta por1$ stwierdzono spadek wartości tego parametru, co może odpowiadać zmniejszonej przeżywalności w obecności mHtt. Jednakże, biorąc pod uwagę możliwość modyfikacji wyniku testu MTT przez poziom aktywności mitochondriów, otrzymane wyniki weryfikowano z zastosowaniem płytkowego testu przeżywalności (p.5.8.1) i pomiarów parametrów bioenergetycznych komórek (p.5.9).



Rysunek 18. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD, hodowanych na pożywce YPG w 37°C. A, Wpływ ekspresji Htt i mHtt zależnie od czasu jej trwania (dane normalizowano o wartości uzyskane w czasie t=0); B, Stosunek przeżywalności komórek z ekspresją Htt do przeżywalności komórek z ekspresją mHtt (obliczony na podstawie wyników z wykresu A, z uwzględnieniem propagacji błędu); C; Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu B, wykonana dwustronnym testem t-Studenta na podstawie 4 powtórzeń. OS - odchylenie standardowe, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

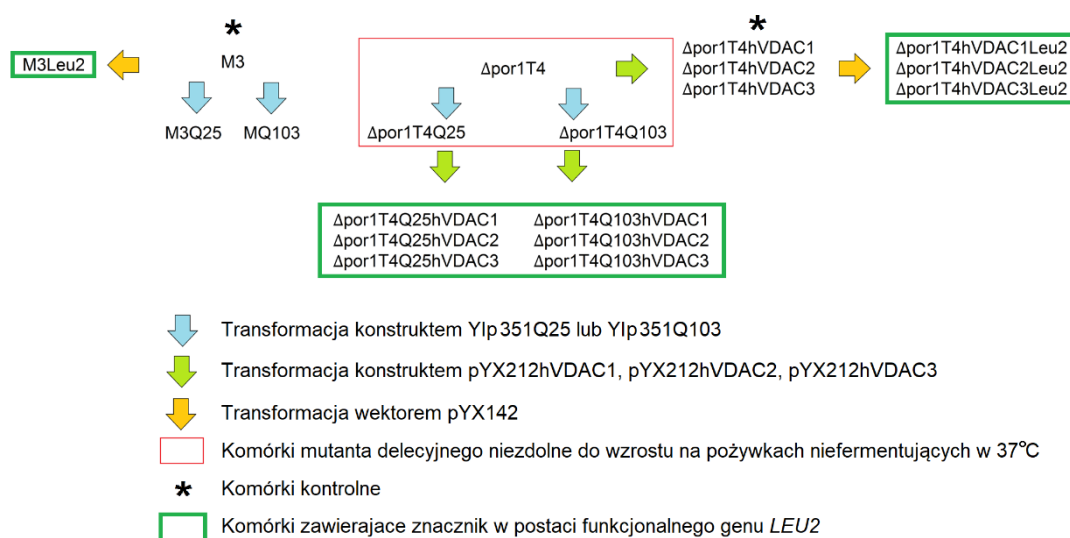
6.2.3. Wpływ znacznika *LEU2* na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD

Ze względu na wstępne eksperymenty obejmujące płytkowe testy przeżywalności (gdzie obserwowano zwiększenie przeżywalności komórek transformowanych konstrukcjami Ylp351Q25 i Ylp351Q103 w stosunku do komórek kontrolnych, w warunkach stresu temperaturowego - dane nieprzedstawione w pracy), jak i możliwość konsumpcji galaktozy przez komórki *S.cerevisiae*, po przeanalizowaniu map zastosowanych konstrukcji zdecydowano się na wprowadzenie dodatkowej kontroli do eksperymentów (tzw. kontroli metabolicznej), stanowiącej szczepę komórek transformowanych plazmidem wprowadzającym funkcjonalny gen *LEU2* jako marker auksotroficzny.

W celu zweryfikowania wpływu obecności genu *LEU2*, pełniącego rolę markera auksotroficznego transformacji komórek drożdży konstrukcjami umożliwiającymi ekspresję Htt i mHtt, skonstruowano kontrolne szczepy drożdży, w których komórkach zachodzi ekspresja tego genu, w warunkach braku ekspresji Htt lub mHtt.

6.2.3.1. Rozszerzenie drożdżowego modelu HD o szczepy zawierające funkcjonalny gen *LEU2*

W celu otrzymania komórek kontrolnych z ekspresją *LEU2*, wykorzystano centromerowy plazmid pYX142 (p.4.1.1.3), który, tak jak w przypadku zastosowanych konstrukcji Ylp351, umożliwia wprowadzenie jednej kopii genu *LEU2* (Rys.19). Zastosowano procedurę opisaną w p.5.3.



Rysunek 19. Schemat ilustrujący rozszerzenie drożdżowego modelu HD o dodatkowe szczepy kontrolne zawierające sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2*. Rysunek 10 zmodyfikowany o komórki transformowane plazmidem pYX142 (oznaczone żółtą strzałką).

6.2.3.2. Selekcja otrzymanych komórek transformantów na pożywkach selekcyjnych

Zastosowanie odpowiedniej selekcji (Tab.6) wiązało się z brakiem lub obecnością w komórkach modelu drożdżowego HD konstruktów YIp351Q25, YIp351Q103 i plazmidu pYX142 (zawierających marker auktotroficzny w postaci funkcjonalnego genu *LEU2*) oraz konstruktów pYX212hVDAC1, pYX212hVDAC2 i pYX212hVDAC3 (zawierających marker auktotroficzny w postaci funkcjonalnego genu *URA3*).

	+URA + LEU	- URA + LEU	- LEU + URA	- URA - LEU
Szczepy	M3 <i>Δpor1T4</i>	<i>Δpor1T4hVDAC1</i> <i>Δpor1T4hVDAC2</i> <i>Δpor1T4hVDAC3</i>	M3Q25 M3Q103 M3Leu2 <i>Δpor1T4Q25</i> <i>Δpor1T4Q103</i>	<i>Δpor1T4Q25hVDAC1</i> <i>Δpor1T4Q103hVDAC1</i> <i>Δpor1T4hVDAC1Leu2</i> <i>Δpor1T4Q25hVDAC2</i> <i>Δpor1T4Q103hVDAC2</i> <i>Δpor1T4hVDAC2Leu2</i> <i>Δpor1T4Q25hVDAC3</i> <i>Δpor1T4Q103hVDAC3</i> <i>Δpor1T4hVDAC3Leu2</i>

Tabela 6. Wymagana suplementacja zastosowanej pożywki selekcyjnej w przypadku komórek drożdżowego modelu HD. Skład pożywki opisano w Materiałach (p.4.2.3). URA - uracyl; LEU - leucyna. Tabela 3 zmodyfikowana o komórki transformowane plazmidem pYX142 (pogrubione).

6.2.3.3. Wpływ znacznika *LEU2* na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w warunkach braku ekspresji Htt i mHtt, badany metodą testu płytkowego

Wpływ znacznika *LEU2* na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD, w warunkach braku ekspresji Htt i mHtt, badano z wykorzystaniem płytkowego testu przeżywalności (p.5.8.1; p.6.2.4). Test ten prowadzono bez czynnika indukującego ekspresję Htt i mHtt. Badania prowadzono w następujących wariantach: (1) hodowla płynna w 28°C na pożywce YPG i następnie przeniesienie na płytki z pożywką YPG, których hodowlę prowadzono przez 4 dni w 28°C lub w 37°C, (2) oraz hodowla płynna w 37°C na pożywce YPG i następnie przeniesienie na płytki z pożywką YPG, których hodowlę prowadzono 4 dni w 37°C.

	28°C - 28°C			28°C - 37°C			37°C - 37°C		
	Htt	mHtt	Kontrola + LEU2	Htt	mHtt	Kontrola + LEU2	Htt	mHtt	Kontrola + LEU2
yVDAC	**	*	***				*		***
hVDAC1		***		***	***	***	***	***	***
hVDAC2			***	***	***	***	*	***	***
hVDAC3			***	***	***	***		***	**

Brak efektu
 Wzrost przeżywalności
 Spadek przeżywalności

Tabela 7. Wpływ znacznika *LEU2* na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w warunkach braku ekspresji Htt i mHtt. Do oceny przeżywalności komórek zastosowano płytkowy test przeżywalności. Przedstawione podsumowanie otrzymano porównując wartości otrzymane dla odpowiednich komórek w porównaniu do komórek kontrolnych tj. niezawierających sekwencji genu *LEU2*. Analizę statystyczną wyników wykonano dwustronnym testem t-Studenta na podstawie 3-5 powtórzeń. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Htt - komórki transformowane konstruktem Ylp351Q25; mHtt - komórki transformowane konstruktem Ylp351Q103; Kontrola+LEU2 - komórki transformowane plazmidem pYX142. 28-28, 28-37, 37-37 (temperatura hodowli w pożywkach płynnych - temperatura hodowli na pożywkach stałych).

Zebrane w tabeli 7 wyniki wskazują, że w przypadku komórek hodowanych w 28°C (28°C-28°C), wprowadzenie funkcjonalnego genu *LEU2* zmniejsza przeżywalność komórek z ekspresją yVDAC i nie ma wpływu lub zmniejsza przeżywalność wybranych wariantów komórek z ekspresją hVDAC1-hVDAC3. W warunkach stresu temperaturowego (28°C-37°C), wprowadzenie znacznika *LEU2*, nie wpływa na przeżywalność komórek z ekspresją yVDAC i zwiększa przeżywalność komórek z ekspresją ludzkich izoform VDAC, z wyjątkiem komórek kontrolnych z ekspresją hVDAC2 ($\Delta por1T4hVDAC2Leu2$). W warunkach długotrwałego stresu temperaturowego (37°C-37°C) efekt ten utrzymuje się tylko w przypadku komórek eksprymujących hVDAC1, podczas gdy efekt obecności *LEU2* w przypadku pozostałych szczepów nie jest jednorodny.

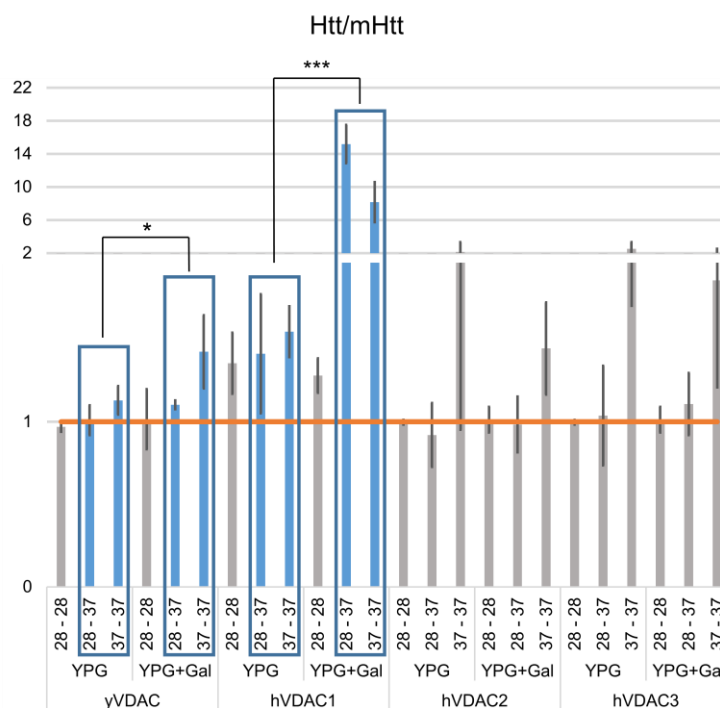
Zatem, zastosowana temperatura hodowli i ekspresjonowane białko VDAC mogą mieć znaczenie dla wpływu obecności znacznika auktroficznego *LEU2* na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD. Dlatego w dalszych badaniach stosowano drożdżowy model HD w wariantcie rozszerzonym.

6.2.4. Przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD w warunkach ekspresji Htt i mHtt, badana metodą testu płytkowego

Przeżywalność komórek rozszerzonego wariantu drożdżowego modelu HD badano stosując test płytkowy (p.5.8.1) na pożywce YPG (brak ekspresji Htt i mHtt) i YPG+Gal (uruchomienie ekspresji Htt i mHtt). Otrzymane wyniki wykorzystano do wyznaczenia ilorazu przeżywalności w warunkach braku ekspresji Htt i mHtt (YPG) i ekspresji tych białek (YPG+Gal). Badania prowadzono w następujących wariantach: (1) hodowla płynna w 28°C na pożywce YPG i następnie przeniesienie na płytki z pożywką YPG lub YPG+Gal, których hodowlę prowadzono przez 4 dni w 28°C lub w 37°C, (2) oraz hodowla płynna w 37°C na pożywce YPG i następnie przeniesienie na płytki z pożywką YPG lub YPG+Gal, których hodowlę prowadzono 4 dni w 37°C.

Jak pokazano na rysunku 21, obliczony wskaźnik przeżywalności komórek w postaci ilorazu Htt/mHtt ulega istotnie statystycznej zmianie tylko w przypadku komórek z ekspresją yVDAC i hVDAC1. Sugeruje to, że obecność Htt w tych komórkach może zwiększać ich przeżywalność (a mHtt zmniejszać) w warunkach pojawiającego się (Rys.20.A.28-37) i utrzymującego się stresu temperaturowego (Rys.20.A.37-37). W przypadku komórek z ekspresją hVDAC2 i hVDAC3 nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w przeżywalności komórek po indukcji ekspresji Htt i mHtt. Aby dokładnie określić kierunek zmian w przeżywalności zachodzących w warunkach ekspresji Htt i mHtt w analizach wyników testu płytkowego wykorzystano dane otrzymane dla komórek kontrolnych. W przypadku komórek z ekspresją yVDAC1 i hVDAC1 zostały one opisane w podrozdziałach 6.2.4.1 i 6.2.4.2, podczas gdy dane dotyczące komórek pozostałych komórek przedstawiono w Załączniku (Rys.36-37).

A



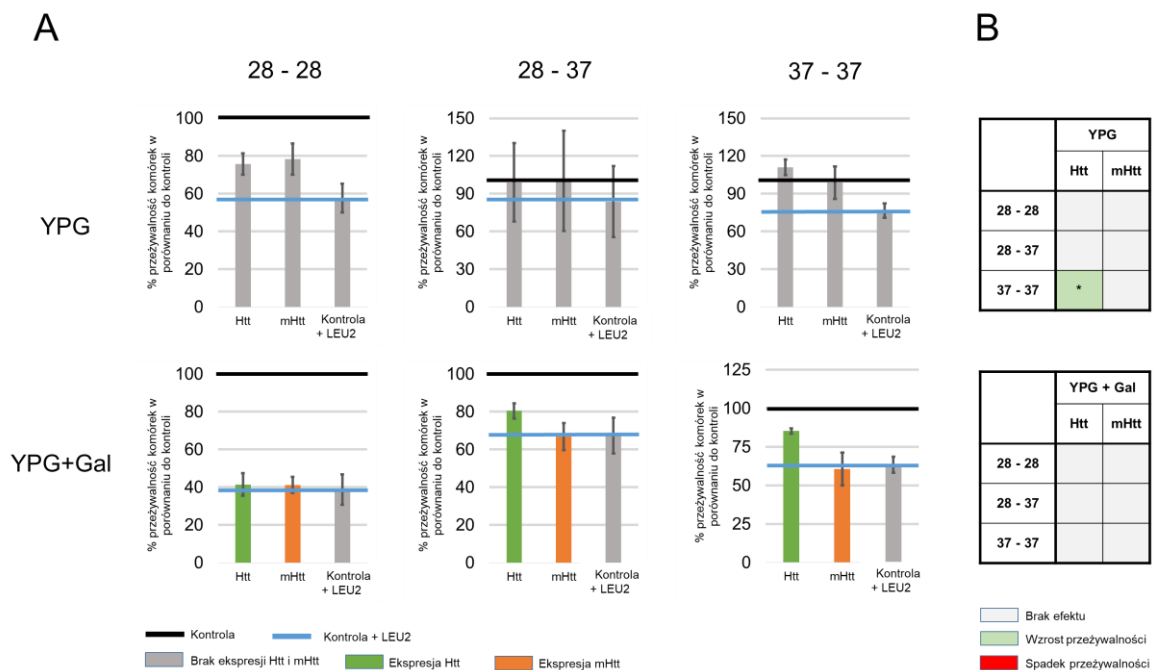
B

		YPG		YPG+Gal					
		Średnia	OS	Średnia	OS	Różnica	t	p	Istotność statystyczna
yVDAC	28-28	1,00	0,03	1,02	0,18	0,02	0,2451	0,8126	
	28-37	1,01	0,09	1,1	0,03	0,09	2,51	0,0274	*
	37-37	1,13	0,09	1,42	0,22	0,29	2,7281	0,0259	*
hVDAC1	28-28	1,35	0,19	1,28	0,10	-0,07	0,7290	0,4868	
	28-37	1,41	0,36	15,18	2,32	13,77	13,1149	<0,001	***
	37-37	1,55	0,15	8,16	2,42	6,61	6,0959	<0,001	***
hVDAC2	28-28	1,00	0,01	1,01	0,08	0,02	0,2774	0,7885	
	28-37	0,92	0,19	0,98	0,17	0,06	0,5452	0,6226	
	37-37	2,13	1,18	1,44	0,28	-0,69	1,2722	0,2390	
hVDAC3	28-28	1,00	0,01	1,01	0,08	0,02	0,2774	0,7885	
	28-37	1,04	0,30	1,11	0,19	0,07	0,4408	0,6710	
	37-37	2,51	0,81	1,86	0,65	-0,66	1,3995	0,1992	

Rysunek 20. Przeżywalność komórek rozszerzonego wariantu drożdżowego modelu HD w warunkach ekspresji Htt i mHtt. Przeżywalność wyznaczano w oparciu o wyniki płytkowego testu przeżywalności, przeprowadzonego w temperaturze 28 i 37°C na pożywce YPG (brak ekspresji Htt i mHtt) i pożywce YPG + Gal (ekspresja Htt i mHtt). A - Iloraz efektu Htt i mHtt na przeżywalność komórek. Wyniki równe 1 (pomarańczowa linia) oznaczają brak różnic pomiędzy średnimi; B - Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu A, wykonana dwustronnym testem t-Studenta na podstawie 3-5 powtórzeń. OS - odchylenie standardowe, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi. 28-28, 28-37, 37-37 (temperatura hodowli w pożywkach płynnych - temperatura hodowli na pożywkach stałych).

6.2.4.1. Przeżywalność komórek z ekspresją yVDAC1 w warunkach ekspresji Htt i mHtt badana metodą testu płytkowego.

W płytkowym teście przeżywalności zastosowano dwa szczepy komórek kontrolnych, tj. komórki szczepu dzikiego M3 (Kontrola) i M3Leu2 (Kontrola+LEU2), uzyskanego w wyniku transformacji wektorem pYX142, zawierającym gen *LEU2* (p.6.2.3.1). Analizę otrzymanych wyników przedstawiono na rysunku 21.

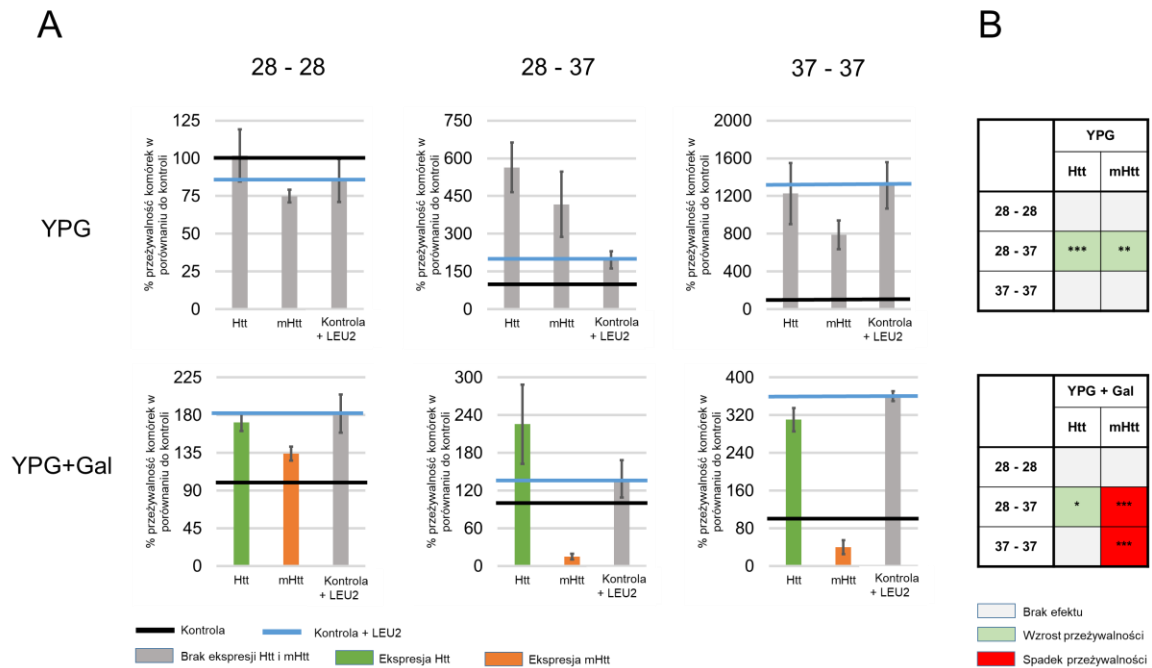


Rysunek 21. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek z ekspresją yVDAC w warunkach braku ekspresji (YPG) oraz ekspresji Htt i mHtt (YPG+Gal). A - porównanie wyników z otrzymanymi dla komórek bez wprowadzonego marera *LEU2*, przedstawione jako % przeżywalności komórek; B - Analiza statystyczna otrzymanych wyników, wykonana dwustronnym testem t-Studenta na podstawie 3-5 powtórzeń. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; * przy $p < 0,001$. 28-28, 28-37, 37-37 (temperatura hodowli w pożywkach płynnych – temperatura hodowli na pożywkach stałych).**

Mimo, iż dla komórek z ekspresją yVDAC1 zaobserwowano nieznacznie wyższą wartość ilorazu Htt/mHtt w warunkach stresu temperaturowego (Rys.21), powyższa analiza obejmująca zastosowanie komórek szczepów kontrolnych, nie wykazała wpływu obecności ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność tych komórek w warunkach braku (28-28), jak i pojawiającego się (28-37) oraz utrzymującego się stresu temperaturowego (37-37). Jest to zapewne spowodowane równoczesnymi zmianami w przeżywalności komórek, które zachodzą w zastosowanych warunkach w przypadku komórek kontrolnych.

6.2.4.2. Przeżywalność komórek z ekspresją hVDAC1 w warunkach ekspresji Htt i mHtt badana metodą testu płytkowego.

W płytkowym teście przeżywalności zastosowano dwa szczepy komórek kontrolnych, tj. komórki szczepu $\Delta por1T4$ hVDAC1 (Kontrola) i $\Delta por1T4$ hVDAC1Leu2 (Kontrola+LEU2), uzyskanego w wyniku transformacji wektorem pYX142, zawierającym gen *LEU2* (p.6.2.3.1). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 22.



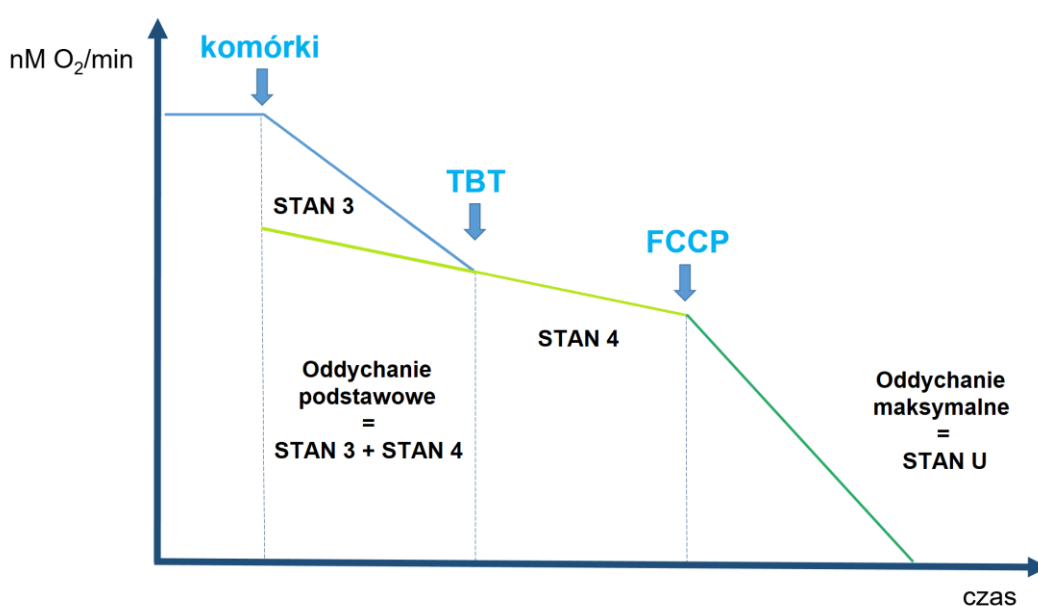
Rysunek 22. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek z ekspresją hVDAC1 w warunkach braku ekspresji (YPG) oraz ekspresji Htt i mHtt (YPG+Gal). A - porównanie wyników z otrzymanymi dla komórek bez wprowadzonego markera *LEU2*, przedstawione, jako % przeżywalności komórek; B - Analiza statystyczna otrzymanych wyników, wykonana dwustronnym testem t-Studenta na podstawie 3-5 powtórzeń. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; * przy $p < 0,001$. 28-28, 28-37, 37-37, (temperatura hodowli w pożywkach płynnych – temperatura hodowli na pożywkach stałych).**

Powyższa analiza wykazała negatywny wpływ ekspresji mHtt na przeżywalność komórek ekspresyjujących hVDAC1 w warunkach pojawiającego się (28-37) i utrzymującego się stresu temperaturowego (37-37). Efektu tego nie obserwuje się natomiast w warunkach braku stresu temperaturowego (28-28).

6.2.5. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek drożdżowego modelu HD

Aby sprawdzić czy zmiany przeżywalności lub ich brak w przypadku komórek drożdżowego modelu HD hodowanych w 37°C mogą być związane z funkcjonowaniem mitochondriów postanowiono wyznaczyć dla tych komórek parametry bioenergetyczne opisujące stan funkcjonalny mitochondriów w komórkach. Analizę parametrów bioenergetycznych w warunkach ekspresji Htt i mHtt w 37°C wykonano za pomocą pomiarów oksygraficznych (p.5.9), dla: (1) tzw. efektu bezpośredniego, tj. różnych czasów trwania ekspresji tych białek, tj. 12h, 24h i 48h (p.5.6.1.2.1) i (2) tzw. efektu pośredniego, tj. po 24h hodowli w pożywce pozbawionej czynnika indukującego ekspresję Htt i mHtt, następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt (p.5.6.1.2.2). Schemat prowadzonych pomiarów oksygraficznych przedstawiono na rysunku 23.

Obliczone szybkości zużycia tlenu wykorzystano do wyznaczenia wartości następujących parametrów bioenergetycznych: (1) potencjalne sprzężenie komórek (PS), (2) aktualne sprzężenie komórek (AS) i (3) udział oddychania podstawowego w oddychaniu maksymalnym (Op/O_{max}) (p.5.9). PS odpowiada ilorazowi szybkości zużycia tlenu w stanie U (po dodaniu FCCP) i szybkości zużycia tlenu w stanie 4 (po dodaniu TBT). AS odpowiada udziałowi stanu 3 (obliczanego jako różnica Op i szybkości zużycia tlenu w stanie 4) w Op . Op/O_{max} , odpowiada procentowemu udziałowi Op w O_{max} i obliczany jest jako iloraz szybkości zużycia tlenu w Op i szybkości zużycia tlenu w stanie U.



Rysunek 23. Schemat pomiarów oksygraficznych.

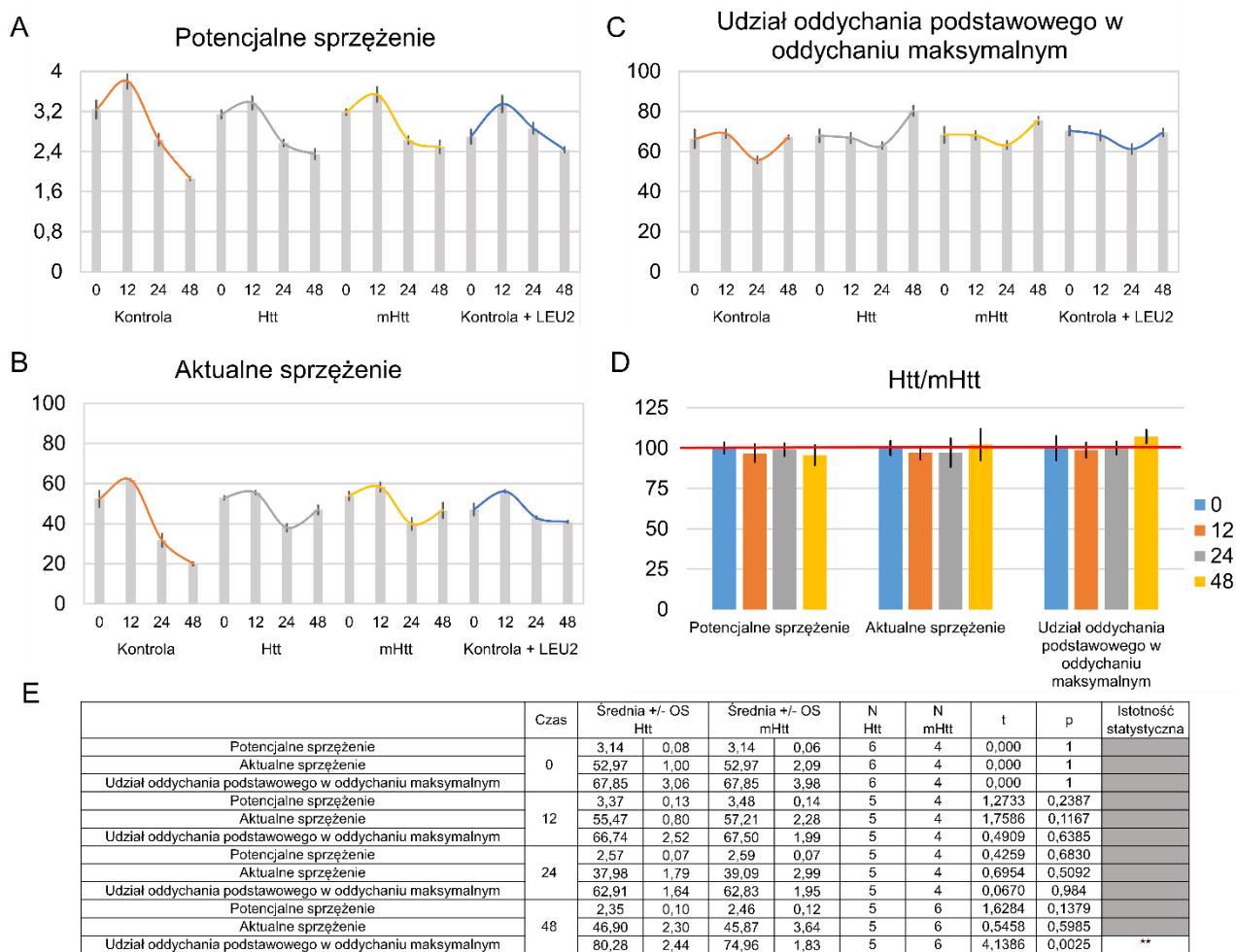
6.2.5.1. Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją yVDAC1

W poniższej analizie badano wpływ ekspresji Htt i mHtt prowadzonej w 37°C, na parametry bioenergetyczne komórek szczepów M3Q25 i M3Q103, przy zastosowaniu dwóch szczepów komórek kontrolnych, tj. komórek szczepu dzikiego M3 (Kontrola) i komórek szczepu M3Leu2, uzyskanych w wyniku transformacji plazmidem pYX142, zawierającym sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2* (Kontrola+LEU2). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 24.

Analiza wartości PS (Rys.24A), a także AS (Rys.24B), przy braku ekspresji Htt i mHtt ($t = 0h$) i po 12h, 24h i 48h od momentu indukcji (podanie galaktozy), wykazała istnienie fluktuacyjnych zmian w wartościach tych parametrów o podobnym przebiegu w badanych komórkach, przy czym zaobserwowano istotne zmniejszenie wartości tych parametrów w komórkach szczepu M3 po 48h od podania galaktozy. Analiza wartości Op/Omax (Rys.24C) nie wykazała znaczących różnic dla badanych komórek.

Zastosowanie ilorazu wartości analizowanych parametrów obliczonych dla komórek z ekspresją Htt i z ekspresją mHtt (po normalizacji o współczynnik Htt/mHtt mierzony w czasie $=0h$) (Rys.24D), pozwala na stwierdzenie braku różnic między komórkami szczepów M3Q25 i M3Q103 (Rys.24E), z wyjątkiem nieznacznego wzrostu ilorazu wartości Op/Omax w komórkach M3Q25 po ekspresji Htt trwającej 48h.

Należy więc uznać, iż ekspresja Htt i mHtt w warunkach szoku temperaturowego, tj. w 37°C, nie wywiera bezpośredniego wpływu na badane parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją yVDAC1.



Rysunek 24. Analiza parametrów bioenergetycznych mierzonych dla komórek z ekspresją yVDAC1, w warunkach różnych czasów trwania ekspresji Htt i mHtt. Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu D, pokazana w części E, wykonana została dwustronnym testem t-Studenta. OS - odchylenie standardowe, N – liczba pomiarów, t – wartość statystyki t, p – poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

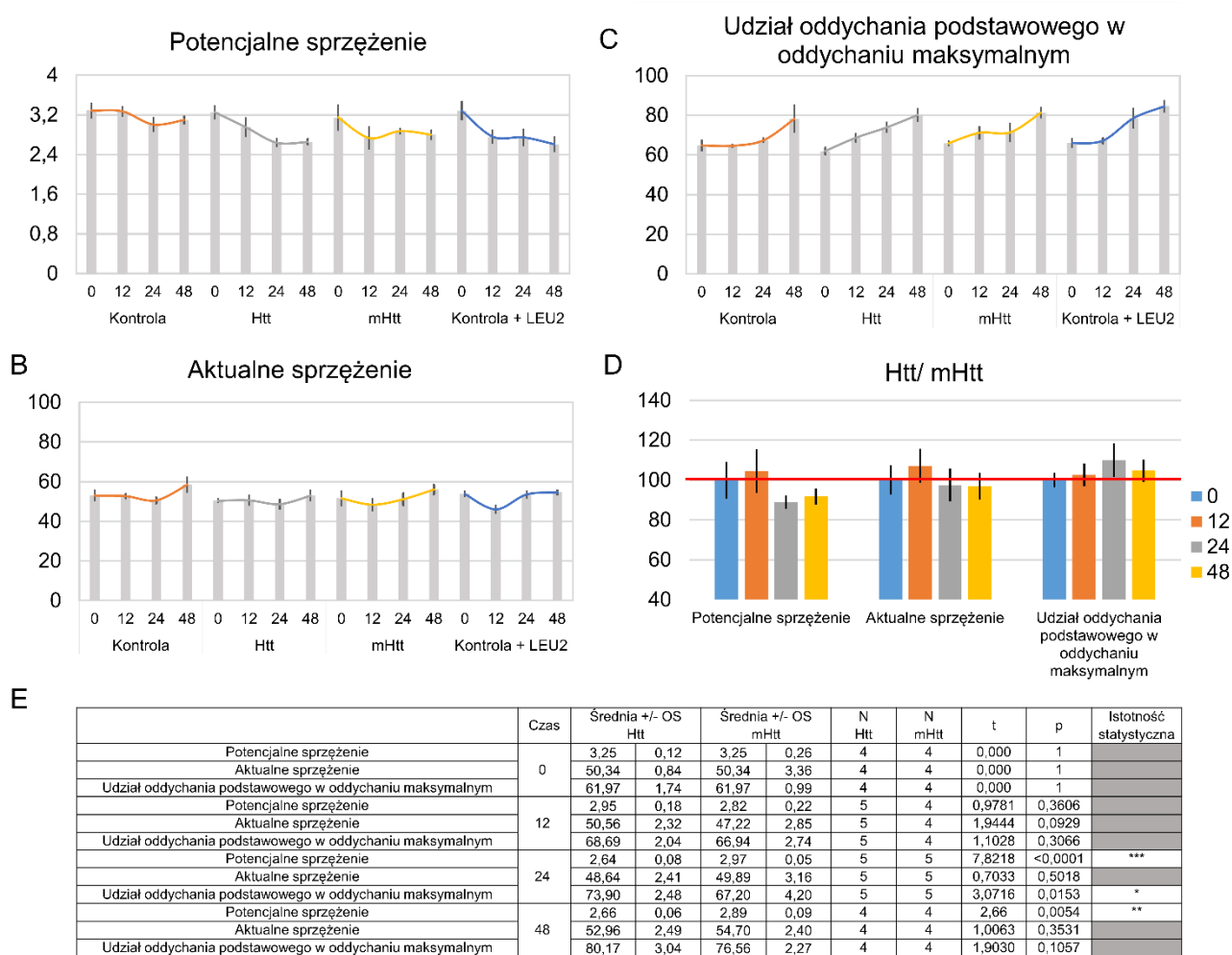
6.2.5.2. Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją yVDAC1

W poniższej analizie badano wpływ ekspresji Htt i mHtt prowadzonej w 37°C na parametry bioenergetyczne komórek szczepów M3Q25 i M3Q103 po 24h hodowli w pożywce YPG, w 37°C, następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt (p.5.6.1.2.2) i przy zastosowaniu dwóch szczepów komórek kontrolnych, tj. komórek szczepu dzikiego M3 (Kontrola) i komórek szczepu M3Leu2, uzyskanych w wyniku transformacji plazmidem pYX142, zawierającym sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2* (Kontrola+LEU2). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 25.

Analiza wartości PS (Rys.25A) przy braku ekspresji Htt i mHtt ($t=0h$) i po 12h, 24h i 48h od momentu indukcji (tj. podania galaktozy), wykazała postępujące w czasie, niewielkie zmniejszenie wartości tego parametru dla komórek szczepów M3Q25, M3Q103 i M3Leu2 oraz zmniejszenie tego efektu w komórkach szczepu M3. Nie zaobserwowano zmian w wartości AS (Rys.25B), natomiast w przypadku Op/Omax stwierdzono postępujące w czasie zwiększenie wartości dla wszystkich badanych komórek (Rys.25C).

Zastosowanie ilorazu wartości analizowanych parametrów obliczonych dla komórek z ekspresją Htt i z ekspresją mHtt (po normalizacji o współczynnik Htt/mHtt mierzony w czasie $=0h$) (Rys.25D), pozwala stwierdzić, iż jedyne różnice w wartościach parametrów bioenergetycznych obserwowane między komórkami z ekspresją Htt i mHtt dotyczą PS po 24 i 48h trwania ekspresji. Wynikają one z niewielkiego zwiększenia wartości PS w komórkach z ekspresją mHtt w stosunku do komórek z ekspresją Htt (Rys.25E).

Należy więc uznać, iż nie zaobserwowano istotnego pośredniego wpływu ekspresji Htt i mHtt, w warunkach szoku temperaturowego, tj. w 37°C, na badane parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją yVDAC1.



Rysunek 25. Analiza parametrów bioenergetycznych mierzonych dla komórek drożdży z ekspresją yVDAC1, po 24h hodowli w pożywce YPG następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt. Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu D, pokazana w części E, została wykonana dwustronnym testem t-Studenta. OS - odchylenie standardowe, N - liczba pomiarów, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

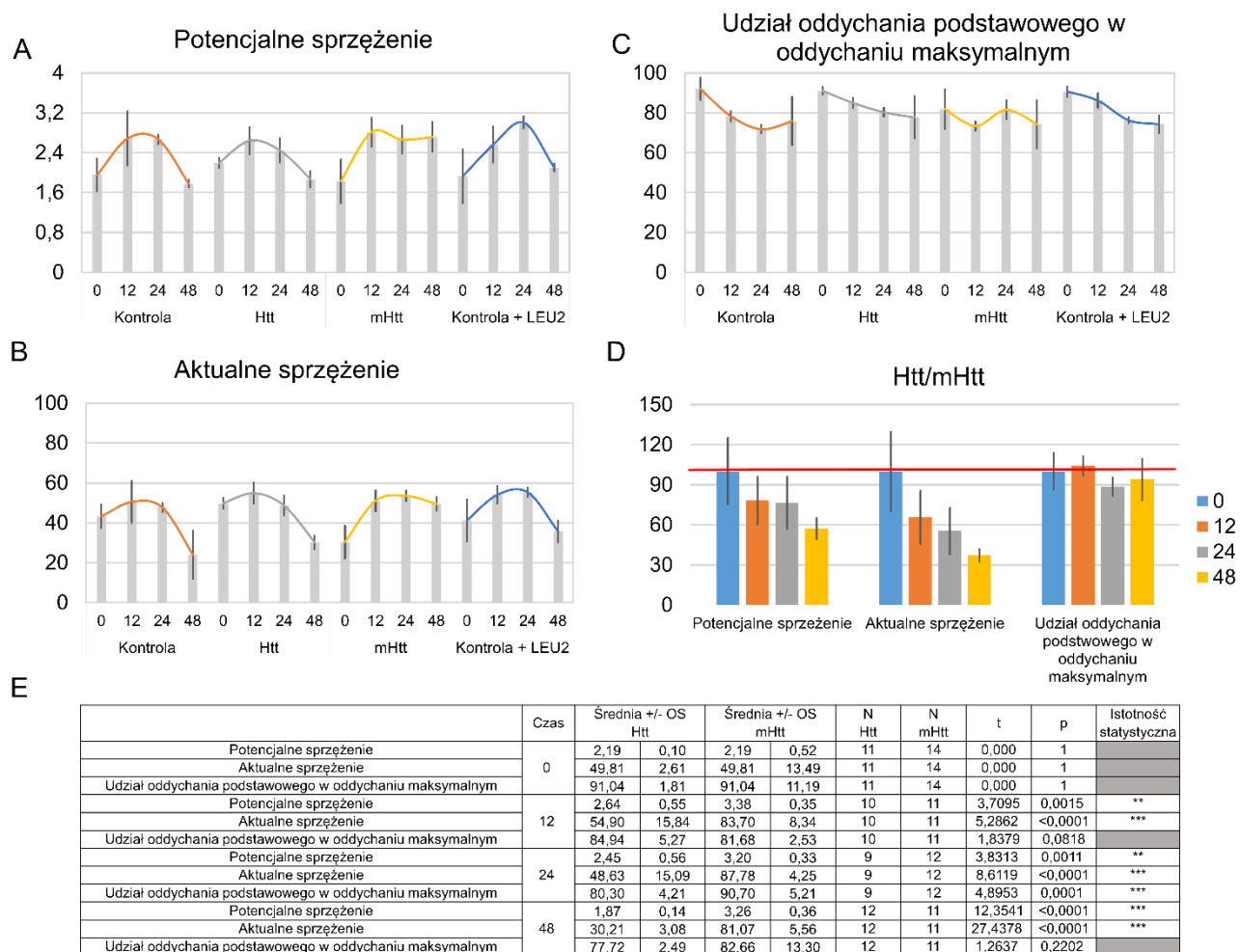
6.2.5.3. Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC1

W poniższej analizie badano wpływ ekspresji Htt i mHtt prowadzonej w 37°C, na parametry bioenergetyczne komórek szczepów $\Delta por1T4Q25hVDAC1$ i $\Delta por1T4Q103hVDAC1$, przy zastosowaniu dwóch szczepów komórek kontrolnych, tj. komórek szczepu $\Delta por1T4 hVDAC1$ (Kontrola) i komórek szczepu $\Delta por1T4 hVDAC1Leu2$, uzyskanych w wyniku transformacji plazmidem pYX142, zawierającym sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2* (Kontrola+LEU2). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 26.

Analiza wartości PS (Rys.26A), a także AS (Rys.26B), przy braku ekspresji Htt i mHtt ($t=0h$) i po 12h, 24h i 48h ekspresji tych białek wykazała postępujące w czasie obniżenie wartości tych parametrów dla komórek szczepów $\Delta por1T4VDAC1$, $\Delta por1T4hVDAC1Leu2$ i $\Delta por1T4Q25hVDAC1$ oraz ich stabilizację w komórkach szczepu $\Delta por1T4Q103hVDAC1$. Analiza wartości Op/Omax (Rys.26C) wykazała postępujące w czasie niewielkie zmniejszenie wartości tego parametru dla wszystkich badanych komórek.

Zastosowanie ilorazu wartości analizowanych parametrów obliczonych dla komórek z ekspresją Htt i z ekspresją mHtt (po normalizacji o współczynnik Htt/mHtt mierzony w czasie $=0h$) (Rys.26D), pozwala na stwierdzenie zmian zachodzących w czasie. Dotyczą one AS i PS, ale nie Op/Omax. Wynikają one ze zwiększenia wartości parametrów PS i AS dla komórek z ekspresją mHtt i braku tych zmian w przypadku Op/Omax (Rys.26E).

Należy więc uznać, iż zaobserwowano istotny bezpośredni wpływ ekspresji mHtt w warunkach szoku temperaturowego, tj. w 37°C, na badane parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC1.



Rysunek 26. Analiza parametrów bioenergetycznych mierzonych dla komórek z ekspresją hVDAC1, w warunkach różnych czasów trwania ekspresji Htt i mHtt. Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu D, pokazana w części E, została wykonana dwustronnym testem t-Studenta. OS - odchylenie standardowe, N - liczba pomiarów, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

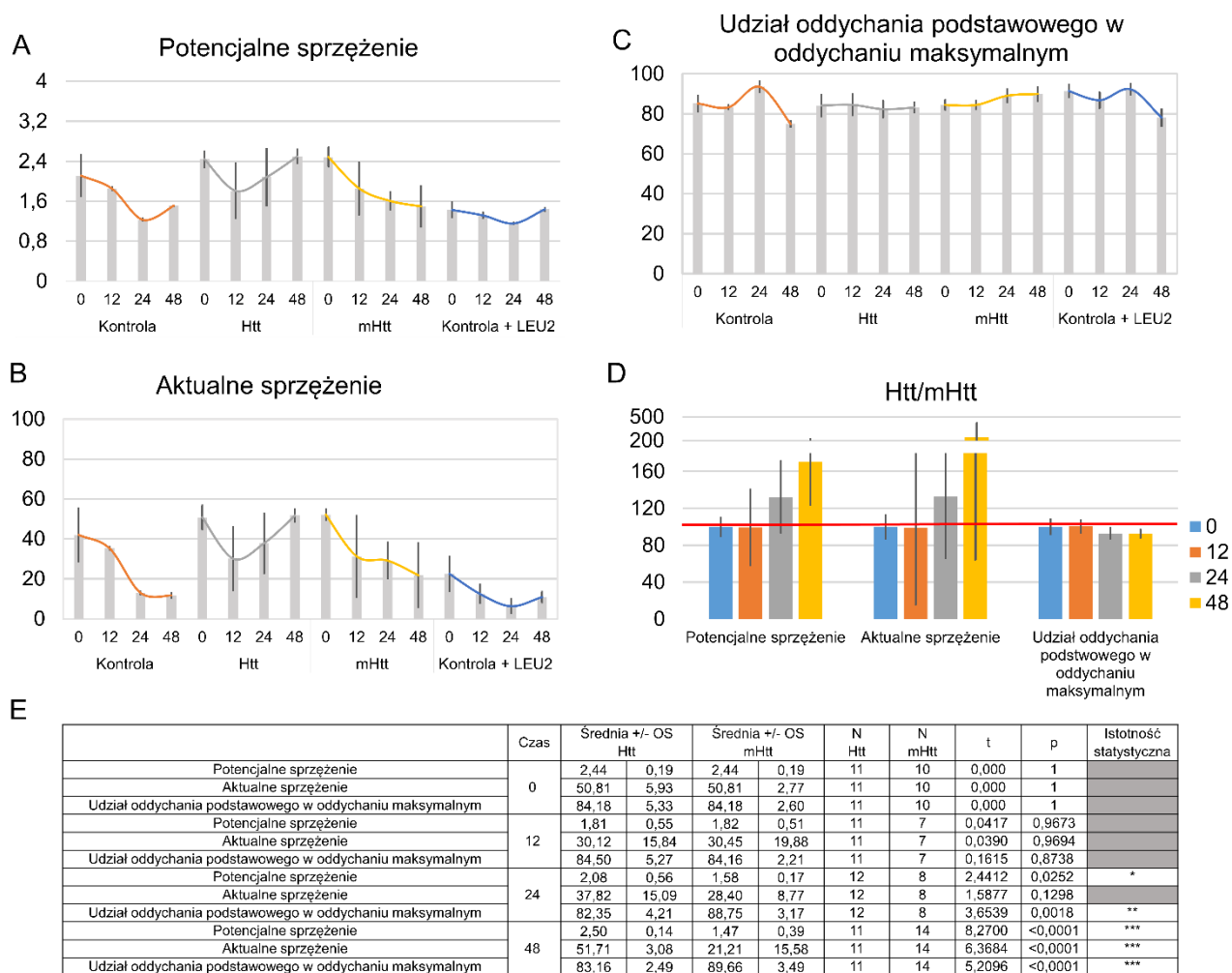
6.2.5.4. Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek drożdży z ekspresją hVDAC1

W poniższej analizie badano wpływ ekspresji Htt i mHtt prowadzonej w 37°C na parametry bioenergetyczne komórek szczepów $\Delta por1T4Q25hVDAC1$ i $\Delta por1T4Q103hVDAC1$, po 24h hodowli w pożywce YPG, w 37°C, następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt (p.5.6.1.2.2) i przy zastosowaniu dwóch szczepów komórek kontrolnych, tj. komórek szczepu dzikiego $\Delta por1T4 hVDAC1$ (Kontrola) i komórek szczepu $\Delta por1T4hVDAC1Leu2$, uzyskanych w wyniku transformacji plazmidem pYX142, zawierającym sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2* (Kontrola+LEU2). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 27.

Analiza wartości PS (Rys.27A), a także AS (Rys.27B), przy braku ekspresji Htt i mHtt (t=0h) i po 12h, 24h i 48h od momentu indukcji (tj. podania galaktozy) wykazała postępujące w czasie, zmniejszenie wartości tych parametrów w przypadku komórek szczepów $\Delta por1T4hVDAC1$, $\Delta por1T4hVDAC1Leu2$ i $\Delta por1T4Q103hVDAC1$ oraz brak tego efektu w przypadku komórek szczepu $\Delta por1T4Q25hVDAC1$. Nie zaobserwowano zmian wartości Op/Omax dla komórek z ekspresją Htt i mHtt oraz niewielkie fluktuacje wartości tego parametru dla komórek kontrolnych tj. $\Delta por1T4hVDAC1$ i $\Delta por1T4hVDAC1Leu2$ (Rys.27C).

Zastosowanie ilorazu wartości analizowanych parametrów obliczonych dla komórek z ekspresją Htt i z ekspresją mHtt (po normalizacji o współczynnik Htt/mHtt mierzony w czasie =0h) (Rys.27D) pozwala stwierdzić zmiany dotyczące PS i AS. Wynikają one z narastającego w czasie zwiększenia wartości parametrów PS i AS w komórkach z ekspresją Htt. W przypadku Op/Omax różnic nie stwierdzono (Rys.27E).

Należy więc uznać, iż zaobserwowano istotny pośredni wpływ ekspresji Htt, w warunkach szoku temperaturowego, tj. w 37°C, na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC1.



Rysunek 27. Analiza parametrów bioenergetycznych mierzonych dla komórek drożdży z ekspresją hVDAC1, po 24h hodowli w pożywce YPG następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt. Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu D, pokazana w części E, wykonana została dwustronnym testem t-Studenta. OS - odchylenie standardowe, N - liczba pomiarów, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

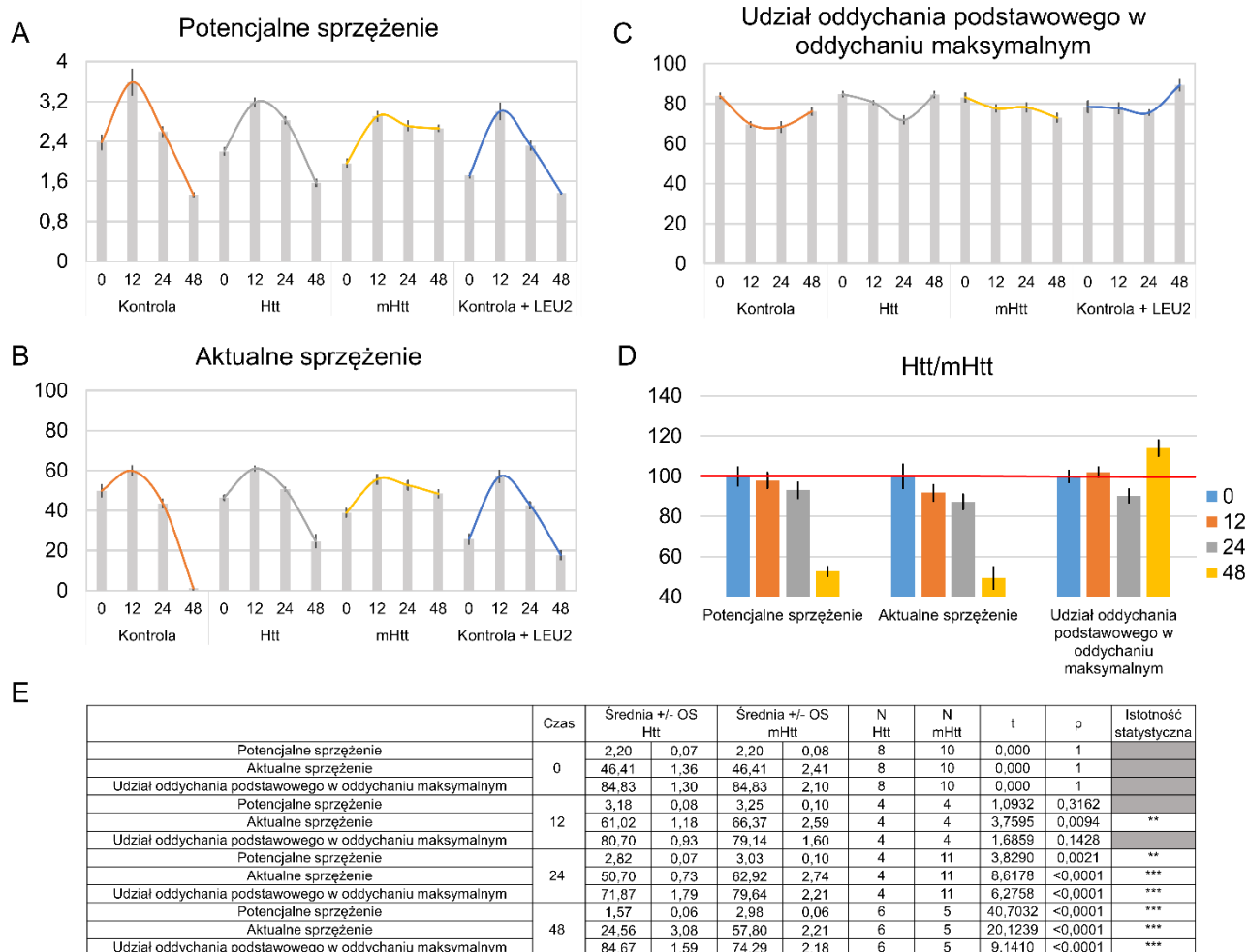
6.2.5.5. Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC2

W poniższej analizie badano wpływ ekspresji Htt i mHtt prowadzonej w 37°C, na parametry bioenergetyczne komórek szczepów $\Delta por1T4Q25hVDAC2$ i $\Delta por1T4Q103hVDAC2$, przy zastosowaniu dwóch szczepów komórek kontrolnych, tj. komórek szczepu $\Delta por1T4hVDAC2$ (Kontrola) i komórek szczepu $\Delta por1T4hVDAC2Leu2$, uzyskanych w wyniku transformacji plazmidem pYX142, zawierającym sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2* (Kontrola+LEU2). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 28.

Analiza wartości PS (Rys.28A), a także AS (Rys.28B), przy braku ekspresji Htt i mHtt ($t=0h$) i po 12h, 24h i 48h ekspresji tych białek wykazała ich początkowy wzrost po 12h hodowli i następnie postępujące w czasie obniżenie dla komórek szczepów $\Delta por1T4VDAC2$, $\Delta por1T4Q25hVDAC2$ i $\Delta por1T4hVDAC2Leu2$ oraz brak tego efektu dla komórek szczepu $\Delta por1T4Q103hVDAC2$ po 24h i 48h ekspresji mHtt. Analiza wartości Op/Omax (Rys.28C) wykazała niewielkie zmiany wartości tego parametru dla wszystkich badanych komórek w różnych czasach od momentu indukcji ekspresji Htt i mHtt.

Zastosowanie ilorazu wartości analizowanych parametrów obliczonych dla komórek z ekspresją Htt i z ekspresją mHtt (po normalizacji o współczynnik Htt/mHtt mierzony w czasie $=0h$ (Rys.28D), pozwala na stwierdzenie zmian zachodzących w czasie. Obserwowano narastające w czasie zwiększenie ilorazu Htt/mHtt dla parametrów PS i AS w komórkach z ekspresją mHtt, przy czym zmiany te są istotne statystycznie począwszy od 24h w przypadku wartości PS i 12h w przypadku AS. W przypadku Op/Omax obserwuje się zmniejszenie wartości tego wskaźnika po 24h i zwiększenie po 48h, jednakże zmiany te są subtelne, acz istotne statystyczne (po 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt) (Rys.28E).

Należy więc uznać, iż zaobserwowano istotny bezpośredni wpływ ekspresji mHtt, w warunkach szoku temperaturowego, tj. w 37°C, na badane parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC2.



Rysunek 28. Analiza parametrów bioenergetycznych mierzonych dla komórek z ekspresją hVDAC2, w warunkach różnych czasów trwania ekspresji Htt i mHtt. Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu D, pokazana w części E, została wykonana dwustronnym testem t-Studenta. OS - odchylenie standardowe, N - liczba pomiarów, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

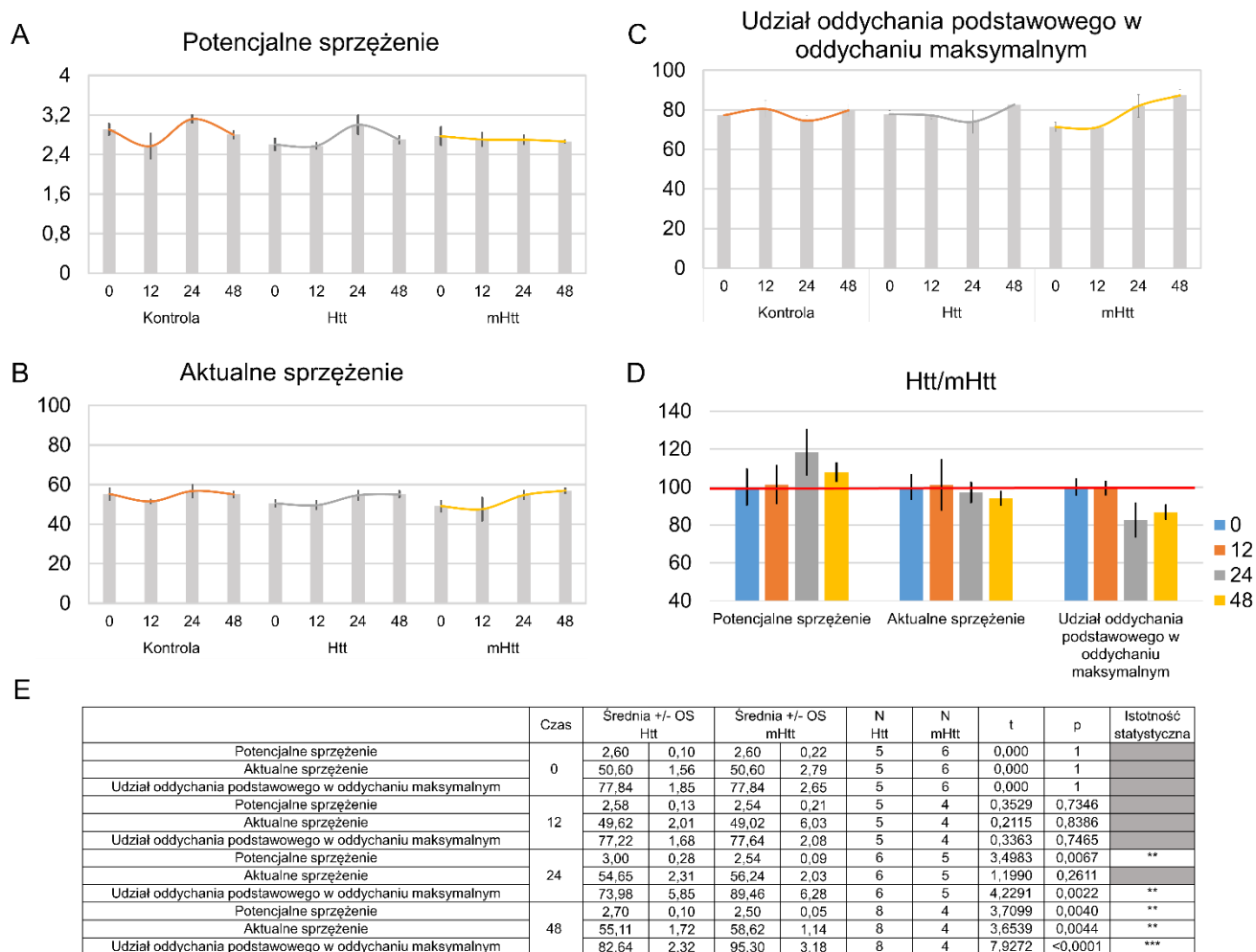
6.2.5.6. Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC2

W poniższej analizie badano wpływ ekspresji Htt i mHtt prowadzonej w 37°C na parametry bioenergetyczne komórek szczepów $\Delta por1T4Q25hVDAC2$ i $\Delta por1T4Q103hVDAC2$, po 24h hodowli w pożywce YPG, w 37°C, następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt (p.5.6.1.2.2) i przy zastosowaniu tylko jednego szczepu komórek kontrolnych, tj. komórek szczepu $\Delta por1T4hVDAC2$ (Kontrola). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 29. Komórki szczepu $\Delta por1T4hVDAC2Leu2$, stanowiące kontrolę metaboliczną, po 24h hodowli na pożywce YPG, w 37°C, wykazywały znacznie obniżoną szybkość zużycia tlenu, co uniemożliwiło przeprowadzenie rzetelnej analizy ich parametrów bioenergetycznych.

Analiza wartości PS (Rys.29A), a także AS (Rys.29B), przy braku ekspresji Htt i mHtt (t=0h) i po 12h, 24h i 48h od momentu jej indukcji wykazała fluktuacyjne zmiany wartości tych parametrów, zachodzące dla komórek szczepów $\Delta por1T4hVDAC2$ i $\Delta por1T4Q25hVDAC2$ oraz brak tego efektu w komórkach $\Delta por1T4Q103hVDAC2$. Nie zaobserwowano zmian w wartości Op/Omax (Rys.29C) dla komórek szczepów $\Delta por1T4hVDAC2$ i $\Delta por1T4Q25hVDAC2$, ale stwierdzono niewielki wzrost wartości tego parametru w komórkach $\Delta por1T4Q103hVDAC2$ po 24h i 48h ekspresji mHtt.

Zastosowanie ilorazu wartości analizowanych parametrów obliczonych dla komórek z ekspresją Htt i z ekspresją mHtt (po normalizacji o współczynnik Htt/mHtt mierzony w czasie =0h) (Rys.29D), wskazuje na brak różnic w przypadku PS i AS. W przypadku Op/Omax wartość analizowanego ilorazu maleje po 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt, co wynika ze zwiększenia wartości Op/Omax w komórkach z ekspresją mHtt. (Rys.29E).

Jednakże, należy zauważyć, iż obserwowane zmiany są subtelne, acz w niektórych przypadkach istotne statystycznie, co nie pozwala jednoznacznie wykluczyć pośredniego wpływu ekspresji Htt i mHtt, w warunkach szoku temperaturowego, tj. w 37°C, na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC2.



Rysunek 29. Analiza parametrów bioenergetycznych mierzonych dla komórek drożdży z ekspresją hVDAC2, po 24h hodowli w pożywce YPG następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt. Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu D, pokazana w części E, została wykonana dwustronnym testem t-Studenta. OS - odchylenie standardowe, N - liczba pomiarów, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

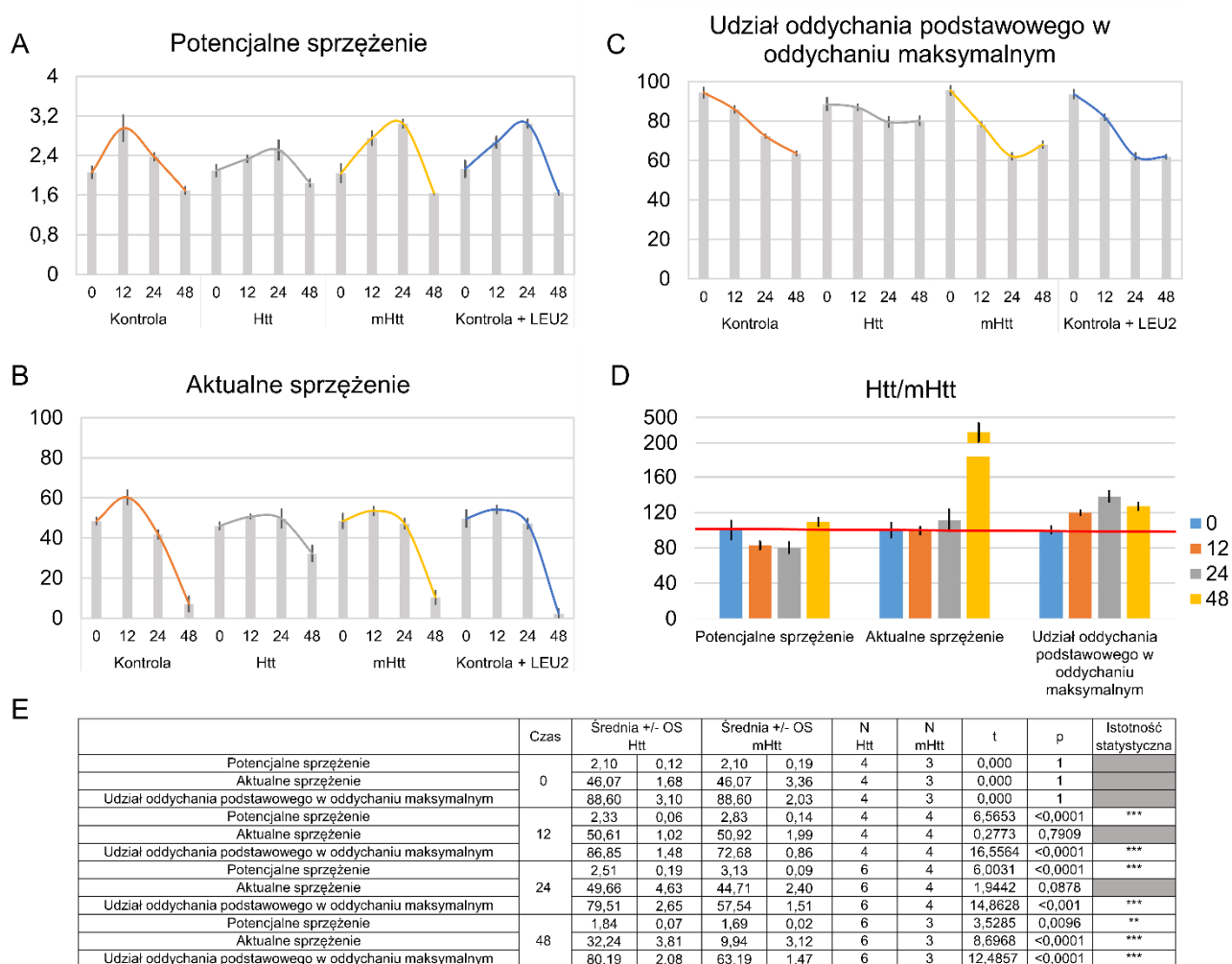
6.2.5.7. Efekt bezpośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC3

W poniższej analizie badano wpływ ekspresji Htt i mHtt prowadzonej w 37°C, na parametry bioenergetyczne komórek szczepów $\Delta por1T4Q25hVDAC3$ i $\Delta por1T4Q103hVDAC3$, przy zastosowaniu dwóch szczepów komórek kontrolnych, tj. komórek szczepu $\Delta por1T4hVDAC3$ (Kontrola) i komórek szczepu $\Delta por1T4hVDAC3Leu2$, uzyskanych w wyniku transformacji plazmidem pYX142, zawierającym sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2* (Kontrola+LEU2). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 30.

Analiza wartości PS (Rys.30A), AS (Rys.30B) i Op/Omax wskazuje na bardzo podobny charakter ich zmian dla wszystkich badanych komórek, przy czym w przypadku komórek z ekspresją Htt ($\Delta por1T4Q25hVDAC3$) zmiany te są zdecydowanie słabsze.

Zastosowanie ilorazu wartości analizowanych parametrów obliczonych dla komórek z ekspresją Htt i z ekspresją mHtt (po normalizacji o współczynnik Htt/mHtt mierzony w czasie =0h) (Rys.30D), pozwala stwierdzić drastyczną zmianę dotyczącą AS po 48h trwania ekspresji Htt i mHtt. Wynika ona z większego niż w przypadku komórek z ekspresją Htt spadku wartości AS w komórkach z ekspresją mHtt. Zaobserwowano także narastające w czasie niewielkie zwiększenie wartości ilorazu Op/Omax, wynikające także ze słabszego spadku wartości tego parametru w komórkach z ekspresją Htt w porównaniu z komórkami z ekspresją mHtt.

Należy więc uznać, iż zaobserwowano istotny, bezpośredni wpływ ekspresji Htt, w warunkach szoku temperaturowego, tj. w 37°C, na aktualne sprzężenie mitochondriów w komórkach z ekspresją hVDAC3, pojawiające się jednak po dłuższym czasie od indukcji ekspresji.



Rysunek 30. Analiza parametrów bioenergetycznych mierzonych dla komórek z ekspresją hVDAC3, w warunkach różnych czasów trwania ekspresji Htt i mHtt. Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu D, pokazana w części E, została wykonana dwustronnym testem t-Studenta. OS - odchylenie standardowe, N - liczba pomiarów, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

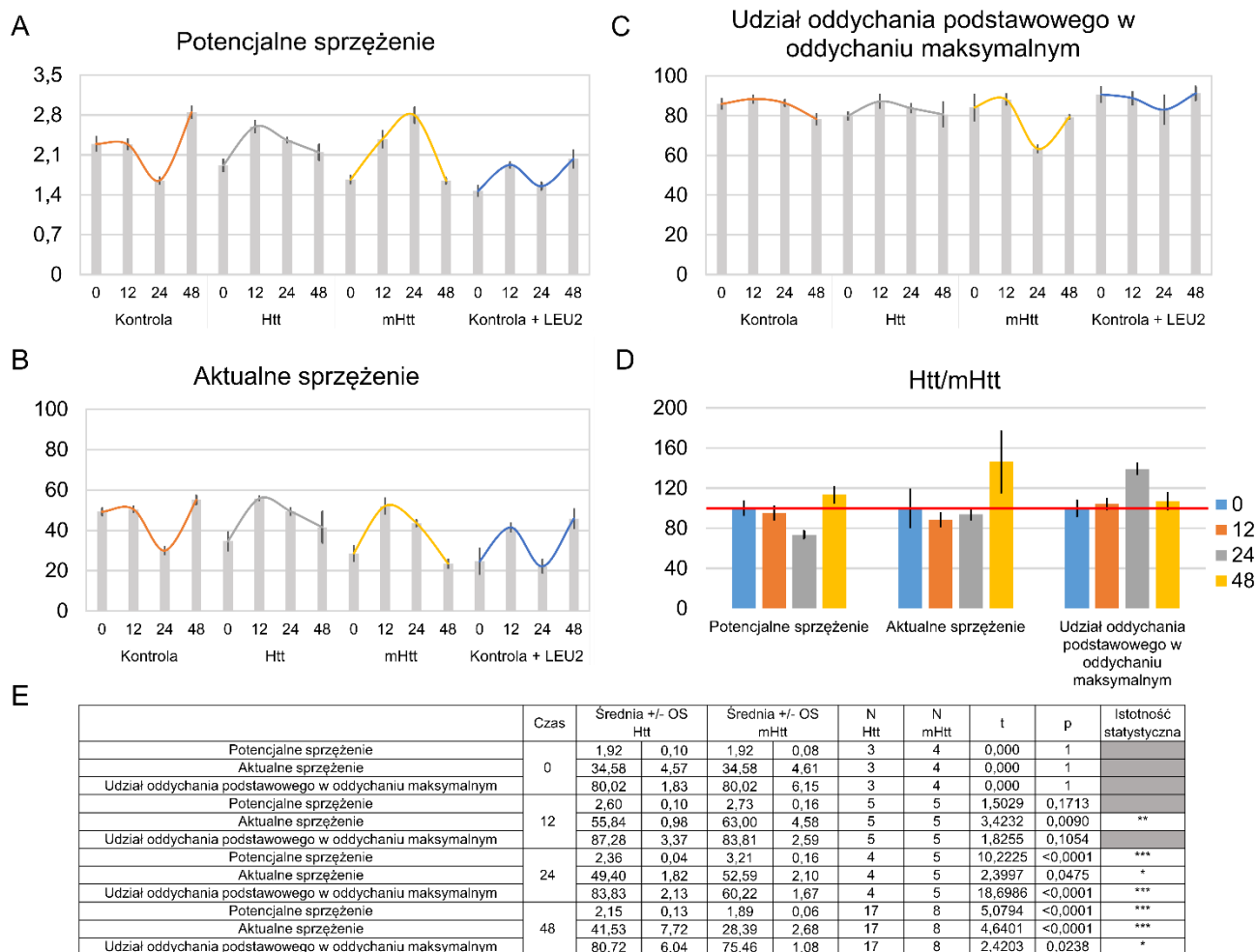
6.2.5.8. Efekt pośredni ekspresji Htt i mHtt na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC3

W poniższej analizie badano wpływ ekspresji Htt i mHtt prowadzonej w 37°C na parametry bioenergetyczne komórek szczepów $\Delta por1T4Q25hVDAC3$ i $\Delta por1T4Q103hVDAC3$, po 24h hodowli w pożywce YPG, w 37°C, następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt (p.5.6.1.2.2) i przy zastosowaniu dwóch szczepów komórek kontrolnych, tj. komórek szczepu dzikiego $\Delta por1T4hVDAC3$ (Kontrola) i komórek szczepu $\Delta por1T4hVDAC3Leu2$, uzyskanych w wyniku transformacji plazmidem pYX142, zawierającym sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2* (Kontrola+LEU2). Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 31.

Analiza wartości PS (Rys.31A), a także AS (Rys.31B), przy braku ekspresji Htt i mHtt (t=0h) i po 12h, 24h i 48h trwania ich ekspresji, wykazała obecność fluktuacji wartości tych parametrów o odmiennym przebiegu dla obu szczepów komórek kontrolnych, tj. $\Delta por1T4hVDAC3$ i $\Delta por1T4hVDAC3Leu2$ oraz komórek z ekspresją Htt i mHtt ($\Delta por1T4Q25hVDAC3$ i $\Delta por1T4Q103hVDAC3$). Dla badanych komórek nie zaobserwowano różnic w przebiegu zmian wartości Op/Omax, przy czym w przypadku komórek z ekspresją Htt obserwowano zwiększone fluktuacje (Rys.31C).

Zastosowanie ilorazu wartości analizowanych parametrów obliczonych dla komórek z ekspresją Htt i z ekspresją mHtt (po normalizacji o współczynnik Htt/mHtt mierzony w czasie =0h) (Rys.31D), wskazuje na nieznaczne różnice w wartościach badanych parametrów w przypadku komórek z ekspresją Htt i mHtt. Wynikają one głównie z różnic ilościowych, a nie jakościowych. Na przykład, wyraźna różnica dotycząca AS wynika z większego spadku wartości tego parametru w komórkach z ekspresją mHtt (Rys.31E).

Należy więc uznać, iż zaobserwowano nieznaczny pośredni wpływ ekspresji Htt i mHtt, w warunkach szoku temperaturowego, tj. w 37°C, na parametry bioenergetyczne komórek z ekspresją hVDAC3.

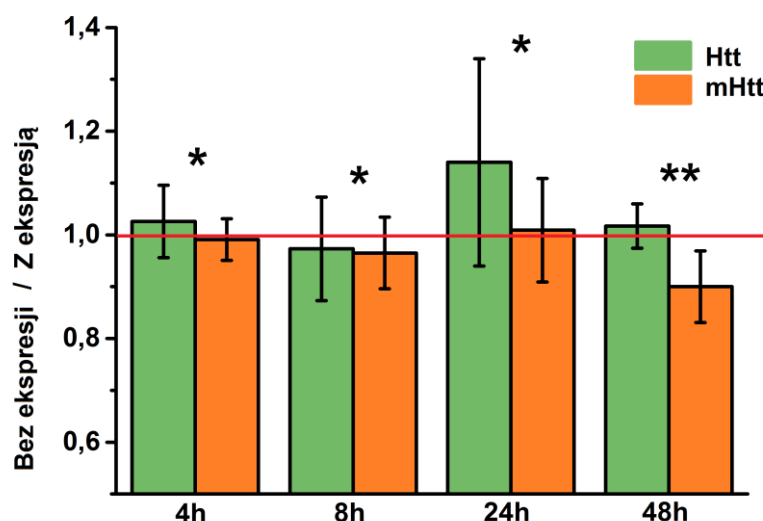


Rysunek 31. Analiza parametrów bioenergetycznych mierzonych dla komórek drożdży z ekspresją yVDAC1, po 24h hodowli w pożywce YPG następującej po 0h, 12h, 24h i 48h ekspresji Htt i mHtt. Analiza statystyczna wyników służących do przygotowania wykresu D, pokazana w części E, została wykonana dwustronnym testem t-Studenta. OS - odchylenie standardowe, N - liczba pomiarów, t - wartość statystyki t, p - poziom istotności. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. Szare pole oznacza brak istnienia istotnej różnicy pomiędzy badanymi średnimi.

6.3. Rola białka VDAC w przeżywalności komórek szczurzego modelu HD

6.3.1. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek PC12-HD-Q28 i PC12-HD-Q74

Przeżywalność komórek PC12-HD-Q28 i PC12-HD-Q74, stanowiących szczurzy model HD (p.4.1.4) badano z zastosowaniem testu MTT (p.5.8.2.2) dla różnych czasów trwania ekspresji Htt i mHtt (tj. 4h, 8h, 24h i 48h), indukowanej podaniem doksycykliny. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 32. Wskazują one na wyraźną różnicę w przeżywalności badanych komórek dla czasu trwania ekspresji Htt i mHtt wynoszącego 48h. Można zauważyć, że Htt nie obniża przeżywalności komórek PC12-HD-Q28, podczas gdy ekspresja mHtt w sposób istotny obniża przeżywalność komórek PC12-HD-Q74.

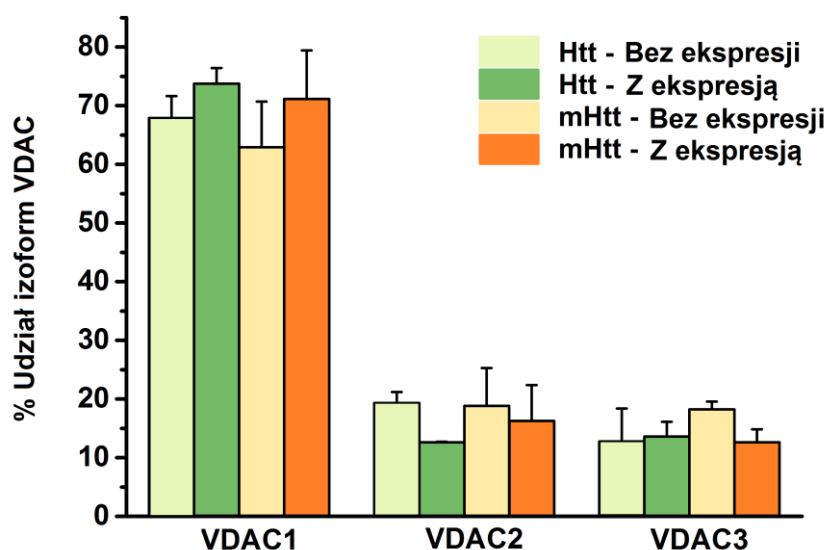


Rysunek 32. Przeżywalność komórek szczurzego modelu H, badana dla różnych czasów trwania ekspresji Htt i mHtt. Przeżywalność komórek przedstawiono jako iloraz wyniku testu MTT otrzymanego dla komórek z ekspresją, odpowiednio, Htt lub mHtt, i komórkami kontrolnymi, tj. komórkami hodowanymi w tych samych warunkach, przez ten sam okres czasu, lecz bez ekspresji tych białek. Wyniki równe 1 (czerwona linia) oznaczają brak różnic w przeżywalności komórek, wyniki powyżej 1 są efektem jej zwiększenia w komórkach z ekspresją Htt lub mHtt, podczas gdy wyniki poniżej tej wartości są efektem zmniejszenia przeżywalności komórek z ekspresją tych białek. Dane przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ OS z trzech niezależnych eksperymentów. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$.

6.3.2. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na aktywność kanałową białek VDAC

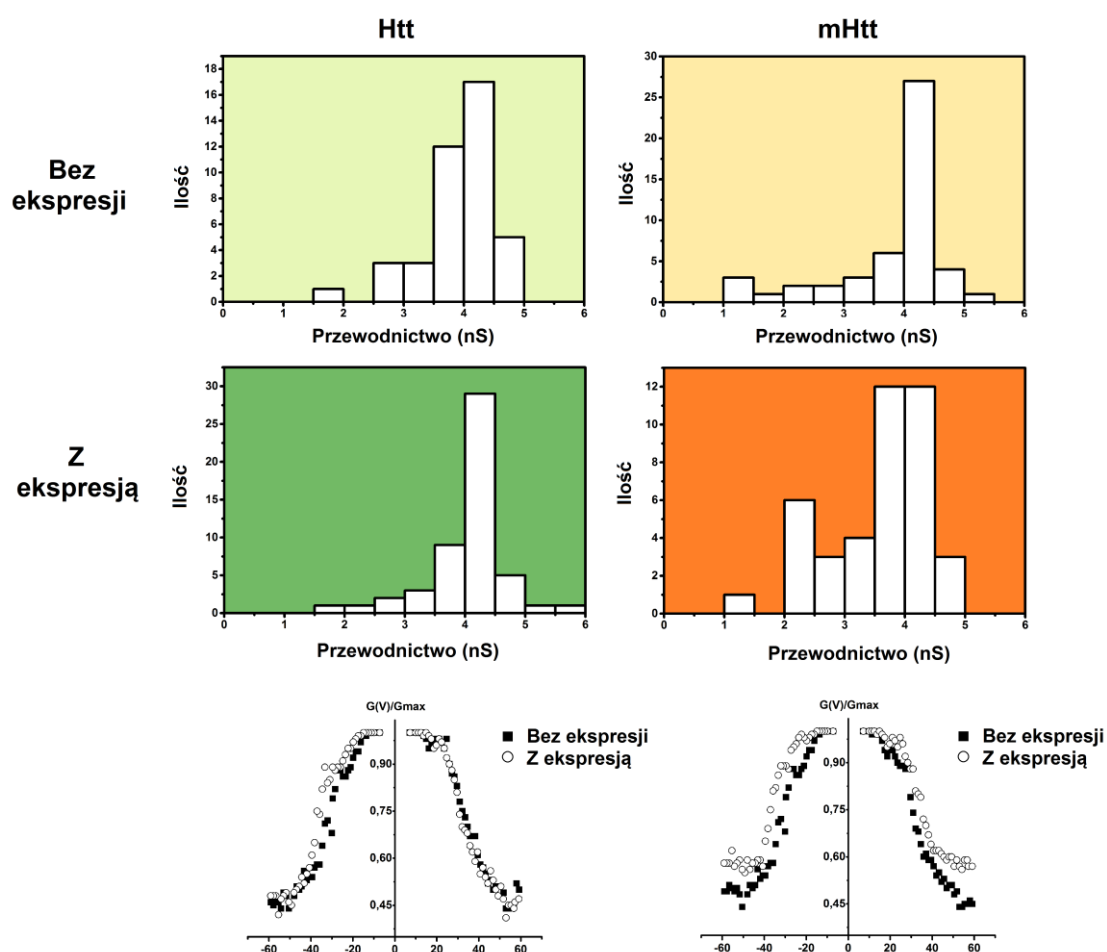
Aby sprawdzić czy białka VDAC mają znaczenie dla obserwowanej różnicy w przeżywalności komórek (Rys. 33), z komórek PC12-HD-Q28 i PC12-HD-Q74, przed i po 48h od indukcji ekspresji, odpowiednio, Htt i mHtt, wyizolowano mitochondria, i następnie białka VDAC (p.5.7.2, p.5.11).

W celu analizy ilościowej otrzymanych preparatów VDAC wykorzystano technikę LC-MS/MS (p.5.12.2), a otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 33. Wskazują one, iż izoformą dominującą ilościowo we wszystkich badanych preparatach jest VDAC1, podczas gdy VDAC2 i VDAC3 występują w mniejszej i porównywalnej ilości. Ponadto stwierdzono, że ekspresja Htt i mHtt nie zmienia ilościowych relacji pomiędzy tymi białkami w badanych preparatach.



Rysunek 33. Ocena ilościowa udziału izoform białka VDAC w preparatach izolowanych z mitochondriów komórek PC12-HD-Q28 i PC12-HD-Q74. Obliczenia wykonano wykorzystując współczynnik emPAI. Dane przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ OS z trzech niezależnych eksperymentów. Bez ekspresji - komórki kontrolne; Z ekspresją - komórki traktowane doksycykliną

Analizę aktywności kanałowej wyizolowanych preparatów białek VDAC przedstawiono na rysunku 34. Badania wykonywano metodą BLM (p.5.13).



Rysunek 34 Wpływ ekspresji Htt i mHtt na aktywność kanałową białek VDAC rekonstruowanych w systemie BLM. Białka VDAC wyizolowano z komórek PC12-HD-Q28 i PC12-HD-Q74 przed i po 48h od indukcji ekspresji, odpowiednio, Htt i mHtt.

Wykazano, że ekspresja mHtt zmienia rozkład przewodnictwa kanałów tworzonych przez izoformy białka VDAC izolowane z komórek PC12-HD-Q74, podczas gdy Htt nie wpływa ten rozkład. Otrzymane wyniki znajdują odzwierciedlenie w zmniejszonej zależności od potencjału obserwowanej dla białek VDAC izolowanych z mitochondriów komórek PC12-HD-Q74 po 48h ekspresji mHtt, w porównaniu do komórek kontrolnych, tj. hodowanych w tych samych warunkach, przez ten sam okres czasu, lecz bez ekspresji mHtt. W przypadku ekspresji Htt zmian takich nie obserwowano.

7. Dyskusja

W ramach niniejszej pracy skonstruowano drożdżowy model choroby Huntingtona, obejmujący komórki z ekspresją izoform ludzkiego białka VDAC, jak i przeprowadzono analizę ich przeżywalności i statusu bioenergetycznego mitochondriów, a uzyskane wyniki porównano z otrzymanymi dla modelu opartego na komórkach PC12, wyprowadzonych z guza chromochłonnego nerki szczura (p.4.1.4). Otrzymane wyniki wskazują, iż ludzka izoforma VDAC1 może mieć istotne znaczenie dla efektu cytotoksycznego, pojawiającego się w rozwoju choroby.

Choroba Huntingtona (ang. *Huntington disease*, HD) zaliczana jest do chorób neurodegeneracyjnych, dziedziczonych autosomalnie dominująco. Jej przyczyną jest mutacja zachodząca w rejonie kodującym koniec aminowy białka zwanego huntingtyną (Htt), polegająca na zwiększeniu liczby kodonów kodujących glutaminę w egzonie 1 genu *HTT* do ponad 35. Powstaje w ten sposób zmutowana wersja białka (mHtt), z wydłużonym ciągiem reszt glutaminy w obszarze końca aminowego. W przebiegu HD dochodzi do narastającej w czasie utraty neuronów, głównie w obszarze prążkowie i głębszych warstw kory mózgowej (Usdin i in., 2015; Wiatr i in., 2017).

Htt jest białkiem charakterystycznym dla kręgowców (Truant i in. 2008), o lokalizacji cytoplazmatycznej, wykazującym aktywność antyapoptotyczną i zdolność oddziaływania z wieloma białkami o różnych funkcjach (Bocharova i in., 2009; Pandey i in., 2010; baza danych BioGrid^{3,4}). Jednakże funkcja Htt w komórce nie została do tej pory precyzyjnie wyjaśniona. Ponadto, nie udało się także jednoznacznie określić, co jest przyczyną toksyczności w przebiegu HD. Wiele doniesień mówi o toksyczności agregatów mHtt (Li i Li, 2004; Shirasaki i in., 2012), jak i jej postaci niepodlegającej agregacji (Mitra i in., 2009; Krench i Littleton, 2013), przy czym istnieją także doniesienia o toksycznych właściwościach mRNA kodującego mHtt (Tsoi H i Chan HY, 2014).

Jak wspomniano we Wstępie (p.2.1) do tej pory, w tym w ciągu ostatnich pięciu lat, powstało wiele prac przeglądowych dotyczących mitochondrialnego podłoża HD. Ich bazą jest wiele danych eksperymentalnych wskazujących na dysfunkcję mitochondriów, jako istotny czynnik w patogenezie HD. Co istotne, dostępne dane sugerują możliwość oddziaływania Htt (jak i mHtt) z białkiem VDAC (Kaltenbach i in., 2007), uznawanym obecnie za kluczowy regulator funkcjonowania mitochondriów. Wydaje się, zatem, że wymienione białka mogą tworzyć skomplikowany układ funkcjonalny, ważny dla funkcjonowania mitochondriów, i w konsekwencji całej komórki. Jak opisano wcześniej (p.2.2) w mitochondriach ssaków zidentyfikowano trzy izoformy białka VDAC (VDAC1-VDAC3) zdolne do tworzenia funkcjonalnego kanału. Natomiast u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano tylko jedną izoformę

zdolną do tworzenia kanału tj. yVDAC1, kodowaną przez gen *POR1*. Jej brak, w warunkach „permissywnych” (patrz dalej), nie prowadzi do skutku letalnego, co stwarza możliwość ekspresji w komórkach mutantu delecyjnego $\Delta por1$ poszczególnych izoform ssaczych białek VDAC, w tym ludzkich, w celu dokładniejszego poznania ich roli w mitochondriach (De Pinto i in., 2016 i Karachitos i in., 2016b). Co istotne, opublikowane ostatnio dane (Lou i in., 2016) wskazują na możliwość obniżenia ilości izoformy VDAC1 w mitochondriach mysiego modelu HD (myszy R6/2) lub zmniejszenia liczby mitochondriów, czego skutkiem jest mniejsza ilość białka VDAC.

HD jest chorobą charakterystyczną dla ludzi. Stosowane modele HD umożliwiają jednakże badanie różnych jej aspektów, przy czym manifestacja objawów zależy od zastosowanego organizmu, użytego konstruktu genetycznego (w tym zastosowanego promotora, rozmiaru ekspymowanego białka, liczby powtórzeń kodonu dla glutaminy i elementów dodatkowych), a także czasu ujawnienia choroby (Morton i Howland, 2013; Howland i Munoz-Sanjuan, 2014; Chang i in., 2015). Podstawowym celem niniejszej pracy było otrzymanie drożdżowego modelu HD, pozwalającego zweryfikować znaczenie ludzkich białek VDAC w oddziaływaniu Htt i mHtt na mitochondria. Model taki w wersji bardzo ograniczonej, tj. obejmujący tylko komórki drożdży z ekspresją Htt i mHtt skonstruowano ponad 10 lat temu (Solans i in., 2006). Otrzymane od ich autorów konstrukty z sekwencją kodującą Htt i mHtt wykorzystano w niniejszej pracy (p.4.1.1.1). Drożdżowy model skonstruowano dzięki heterologicznej ekspresji w komórkach mutantu delecyjnego $\Delta por1$ (mutant $\Delta por1T4$) sekwencji kodujących Htt i mHtt. Ekspresję tę monitorowano dzięki obecności znacznika w postaci GFP i znacznika aukstotroficznego w postaci funkcjonalnego genu *LEU2*. Otrzymane szczepy posłużyły następnie do heterologicznej ekspresji izoform ludzkiego białka VDAC, którą kontrolowano dzięki obecności znacznika w postaci funkcjonalnego genu *URA3* (Rys.10, Tab.3). Co istotne, ponieważ wykorzystane sekwencje kodujące Htt i mHtt zawierają mozaikę kodonów dla glutaminy (tj. CAG i CAA), wykluczono występowanie w tym modelu toksyczności mRNA, która występuje w przypadku ciągów powtórzeń CAG (Kazantsev i in., 1999; Solans i in., 2006; Fisher i Krzyzosiak, 2013). Komórki wchodzące w skład modelu badano w warunkach temperatury optymalnej dla ich wzrostu, tj. w 28°C, jak i w temperaturze stresu temperaturowego, tj. 37°C. Warunek ten wprowadzono jako element kontroli ekspresji białek VDAC, jak również dlatego iż jest to temperatura optymalna dla ekspresji ludzkich białek w tym badanych białek VDAC (hVDAC1-3), jak i Htt i mHtt.

Ekspresję Htt i mHtt potwierdzono dzięki zastosowaniu technik mikroskopii fluorescencyjnej (Rys.11-13). Ekspresja Htt i mHtt zachodzi w badanych warunkach, i nie stwierdzono różnic w tej ekspresji w komórkach zawierających natywną formę

VDAC tj. yVDAC1, komórkach mutantu delecyjnego $\Delta por1T4$, jak i komórkach z ekspresją izoform ludzkiego białka VDAC tj. hVDAC1, hVDAC2 i hVDAC3. Zaobserwowane różnice w stopniu i szybkości agregacji mHtt w 28°C i 37°C, pozostają w zgodzie z opublikowanymi niedawno danymi wskazującymi na temperaturę i liczbę powtórzeń reszt glutaminy jako istotne czynniki wpływające na konformację Htt (Daldin i in., 2017), przy czym, w cytowanej publikacji badano tylko niższe temperatury, a leżący u podstaw tego zjawiska mechanizm nie został dotąd wyjaśniony. Co więcej, wpływ temperatury w dostępnych modelach HD nie był do tej pory badany. Ekspresję białek VDAC potwierdzono dzięki zastosowaniu immunodetekcji (Rys.14) i testu fenotypowego (Rys.15). Zastosowanie kontroli negatywnej w postaci mitochondriów komórek mutantu delecyjnego $\Delta por1T4$ pozwoliło jednoznacznie potwierdzić obecność izoform ludzkiego białka VDAC w mitochondriach komórek drożdżowego modelu HD. Zaobserwowano jednakże istnienie pewnych różnic ilościowych, szczególnie w przypadku komórek $\Delta por1T4Q103hVDAC1$ (Rys.14). Dla tych komórek wykazanie obecności białka hVDAC1 wymagało znacznego wydłużenia czasu ekspozycji na kliszy.

Zastosowanie testu fenotypowego na pożywce zawierającej niefermentujące źródło węgla (YPG) w 37°C (Rys.15), pozwoliło potwierdzić obecność funkcjonalnych białek VDAC. W literaturze fenotyp mutantu pozbawionego genu *POR1* opisuje się, bowiem jako niezdolność do wzrostu w 37°C na pożywce YPG (Blachly-Dyson i Forte, 2001; De Pinto i in., 2010). Jak wynika z innych prac mutant ten słabo rośnie na pożywce YPG w 37°C, jednak z czasem zdolny jest do przystosowania się do wzrostu w tych warunkach (Dihanich i in., 1987). Poczynione w ramach niniejszej pracy obserwacje potwierdzają, iż komórki mutantu $\Delta por1T4$ są w stanie przeprowadzić ok 2-3 podziałów w opisanych warunkach, co umożliwiło ich hodowlę w celu przeprowadzenia analizy ekspresji Htt i mHtt metodą mikroskopii fluorescencyjnej (Rys.11-13), jak i przygotowanie krzywej wzrostu w warunkach ekspresji Htt i mHtt w 37°C (Rys.16). Ponadto, uzyskane przez nas wyniki wskazują, że heterologiczna ekspresja izoform ludzkiego białka VDAC w komórkach drożdży *S.cerevisiae*, wykonana z zastosowaniem tych samych konstruktów, pozwoliła na otrzymanie funkcjonalnych kanałów VDAC, których właściwości badano w systemie BLM (Karachitos i in., 2016b).

Analiza funkcjonalności komórek drożdżowego modelu HD w oparciu o krzywe wzrostu (Rys.16) wskazuje, iż w 28°C, w warunkach braku ekspresji Htt i mHtt, wszystkie komórki szczepów kontrolnych tj. nietransformowanych konstruktami zawierającymi sekwencje kodujące Htt i mHtt rosną szybciej, niż odpowiednie komórki transformowane tymi konstruktami (Rys.16A), co można wynikać z swoistego

„obciążenia” komórek obecnością dodatkowego konstruktu tj. Ylp351Q25 lub Ylp351Q103. Po podaniu galaktozy, i indukcji ekspresji Htt i mHtt, efekt ten znika (Rys.16B). Przyczyną tego zjawiska może być swoista kompensacja zaburzeń metabolizmu mitochondrialnego przez fermentację po podaniu galaktozy. Podobny obraz otrzymano dla komórek hodowanych w temperaturze 37°C, tj. nie zaobserwowano wpływu ekspresji Htt i mHtt na wzrost komórek, niezależnie od obecnej w nich formy białka VDAC, z wyjątkiem komórek z ekspresją hVDAC1 i mHtt. W przypadku tych komórek stwierdzono lekko zwolniony wzrost na początkowym etapie hodowli i jego przyspieszenie po ok. 36h (Rys.16C). W przypadku hodowli w 37°C i w obecności ekspresji Htt i mHtt istotną różnicę obserwowano także dla komórek bez ekspresji białka VDAC. Obecność Htt i mHtt wydają się w różnym stopniu zmieniać wzrost komórek w porównaniu z komórkami szczepu kontrolnego. Na podstawie tej obserwacji można założyć, iż obecność białka VDAC (drożdżowego i izoform ludzkiego białka VDAC) jest istotna dla wzrostu komórek drożdżowego modelu HD.

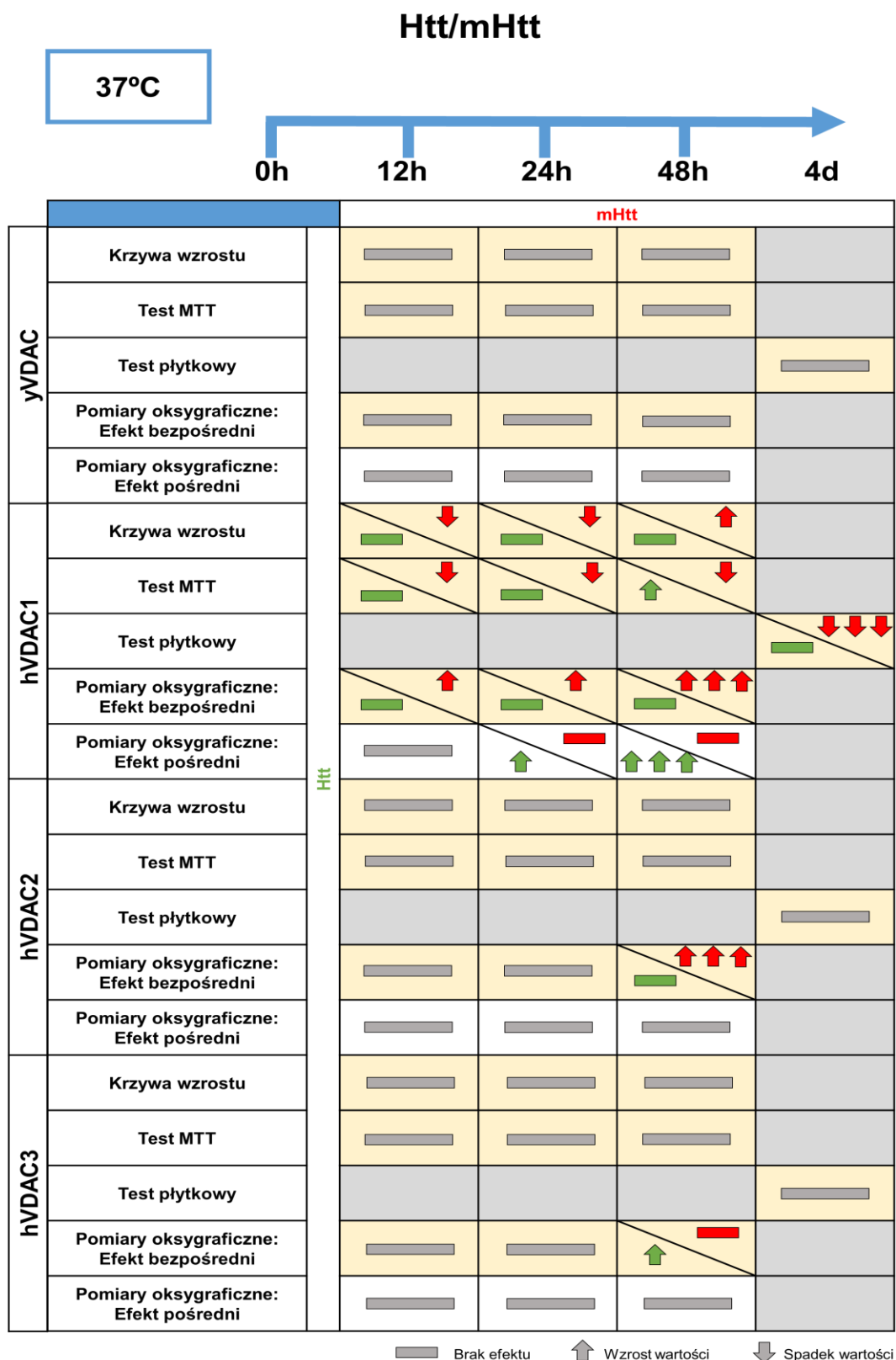
Zatem, potwierdzona obecność Htt i mHtt jak i izoform ludzkiego białka VDAC oraz wyniki testu fenotypowego i otrzymane krzywe wzrostu (Rys.11-Rys.16) wskazują, że otrzymano funkcjonalny model HD. Jednakże model ten może być obciążony pewnymi problemami natury metabolicznej. Przede wszystkim, jak wspomniano wcześniej obecność galaktozy w pożywce, poza indukcją ekspresji Htt i mHtt, może prowadzić do zmiany metabolizmu komórek. W przypadku komórek *S. cerevisiae*, galaktoza jest bowiem przekształcana do glukozy-6-fosforanu zasilającego szlak glikolityczny, jednakże w przeciwieństwie do glukozy, galaktoza nie powoduje represji katabolicznej. Stwierdzono bowiem, że po podaniu galaktozy, fermentacja, jak i fosforylacja oksydacyjna zachodzą w tych komórkach równocześnie (Kapelli 1987), co umożliwia badanie funkcji mitochondrialnych także w obecności galaktozy (Solans i in., 2006). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki testów zależnych od funkcjonowania mitochondriów, takich jak metoda MTT (p.6.2.2.2) i pomiary oksygraficzne (p.6.2.5), prowadzonych w 37°C, wskazują na zwiększenie aktywności mitochondriów w komórkach drożdżowego modelu HD po podaniu galaktozy. Zatem, należałoby rozpatrzyć możliwość wyeliminowania wpływu galaktozy na funkcjonowanie komórek modelu poprzez skonstruowanie wyjściowego mutantu niezdolnego do jej wykorzystania jako źródła węgla. Jest to możliwe, na przykład, dzięki wprowadzeniu zawierającej znacznik aukсотroficzny kasety delecyjnej w miejsce genu *GAL1*.

Ponadto, wykorzystane w konstrukcji modelu komórki szczepu M3 (p.4.1.3) zawierają mutację w genie *ADE2*, objawiającą się pojawieniem się czerwonego zabarwienia komórek drożdży hodowanych na pożywce zawierającej fermentującą

źródło węgla (np. YPD). Wynika ono z nagromadzenia się w wakuolach produktu pośredniego biosyntezy adeniny (Nevzglyadova i in., 2011). Podobnie jak w przypadku zastosowania glukozy, na pożywkach z dodatkiem galaktozy w 28°C obserwuje się „zaczerwienienie” hodowli, przy czym efekt ten w przypadku hodowli prowadzonej w 37°C jest szczątkowy (Załącznik, Rys.38). Przyczyną tego zjawiska może być wpływ temperatury na proces biosyntezy adeniny (co do tej pory w przypadku komórek drożdży nie było badane), jak i zmiana metabolizmu komórki (preferencyjnie w stronę metabolizmu mitochondrialnego), co wydają się potwierdzać wcześniejsze obserwacje (p.6.2.2.2 i p.6.2.5)

Kolejnym elementem możliwym do udoskonalenia jest wyeliminowanie wpływu funkcjonalnego genu *LEU2*, zawartego w konstrukcjach YIp351Q25 i YIp351Q103 (p.4.1.1.1). Wyniki płytkowego testu przeżywalności wykazały, bowiem iż zastosowana temperatura hodowli, jak i ekspresjonowane białko VDAC mogą mieć znaczenie dla wpływu obecności znacznika auktroficznego *LEU2* na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD (Tab.7). Należy podkreślić, że dostępne dane oparte na tych samych konstrukcjach, tj. YIp351Q25 i YIp351Q103 nie uwzględniają wyników testów płytkowych dla komórek szczepów kontrolnych (Solans i in., 2006). Jednak uwzględniając otrzymane wyniki dotyczące możliwości wpływu znacznika *LEU2* (p.6.2.3.3), drożdżowy model HD rozszerzono o komórki z ekspresją tego genu, które otrzymano w wyniku transformacji plazmidem pYX142, zawierającym sekwencję funkcjonalnego genu *LEU2*. Komórki te stanowiły kontrolę metaboliczną (Rys.19).

Mimo wskazanych niedoskonałości, uzyskany drożdżowy model HD pozwala na zbadanie przeżywalności wchodzących w jego skład komórek i pewnych bioenergetycznych aspektów funkcjonowania ich mitochondriów. Jak podsumowano na rysunku 35, stanowiącym kompilację danych zaprezentowanych w Wynikach, na rysunkach 17, 18, 20, 21 i 22, przeprowadzone eksperymenty pozwalają stwierdzić, że ekspresja Htt i mHtt ma wpływ na przeżywalność komórek drożdżowego modelu HD, przy czym istotne znaczenie mają tu temperatura hodowli i ulegające ekspresji białko VDAC. Aby wstępnie określić wpływ Htt i mHtt posłużono się współczynnikiem Htt/mHtt, pozwalającym na sprawdzenie, czy ekspresja obu tych białek może prowadzić do różnych efektów w przypadku badanych komórek.



Rysunek 35. Podsumowanie efektów ekspresji Htt i mHtt w komórkach drożdżowego modelu HD.

Na żółto zaznaczono warunki, w których w pożywce znajdowała się galaktoza. Na czerwono zaznaczono efekt mHtt, a na zielono efekt Htt. W przypadku pomiarów oksygraficznych (efekt bezpośredni i pośredni) wpływ Htt i mHtt wyznaczono na podstawie analizy zmian badanych parametrów bioenergetycznych, tj. Aktualnego sprzężenia, Potencjalnego sprzężenia i % udziału oddychania podstawowego w oddychaniu maksymalnym. Obecność przekątnej oznacza graficzne przedstawienie efektu dla obu białek.

Przy zastosowaniu testu MTT, przeprowadzonego dla hodowli prowadzonych w 28°C, obserwowane różnice w przeżywalności komórek są słabo zaznaczone (Rys.17), natomiast podniesienie temperatury do 37°C powoduje, iż w miarę trwania czasu ekspresji Htt lub mHtt obserwuje się spadek wartości współczynnika Htt/mHtt dla mutantu $\Delta por1T4$ i jego wzrost dla komórek z ekspresją hVDAC1 (Rys.18). Brak zmiany wartości współczynnika Htt/mHtt obserwowany jest także w przypadku płytkowego testu przeżywalności, przeprowadzonego w 28°C, natomiast w 37°C obserwowano różnice tylko dla komórek z ekspresją yVDAC i hVDAC1 (Rys.20). Oznacza to, że obie metody badania przeżywalności komórek wskazują na możliwą różnicę w efekcie ekspresji Htt i mHtt w przypadku komórek z ekspresją hVDAC1, w temperaturze stresu temperaturowego, tj. 37°C.

Uwzględnienie w analizie testów przeżywalności efektów uzyskanych dla komórek kontrolnych, pozwala wykluczyć wpływ ekspresji Htt i mHtt na komórki zawierające natywną formę VDAC tj. yVDAC1 (Rys.21). Zatem, nie potwierdzono dostępnych danych wskazujących na cytotoksyczny efekt mHtt w przypadku komórek drożdży z ekspresją yVDAC1 (Solans i in., 2006). Należy jednak zaznaczyć, że w cytowanej pracy zastosowano inne warunki hodowli, tj. 30°C jak i inne pożywki (zawierające glicerol i etanol) i nie stosowano komórek szczepów kontrolnych. Równocześnie, włączenie do analizy komórek szczepów kontrolnych pozwala zaobserwować, iż obecność Htt, niezależnie od zastosowanej temperatury hodowli, nie wpływa istotnie na przeżywalność komórek badanego modelu, podczas gdy istotny efekt mHtt występuje jedynie w temperaturze stresu temperaturowego, przy czym może on polegać na: (1) zwiększeniu przeżywalności komórek pozbawionych funkcjonalnego białka VDAC (test MTT, Rys.18A) i (2) obniżeniu przeżywalności komórek z ekspresją hVDAC1 (test MTT, Rys.18A i test płytkowy, Rys.22). Wyjaśnienie efektu mHtt w komórkach pozbawionych funkcjonalnego białka VDAC jest na obecnym etapie badań trudne do wytłumaczenia i może jedynie z dużą dozą ostrożności być interpretowane jako sugestia znaczenia obecności odpowiedniej izoformy białka VDAC dla cytotoksycznego efektu mHtt. Natomiast wyniki uzyskane dla komórek modelu z ekspresją hVDAC1 wydają się potwierdzać kluczowe znaczenie tej izoformy VDAC dla cytotoksycznego efektu mHtt, ponieważ efekt ten obserwowano, przy zastosowaniu testu MTT, także dla modelu opartego na komórkach PC12, wyprowadzonych z guza chromochłonnego nerki szczura (Rys.32). Analogiczny efekt dla tego modelu stwierdzono stosując metodę zliczania komórek (Karachitos i in., 2016a). Co istotne, w komórkach modelu opartego na komórkach PC12 ilościowo dominującą izoformą VDAC jest izoforma VDAC1. Izofoma ta stanowi bowiem ok. 70% wszystkich białek VDAC obecnych w wyizolowanych preparatach, podczas gdy

VDAC2 i VDAC3 występują w mniejszej i porównywalnej ilości. Co więcej, ekspresja Htt i mHtt nie zmienia ilościowych relacji pomiędzy tymi białkami w badanych próbach (Rys.33), natomiast ekspresja mHtt prowadzić może do zmian aktywności kanałowej. Dla rekonstruowanych preparatów białek VDAC izolowanych z odpowiednich hodowli komórek PC12 obserwowano bowiem zmieniony rozkład przewodnictwa i zmniejszoną zależność od potencjału (Rys.34). Przy uwzględnieniu ilościowej dominacji izoformy VDAC1, założyć można, iż zmiany te dotyczą głównie tej izoformy. Zatem, wyniki uzyskane dla drożdżowego modelu HD i modelu opartego na komórkach PC12 są w dużym stopniu spójne. Co warto podkreślić, hodowla komórek PC12 prowadzona była w 37°C. Zmiana w aktywności kanałowej białka VDAC może być wywołana jego oksydacyjną modyfikacją (Karachitos i in., 2009). Co istotne, w przypadku mysiego modelu HD (myszy R6/2) stwierdzono taką właśnie modyfikację białka VDAC w obszarach zmienionych chorobowo (Lou i in., 2016).

Nie można jednak wykluczyć wywołanych tym czynnikiem zmian w funkcjonowaniu mitochondriów drożdży zawierających różne izoformy białka VDAC, w tym zachodzącego w warunkach stresu temperaturowego wzrostu RFT (Pyatrikas i in., 2015). Dlatego też porównano podstawowe parametry bioenergetyczne otrzymane dla komórek drożdżowego modelu HD, w warunkach ekspresji Htt i mHtt i w temperaturze 37°C, w poszukiwaniu parametrów, których zmiany przebiegają odmiennie w przypadku komórek z ekspresją hVDAC1 w porównaniu z pozostałymi komórkami. Wartości parametrów bioenergetycznych wyznaczano w warunkach bezpośredniego i pośredniego wpływu ekspresji Htt i mHtt, uwzględniając: potencjalne sprzężenie (PS), aktualne sprzężenie (AS) i udział oddychania podstawowego w oddychaniu maksymalnym (Op/Omax) (p.6.2.5). Efekt bezpośredni odpowiada warunkom zastosowanym w przypadku przeprowadzonych testów przeżywalności, podczas gdy celem efektu pośredniego było zbadanie długofalowego efektu ekspresji Htt i mHtt, po usunięciu czynnika indukującego ich ekspresję. W przypadku efektu bezpośredniego zmiany wartości współczynnika Htt/mHtt potwierdzają kluczowe znaczenie ulegającego ekspresji białka VDAC. Zmian takich nie stwierdzono dla komórek zawierających yVDAC1 (Rys.24). Dla komórek z ekspresją hVDAC1 wykazano postępujące w czasie obniżenie wartości tego współczynnika w przypadku PS i AS, i brak tych zmian w przypadku Op/Omax (Rys.26). Podobny kierunek zmian wartości współczynnika Htt/mHtt obserwowano dla komórek z ekspresją hVDAC2, z tym, że w przypadku PS i AS istotna zmian pojawia się dopiero po 48h i towarzyszy jej subtelny wzrost w przypadku Op/Omax (Rys.28). Z kolei dla komórek z ekspresją hVDAC3 obserwuje się jedynie drastyczny wzrost wartości współczynnika w przypadku

AS po 48h ekspresji Htt i mHtt oraz narastające w czasie niewielkie zwiększenie wartości tego współczynnika w przypadku Op/Omax (Rys.30).

Aby wyznaczyć kierunek zmian obserwowanych pod wpływem ekspresji Htt i mHtt do analizy brano pod uwagę komórki szczepów kontrolnych. Podobnie jak w przypadku przeżywalności komórek, szczegółowe dane pokazane na rysunkach 26-30 podsumowano na rysunku 35. Wykazano, iż spadek wartości współczynnika Htt/mHtt w komórkach z ekspresją hVDAC1 jest efektem wpływu mHtt, a wpływ ten polega na przeciwdziałaniu zmianom wartości badanych parametrów zachodzących w komórkach szczepów kontrolnych jak i z ekspresją Htt (Rys.26). Taki stabilizujący efekt mHtt obserwuje się także w przypadku komórek z ekspresją hVDAC2, jednak dotyczy on głównie komórek po 48h ekspresji mHtt (Rys.28). Co istotne, stabilizujący wpływ ekspresji mHtt na zmiany PS obserwowano także w modelu HD opartym na komórkach PC12 (Karachitos i in., 2016a). Można więc założyć, że komórki z ekspresją hVDAC1 są bardziej wrażliwe na działanie mHtt niż komórki z ekspresją hVDAC2. Co więcej, wydaje się, że w przypadku tych ostatnich, pojawienie się zmian wiązanych z efektem cytotoksycznym wymaga dłuższego czasu lub ma zmiany te mają charakter przejściowy, niekończący się zmniejszeniem przeżywalności komórek. Natomiast w przypadku komórek z ekspresją hVDAC3 stwierdzono wpływ Htt na AS, polegający na zapobieganiu gwałtownemu spadkowi wartości tego parametru, obserwowanemu w komórkach szczepów kontrolnych i komórkach z ekspresją mHtt (Rys.30). Efekt ten wydaje się jednak nie mieć znaczenia dla przeżywalności tych komórek.

Analizę wpływu pośredniego ekspresji Htt i mHtt na komórki drożdżowego modelu HD (Rys.27-31), przeprowadzono w celu sprawdzenia trwałości zmian obserwowanych w efekcie bezpośrednim. Posługując się ponownie zasadą analizy zmian wartości współczynnika Htt/mHtt i następnie włączenia do analizy komórek szczepów kontrolnych stwierdzono, że obserwowane zmiany w wartościach badanych parametrów jak i znaczenie obecności Htt i mHtt dla ich wystąpienia, wydają się być zachowane w komórkach z ekspresją hVDAC1 i hVDAC3. Stwierdzono bowiem, iż wzrost wartości współczynnika Htt/mHtt w przypadku PS i AS dla komórek z ekspresją hVDAC1 jest skutkiem stabilizującego wpływu mHtt na wartość tych parametrów (Rys.29), podczas gdy dla komórek z ekspresją hVDAC3 przejściowa ekspresja Htt zapobiega spadkowi wartości tego parametru, obserwowanemu w komórkach szczepów kontrolnych i komórkach z ekspresją mHtt (Rys.31).

Podsumowując, posługując się otrzymanym drożdżowym modelem HD wykazano, że powodowane przez ekspresję Htt i mHtt zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów zależne są od ekspresowanego białka VDAC. W przypadku komórek z ekspresją hVDAC2 i hVDAC3 obserwowane zmiany nie znajdują odzwierciedlenia

w przeżywalności komórek. W przypadku komórek z ekspresją hVDAC1 współwystępują ze zmianami w przeżywalności. Co więcej, zmiany pojawiające się w komórkach z ekspresją hVDAC1 i hVDAC3 wydają się być zmianami utrzymującymi się po usunięciu czynnika indukującego ekspresję Htt i mHtt. Zastanawiający jest także wymóg stresu temperaturowego, konieczny dla pojawienia się efektu na poziomie przeżywalności w przypadku komórek drożdżowego modelu HD z ekspresją hVDAC1. Ten ostatni aspekt trudno jest wytłumaczyć w oparciu o otrzymane wyniki. Być może jest to skutek efektu obniżenia żywotności/ zwiększonej wrażliwości komórek drożdży w wyniku zwiększonej produkcji RFT (Pyatrikas i in., 2015), zmian w strukturze mHtt, wywołanej zwiększeniem temperatury (Rys.11-13) lub nadmiernym zwiększeniem udziału metabolizmu mitochondrialnego w komórkach, wynikającym ze zwiększonego zapotrzebowania komórki na ATP (koniecznego np. dla sprawnego działania systemu ubikwityna-proteosom), co zdają się potwierdzać rezultaty badania funkcji mitochondrialnych (efekt bezpośredni; Rys. 28), które w konsekwencji może prowadzić do nadmiernej akumulacji RFT w komórce, a następnie do uszkodzenia/delecji mtDNA (Kurihara, i in., 2012) i upośledzenia funkcjonowania mitochondriów (efekt pośredni, Rys.29). Ponadto, porównanie wyników otrzymanych dla drożdżowego modelu HD i modelu opartego na komórkach PC12 szczura pozwala założyć, iż ssacza izoforma VDAC1 jest miejscem bezpośredniego lub pośredniego oddziaływania mHtt i warunkiem pojawienia się cytotoksycznego efektu tego białka.

8. Podsumowanie

Wiele przesłanek pozwala przypuszczać, iż Htt i/lub mHtt może oddziaływać z zewnętrzną błoną mitochondrialną. Co więcej, dostępne dane, oparte na chromatografii powinowactwa i spektrometrii mas, sugerują możliwość oddziaływania Htt (jak i mHtt) z białkiem VDAC (Kaltenbach i in., 2007). Dane te nie zostały jednak do tej pory eksperymentalnie zweryfikowane. W związku z tym, w niniejszej pracy, posługując się ssaczym i drożdżowym, komórkowym modelem choroby Huntingtona (HD) przeprowadzono badania służące określeniu znaczenia obecności białka VDAC dla efektu działania Htt i mHtt w komórkach. Uzyskane wyniki pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Skonstruowano funkcjonalny drożdżowy model HD z ekspresją poszczególnych izoform ludzkiego białka VDAC i kontrolowaną ekspresją Htt i mHtt, przy czym wskazano na temperaturę jako istotny czynnik wpływający na poziom agregacji mHtt, co do tej pory nie było przedmiotem analizy w przypadku badań z wykorzystaniem różnych modeli HD.
2. Mimo zdefiniowanych niedoskonałości metabolicznych, otrzymany drożdżowy model HD pozwala na badanie przeżywalności wchodzących w jego skład komórek i pewnych bioenergetycznych aspektów funkcjonowania ich mitochondriów, przy czym dla obserwowanego efektu ekspresji Htt i mHtt istotne znaczenie ma zastosowana temperatura hodowli i ulegające ekspresji białko VDAC.
3. Zastosowane dla drożdżowego modelu HD metody szacowania przeżywalności komórek wskazują na cytotoksyczny efekt mHtt w przypadku komórek z ekspresją hVDAC1 w temperaturze stresu temperaturowego, tj. 37°C, co pozostaje w zgodzie z efektem obserwowanym dla komórek PC12, składających się na ssaczy komórkowy model HD.
4. Dzięki zastosowaniu modelu drożdżowego HD wykazano, że powodowane przez ekspresję Htt i mHtt zmiany w funkcjonowaniu mitochondriów zależne są od obecności danej izoformy białka VDAC. W przypadku komórek z ekspresją hVDAC2 i hVDAC3 obserwowane zmiany nie znajdują odzwierciedlenia w przeżywalności komórek. W przypadku komórek z ekspresją hVDAC1 współwystępują ze zmianami w przeżywalności. Co więcej, zmiany pojawiające się w komórkach z ekspresją hVDAC1 i hVDAC3 wydają się być zmianami utrzymującymi się po usunięciu czynnika indukującego ekspresję Htt i mHtt.

5. W przypadku komórek drożdżowego modelu HD z ekspresją hVDAC1 wpływ mHtt na funkcjonowanie mitochondriów polega na przeciwdziałaniu zmianom wartości badanych parametrów zachodzących w komórkach szczepów kontrolnych jak i z ekspresją Htt, co również zaobserwowano dla modelu HD opartego na komórkach PC12.
6. Wykorzystując model HD oparty na komórkach PC12 stwierdzono, że ekspresja Htt i mHtt nie zmienia ilościowych relacji pomiędzy izoformami białka VDAC, natomiast ekspresja mHtt prowadzić może do zmian aktywności kanałowej, co dotyczy przede wszystkim izoformy VDAC1.
7. Wyniki uzyskane dla drożdżowego modelu HD i modelu opartego na komórkach PC12 są w dużym stopniu spójne.

9. Bibliografia

- Abu-Hamad S, Zaid H, Israelson A, Nahon E, Shoshan-Barmatz V (2008) Hexokinase-I protection against apoptotic cell death is mediated via interaction with the voltage-dependent anion channel-1: mapping the site of binding. *J Biol Chem.* 283:13482-13490.
- Abu-Hamad S, Arbel N, Calo D, Arzoine L, Israelson A, Keinan N, Ben-Romano R, Friedman O, Shoshan-Barmatz V (2009) The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J Cell Sci.* 122:1906-1916.
- Alexander HK, Booy EP, Xiao W, Ezzati P, Baust H, Los M (2007) Selected technologies to control genes and their products for experimental and clinical purposes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 55:139-149.
- Allen JF (2003) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358:19-37.
- Amodeo GF, Scorciapino MA, Messina A, De Pinto V, Ceccarelli M (2014) Charged residues distribution modulates selectivity of the open state of human isoforms of the voltage dependent anion-selective channel. *PLoS One.* 9(8).
- Anzell AR, Maizy R, Przyklenk K, Sanderson TH (2017) Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol.* 1-18.
- Arbel N, Shoshan-Barmatz V (2009) Voltage-dependent anion channel-1-based peptides interact with Bcl2 to prevent anti-apoptotic activity. *J Biol Chem.* 285:6053-6062.
- Arora KK, Pedersen PL (1988) Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem.* 263:17422-17428.
- Arzoine L, Zilberberg N, Ben-Romano R, Shoshan-Barmatz V (2009) Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with hexokinase to prevent its anti-apoptotic activity. *J Biol Chem.* 284:3946-3955.
- Azoulay-Zohar H, Aflalo C (1999) Binding of rat brain hexokinase to recombinant yeast mitochondria: identification of necessary molecular determinants. *J Bioenerg Biomembr.* 31:569-579.
- Barnard C (2011) Huntingtin protein and protein aggregation. Nguyen J [Online] <http://www.stanford.edu/group/hopes/cgi-bin/wordpress/2011/02/huntingtin-protein-and-protein-aggregation/> 17.05.13.
- Bates G (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet.* 361:1642-1644.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science.* 292:1552-1555.
- Ben-Hail D, Begas-Shvartz R, Shalev M, Shteinifer-Kuzmine A, Gruzman A, Reina S, De Pinto V, Shoshan-Barmatz V (2016) Novel Compounds Targeting the Mitochondrial Protein VDAC1 Inhibit Apoptosis and Protect against Mitochondrial Dysfunction. *J Biol Chem.* 291:24986-25003.
- Bergdoll L, Grabe M, Abramson J (2017) An Assessment of How VDAC Structures Have Impacted Our Understanding of their Function. Rostovtseva (red.), Molecular Basis for Mitochondrial Signaling (141-160). Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-55537-9.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:11-21.
- Bischof J, Salzmann M, Streubel MK, Hasek J, Geltinger F, Duschl J, Bresgen N, Briza P, Haskova D, Lejskova R, Sopjani M, Richter K, Rinnerthaler M (2017) Clearing the outer mitochondrial membrane from harmful proteins via lipid droplets. *Cell Death Discov.* 3:17016.
- Blachly-Dyson E, Song J, Wolfgang WJ, Colombini M, Forte M (1997) Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol Cell Biol.* 17:5727-5738.

- Blachly-Dyson E, Forte M (2001) VDAC channels. *IUBMB Life*. 52:113-118.
- Bocharova N, Chave-Cox R, Sokolov S, Knorre D, Severin F (2009) Protein aggregation and neurodegeneration: clues from a yeast model of Huntington's disease. *Biochemistry*. 74:231-234.
- Bordi M, Nazio F, Campello S (2017) The Close Interconnection between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Cancer. *Front Oncol*. 7:81.
- Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB (2008) Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci*. 31:609-616.
- Bragoszewski P, Turek M, Chacinska A (2017) Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system. *Open Biol*. 7(4).
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem*. 95:1521-1540.
- Braun RJ, Westermann B (2017) With the Help of MOM: Mitochondrial Contributions to Cellular Quality Control. *Trends Cell Biol*. 27:441-452.
- Butow RA, Avadhani NG (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell*. 14:1-15.
- Carter RL, Chen Y, Kunkanjanawan T, Xu Y, Moran SP, Putkhao K, Yang J, Huang AHC, Parnpai R, Chan AWS (2014) Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep*. 3:585-593.
- Carvalho C, Correia SC, Cardoso S, Plácido AI, Candeias E, Duarte AI, Moreira PI (2015) The role of mitochondrial disturbances in Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases. *Expert Rev Neurother*. 15:867-884.
- Chan AWS, Cheng P-H, Neumann A, Yang JJ (2010) Reprogramming Huntington monkey skin cells into pluripotent stem cells. *Cell Reprogram*. 12:509-517.
- Chang R, Liu X, Li S, Li XJ (2015) Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. *Drug Des Devel Ther*. 9:2179-2188.
- Checchetto V, Reina S, Magri A, Szabo I, De Pinto V (2014) Recombinant human voltage dependent anion selective channel isoform 3 (hVDAC3) forms pores with a very small conductance. *Cell Physiol Biochem*. 34:842-853.
- Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 301:513-517.
- Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet*. 13:1407-1420.
- Collins I, Wang H, Caldwell JJ, Chopra R (2017) Chemical approaches to targeted protein degradation through modulation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem J*. 474:1127-1147.
- Colombini M, Blachly-Dyson E, Forte M (1996) VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels*. 4:169-202.
- Colombini M (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem*. 256/257:107-115.
- Colombini M (2012) VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 1818:1457-1465.
- Cooper JK, Schilling G, Peters MF, Herring WJ, Sharp AH, Kaminsky Z, Masone J, Khan FA, Delanoy M, Borchelt DR, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (1998) Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet*. 7:783-790.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D (2006) Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*. 127:59-69.

- Dawson TM, Dawson VL (2017) Mitochondrial Mechanisms of Neuronal Cell Death: Potential Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 57:437-454.
- de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Deglon N (2002) Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci.* 22:3473-3483.
- De Pinto V, Reina S, Gupta A, Messina A, Mahalakshmi R (2016) Role of cysteines in mammalian VDAC isoforms' function. *Biochim Biophys Acta.* 1857:1219-1227.
- Deger JM, Gerson JE, Kaye R (2015) The interrelationship of proteasome impairment and oligomeric intermediates in neurodegeneration. *Aging Cell.* 14:715-724.
- del Toro D, Canals JM, Gines S, Kojima M, Egea G, Alberch J (2006) Mutant huntingtin impairs the post-Golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not its Val66 Met polymorphism. *J Neurosci.* 26:12748-12757.
- DeLano WL (2003) PyMOL Reference Manual. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA.
- Dihanich M, Suda K, Schatz G (1987) A yeast mutant lacking mitochondrial porin is respiratory-deficient, but can recover respiration with simultaneous accumulation of an 86-kd extramitochondrial protein. *EMBO J.* 6:723-728.
- Dominy JE, Puigserver P (2013) Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(7).
- Drabik K, Malińska D, Duszyński J, Szczepanowska J (2016) Mechanisms of mitochondrial transport and distribution within the cell. *Postepy Biochem.* 62:182-188.
- Duszyński J, Kozieł R, Brutkowski W, Szczepanowska J, Zabłocki K (2006) The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. *Biochim Biophys Acta.* 1757:380-387.
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 331:456-461.
- Eisenberg-Bord M, Schuldiner M (2017a) Mitochondria - If only we could be a fly on the cell wall. *Biochim Biophys Acta.* 1864:1469-1480.
- Eisenberg-Bord M, Schuldiner M (2017b) Ground control to major TOM: mitochondria-nucleus communication. *FEBS J.* 284:196-210.
- Elbaz-Alon, Rosenfeld-Gur E, Shinder V, Futerman AH, Geiger T, Schuldiner M (2014) A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev Cell.* 30:95-102.
- Ellenrieder L, Rampelt H, Becker T (2017) Connection of Protein Transport and Organelle Contact Sites in Mitochondria. *J Mol Biol.* 429:2148-2160.
- Faber PW, Alter JR, MacDonald ME, Hart AC (1999) Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:179-184.
- Fan J, Papadopoulos V (2013) Evolutionary Origin of the Mitochondrial Cholesterol Transport Machinery Reveals a Universal Mechanism of Steroid Hormone Biosynthesis in Animals. *PLoS One.* 8(10).
- Feyoux M, Bourgois-Rocha F, Redfern A, Giles P, Lefort N, Aubert S, Bonnefond C, Bugi A, Ruiz M, Deglon N, Jones L, Peschanski M, Allen ND, Perrier AL (2012) Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet.* 21:3883-3895.
- Finkbeiner S (2011) Huntington's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(6).
- Fischer A, Krzyzosiak WJ (2013) RNA toxicity in polyglutamine disorders: concepts, models, and progress of research. *J Mol Med (Berl).* 91:683-691.
- Forte M, Adelsberger-Mangan D, Colombini M (1987) Purification and characterization of the voltage-dependent anion channel from the outer mitochondrial membrane of yeast. *J Membr Biol.* 99:65-72.

- Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, Occhipinti A, Jagasia R, Petcherski A, Ruonala MO, Priault M, Salin B, Reichert AS (2012) Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta*. 1823:2297-2310.
- Frison M, Mallach AK, Kennedy E, Campanella M (2017) The 18 kDa Translocator Protein (TSPO): Cholesterol Trafficking and the Biology of a Prognostic and Therapeutic Mitochondrial Target. Rostovtseva (red.), *Molecular Basis for Mitochondrial Signaling* (285-315). Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-55537-9.
- Gałańska H, Budzińska M, Wojtkowska M, Kmita H (2008) Redox regulation of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: possible role of VDAC. *Arch Biochem Biophys*. 479:39-45.
- Gałańska H, Karachitos A, Baranek M, Budzińska M, Jordán J, Kmita H (2010a) Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells following exposure to H₂O₂ and protective effect of minocycline depend on the presence of VDAC. *Eur J Pharmacol*. 643:42-47.
- Gałańska H, Antoniewicz M, Budzińska M, Gałański L, Kmita H (2010b) VDAC contributes to mRNA levels in *Saccharomyces cerevisiae* cells by the intracellular reduction/oxidation state dependent and independent mechanisms. *J Bioenerg Biomembr*. 42:483-489.
- Gao J, Wang L, Liu J, Xie F, Su B, Wang X (2017) Abnormalities of Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 5:6(2).
- Gatliff J, East D, Crosby J, Abeti R, Harvey R, Craigen W, Parker P, Campanella M (2014) TSPO interacts with VDAC1 and triggers a ROS-mediated inhibition of mitochondrial quality control. *Autophagy*. 10:2279-2296.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*. 118:127-138.
- Geula S, Ben-Hail D, Shoshan-Barmatz V (2012) Structure-based analysis of VDAC1: N-terminus location, translocation, channel gating and association with anti-apoptotic proteins. *Biochem J*. 444:475-485.
- Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji AA, Los MJ (2013) Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*. 112:24-49.
- Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J (2013) Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox Biol*. 2:82-90.
- Godin JD, Poizat G, Hickey MA, Maschat F, Humbert S (2010) Mutant huntingtin-impaired degradation of β -catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *EMBO J*. 29:2433-2445.
- Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. (2016) Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neurosci Ther*. 23:5-22.
- Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, Andre VM, Wilburn B, Lu XH, Tao J, Yamazaki I, Li SH, Sun YE, Li XJ, Levine MS, Yang XW (2008) Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci*. 28:6182-6195.
- Grison A, Mantovani F, Comel A, Agostoni E, Gustincich S, Del Sala FPG (2011) Ser46 phosphorylation and prolyl-isomerase Pin1-mediated isomerization of p53 are key events in p53-dependent apoptosis induced by mutant huntingtin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:17979-17984.
- Guedes-Dias P, Pinho BR, Soares TR, de Proença J, Duchon MR, Oliveira JM (2016) Mitochondrial dynamics and quality control in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 90:51-57.
- Hamilton J, Pellman JJ, Brustovetsky T, Harris RA, Brustovetsky N (2015) Oxidative metabolism in YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 24:4862-4878.

- Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, Yang L, Kotin RM, Paulson HL, Davidson BL (2005) RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:5820-5825.
- Haun F, Nakamura T, Shiu AD, Cho DH, Tsunemi T, Holland EA, La Spada AR, Lipton SA (2013) S-nitrosylation of dynamin-related protein 1 mediates mutant huntingtin-induced mitochondrial fragmentation and neuronal injury in Huntington's disease. *Antioxid. Redox Signal*. 19:1173-1184.
- HD iPSC Consortium (2012) Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell*. 11:264-278.
- Heng MY, Tallaksen-Greene SJ, Detloff PJ, Albin RL (2007) Longitudinal evaluation of the Hdh(CAG)150 knock-in murine model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 27:8989-8998.
- Hersch SM, Rosas HD (2008) Neuroprotection for Huntington's disease: ready, set, slow. *Neurotherapeutics*. 5:226-236.
- Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR Jr, Ballinger S, Dell'Italia L, Jianhua Z, Darley-Usmar VM (2012) Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem*. 393:1485-1512.
- Hinsch KD, De Pinto V, Aires VA, Schneider X, Messina A, Hinsch E (2004) Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *J Biol Chem*. 279:15281-15288.
- Hoffner G, Kahlem P, Djian P (2002) *J Cell Sci*. 115:941-948.
- Homble F, Kmita H, Saidani H, Leonetti M (2017) Plant VDAC Permeability: Molecular Basis and Role in Oxidative Stress. Rostovtseva (red.), Molecular Basis for Mitochondrial Signaling (161-183). Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-55537-9.
- Hoogenboom BW, Suda K, Engel A, Fotiadis D (2007) The supramolecular assemblies of voltage dependent anion channels in the native membrane. *J Mol Biol*. 370:246-255.
- Hosaka T, Okazaki M, Kimura-Someya T, Ishizuka-Katsura Y, Ito K, Yokoyama S, Dodo K, Sodeoka M, Shirouzu M (2017) Crystal structural characterization reveals novel oligomeric interactions of human voltage-dependent anion channel 1. *Protein Sci*. 26:1749-1758.
- Howland DS, Munoz-Sanjuan I (2014) Mind the gap: models in multiple species needed for therapeutic development in Huntington's disease. *Mov Disord*. 29:1397-1403.
- Huang B, Schiefer J, Sass C, Landwehrmeyer GB, Kosinski CM, Kochanek S (2007) High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of huntingtin aggregate load in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*. 18:303-311.
- Hwang S, Disatnik M-H, Mochly-Rosen D (2015) Impaired GAPDH-induced mitophagy contributes to the pathology of Huntington's disease. *EMBO Mol Med*. 7:1307-1326.
- Igarashi S, Koide R, Shimohata T, Yamada M, Hayashi Y, Takano H, Date H, Oyake M, Sato T, Sato A, Egawa S, Ikeuchi T, Tanaka H, Nakano R, Tanaka K, Hozumi I, Inuzuka T, Takahashi H, Tsuji S (1998) Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch. *Nat Genet*. 18:111-117.
- Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC (2012) *Acta Physiol*. 204:277-287.
- Ismailoglu I, Chen Q, Popowski M, Yang L, Gross SS, Brivanlou AH (2014) Huntingtin protein is essential for mitochondrial metabolism, bioenergetics and structure in murine embryonic stem cells. *Dev Biol*. 391:230-240.
- Iwasawa R, Mahul-Mellier AL, Datler C, Pazarentzos E, Grimm S (2011) Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J*. 30:556-568.
- Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL (1998) Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons. *Neuron*. 21:633-642.

- Jacobsen JC, Bawden CS, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Reid SJ, Waldvogel HJ, MacDonald ME, Gusella JF, Walker SK, Kelly JM, Webb GC, Faull RL, Rees MI, Snell RG (2010) An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet.* 19:873-1882.
- Jacobsen JC, Gregory GC, Woda JM, Thompson MN, Coser KR, Murthy V, Kohane IS, Gusella JF, Seong IS, MacDonald ME, Shioda T, Lee JM (2011) HD CAG-correlated gene expression changes support a simple dominant gain of function. *Hum Mol Genet.* 20:2846-2860.
- Jarmuszkiewicz W, Woyda-Płoszczyca A (2008) Mitochondrialne białka rozprzegające: regulacja i rola fizjologiczna. *Postępy Biochemii.* 54:179-187.
- Johri A, Calingasan NY, Hennessey TM, Sharma A, Yang L, Wille E, Chandra A, Beal MF (2012a) Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 21:1124-1137.
- Johri A, Beal MF (2012) Antioxidants in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822:664-674.
- Johri A, Chandra A, Beal MF (2013) PGC-1 α , mitochondrial dysfunction and Huntington's disease. *Free Radic Biol Med.* 62:37-46.
- Juopperi TA, Kim WR, Chiang CH, Yu H, Margolis RL, Ross CA, Ming GL, Song H (2012) Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Mol Brain.* 5:17.
- Kaplan A i Stockwell BR (2012) Therapeutic approaches to preventing cell death in Huntington disease. *Prog Neurobiol.* 99:262-280.
- Karachitos A, Galganska H, Wojtkowska M, Budzinska M, Stobienia O, Bartosz G, Kmita H (2009) Cu,Zn-superoxide dismutase is necessary for proper function of VDAC in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Lett.* 583:449-455.
- Karachitos A, Gałgańska H, Kmita H (2010) Rola mitochondriów w patogenezie choroby Huntingtona. *Postępy Biochemii.* 56:174-181.
- Karachitos A, Grobys D, Kmita H (2015) VDAC as a Potential Target in Huntingtons Disease Therapy: The State of the Art. *Pharmaceut Reg Affairs.* 4:157.
- Karachitos A, Grobys D, Kulczyńska K, Sobusiak A, Kmita H (2016a) The Association of VDAC with Cell Viability of PC12 Model of Huntington's Disease. *Front Oncol.* 6:238.
- Karachitos A, Grobys D, Antoniewicz M, Jedut S, Jordan J, Kmita H (2016b) Human VDAC isoforms differ in their capability to interact with minocycline and to contribute to its cytoprotective activity. *Mitochondrion.* 28:38-48.
- Kazantsev A, Preisinger E, Dranovsky A, Goldgaber D, Housman D (1999) Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci.* 96:11404-11409.
- Khalil B, El Fissi N, Aouane A, Cabirol-Pol MJ, Rival T, Liévens JC (2015) PINK1-induced mitophagy promotes neuroprotection in Huntington's disease. *Cell Death Dis.* 6:e1617.
- Kim J, Moody JP, Edgerly CK, Bordiuk OL, Cormier K, Smith K, Beal MF, Ferrante RJ (2010) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 19:3919-3935.
- Kim HE, Grant AR, Simic MS, Kohnz RA, Nomura DK, Durieux J, Riera CE, Sanchez M, Kapernick E, Wolff S, Dillin A (2016) Lipid biosynthesis coordinates a mitochondrial-to-cytosolic stress response. *Cell.* 166:1539-1552.
- Koyuncu S, Fatima A, Gutierrez-Garcia R, Vilchez D (2017) Proteostasis of Huntingtin in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 18:e1568.
- Krammer E-M, Homblé F, Prévost M (2011) Concentration Dependent Ion Selectivity in VDAC: A Molecular Dynamics Simulation Study. *PLoS ONE.* 6:e27994.
- Krench M, Littleton T (2013) Modeling Huntington disease in *Drosophila*: Insights into axonal transport defects and modifiers of toxicity. *Fly (Austin).* 7:229-236.
- Krzysztoń-Russjan J, Zielonka D, Jackiewicz J, Kuśmirek S, Bubko I, Klimberg A, Marcinkowski JT, Anuszewska EL (2013) A study of molecular changes relating to energy metabolism and

cellular stress in people with Huntington's disease: looking for biomarkers. *J Bioenerg Biomembr.* 45:71-85.

Kubli DA, Gustafsson AB (2012) Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res.* 111:1208-1221.

Kurihara Y, Kanki T, Aoki Y, Hirota Y, Saigusa T, Uchiumi T, Kang D (2012) Mitophagy Plays an Essential Role in Reducing Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species and Mutation of Mitochondrial DNA by Maintaining Mitochondrial Quantity and Quality in Yeast. *J Biol Chem.* 287: 3265–3272.

Kusano H, Shimizu S, Koya RC, Fujita H, Kamada S, Kuzumaki N, Tsujimoto Y (2000) Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene.* 19:4807-4814.

Laowtammathron C, Cheng EC, Cheng P-H, Snyder BR, Yang SH, Johnson Z, Lorthongpanich C, Kuo HC, Parnpai R, Chan AW (2010) Monkey hybrid stem cells develop cellular features of Huntington's disease. *BMC Cell Biol.* 11:12.

Lee AC, Xu X, Blachly-Dyson E, Forte M, Colombini M (1998) The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. *J Membr Biol.* 161:173-181.

Lee JK, Mathews K, Schlaggar B, Perlmutter J, Paulsen JS, Epping E, Burmeister L, Nopoulos P (2012a) Measures of growth in children at risk for Huntington disease. *Neurology.* 79:668-674.

Lee DH, Gold R, Linker RA (2012b) Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and neurodegenerative diseases: therapeutic modulation via fumaric acid esters. *Int J Mol Sci.* 13:11783-11803.

Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Research.* 8:3-5.

Lemasters JJ, Holmuhamedov EL, Czerny C, Zhong Z, Maldonado EN (2012) Regulation of Mitochondrial Function by Voltage Dependent Anion Channels in Ethanol Metabolism and the Warburg Effect. *Biochim Biophys Acta.* 1818:1536-1544.

Lemeshko VV (2002) Model of the outer membrane potential generation by the inner membrane of mitochondria. *Biophys J.* 82:684-692.

Lemeshko VV (2014) VDAC electronics: 2. A new, anaerobic mechanism of generation of the membrane potentials in mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1838:1801-1808.

Leoni V, Caccia C (2015) The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *Biochim Biophys Acta.* 1851:1095-1105.

Li SH, Li XJ (2003) In Vitro Expression Systems for the Huntington Protein. Potter NT (red.), Neurogenetics. *Methods in Molecular Biology™* (217:277-284). Springer, Totowa, NJ. ISBN: 978-0-89603-990-2.

Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet.* 20:146-54.

Li XJ, Orr AL, Li S (2010) Impaired mitochondrial trafficking in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1802:62-65.

Lin CH, Tallaksen-Greene S, Chien WM, Cearley JA, Jackson WS, Crouse AB, Ren S, Li XJ, Albin RL, Detloff PJ (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 10:137-144.

Linden M, Karlsson G (1996) Identification of porin as a binding site for MAP2. *Biochem Biophys Res Commun.* 218:833-836.

Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E (2009) Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.* 16:899-909.

Liot G, Valette J, Pépin J, Flament J, Brouillet E (2017) Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. *Biochem Biophys Res Commun.* 483:1084-1095.

- Liu W, Goto J, Wang YL, Murata M, Wada K, Kanazawa I (2003) Specific inhibition of Huntington's disease gene expression by siRNAs in cultured cells. *Proc Japan Acad.* 79:293-298.
- Liu YF (1998) Expression of Polyglutamine-expanded Huntingtin Activates the SEK1-JNK Pathway and Induces Apoptosis in a Hippocampal Neuronal Cell Line. *J Biol Chem.* 273:28873-28877.
- Lo Sardo V, Zuccato C, Gaudenzi G, Vitali B, Ramos C, Tartari M, Myre MA, Walker JA, Pistocchi A, Conti L, Valenza M, Drung B, Schmidt B, Gusella J, Zeitlin S, Cotelli F, Cattaneo E (2012) An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10- Ncadherin. *Nat Neurosci.* 15:713-721.
- Lorincz MT, Zawistowski VA (2009) Expanded CAG repeats in the murine Huntington's disease gene increases neuronal differentiation of embryonic and neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 40:1-13.
- Lou S, Lepak VC, Eberly LE, Roth B, Cui W, Zhu XH, Öz G, Dubinsky JM (2016) Oxygen consumption deficit in Huntington disease mouse brain under metabolic stress. *Hum Mol Genet.* 25:2813-2826.
- Machida Y, Okada T, Kurosawa M, Oyama F, Ozawa K, Nukina N (2006) rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 343:190-197.
- Majumder P, Raychaudhuri S, Chattopadhyay B, Bhattacharyya NP (2007) Increased caspase-2, calpain activations and decreased mitochondrial complex II activity in cells expressing exogenous huntingtin exon 1 containing CAG repeat in the pathogenic range. *Cell Mol Neurobiol.* 27:1127-1145.
- Maldonado EN, Patnaik J, Mullins MR, Lemasters JJ (2010) Free Tubulin Modulates Mitochondrial Membrane Potential in Cancer Cells. *Cancer Res.* 70:10192-10201.
- Maldonado EN, Sheldon KL, DeHart DN, Patnaik J, Manevich Y, Townsend DM, Bezrukov SM, Rostovtseva TK, Lemasters JJ (2013) *J Biol Chem.* 288:11920-11929.
- Maldonado EN (2017a) VDAC-Tubulin, an Anti-Warburg Pro-Oxidant Switch. *Front Oncol.* 7:4.
- Maldonado EN, DeHart DN, Lemasters JJ (2017b) Voltage-Dependent Anion Channels and Tubulin: Bioenergetic Controllers in Cancer Cells. Rostovtseva (red.), *Molecular Basis for Mitochondrial Signaling* (121-140). Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-55537-9.
- Malia TJ, Wagner G (2007) NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry.* 46:514-25.
- Manczak M, Reddy PH (2015) Mitochondrial division inhibitor 1 protects against mutant huntingtin-induced abnormal mitochondrial dynamics and neuronal damage in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 24:7308-7325.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Leach H, Davies SW, Bates GP (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell.* 87:493-506.
- Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD (2016) The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:8590578.
- Marambaud P, Dreses-Werringloer U, Vingtdoux V (2009) Calcium signaling in neurodegeneration, *Molecular Neurodegeneration* 4, [Online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689218/>, 17.05.13.
- Marelli C, Maschat F (2016) The P42 peptide and Peptide-based therapies for Huntington's disease. *Orphanet J Rare Dis.* 11:24.
- Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D, Cuervo AM (2010) Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci.* 13:567-576.

- Matilainen O, Quirós PM, Auwerx J (2017) Mitochondria and Epigenetics - Crosstalk in Homeostasis and Stress. *Trends Cell Biol.* 27:453-463.
- Maurya SR, Mahalakshmi R (2015) N-helix and cysteines inter-regulate human mitochondrial VDAC-2 function and biochemistry. *J Biol Chem.* 290:30240–30252.
- Maurya SR, Mahalakshmi R (2016) VDAC-2: Mitochondrial outer membrane regulator masquerading as a channel? *FEBS J.* 283:1831-1836.
- McCommis KS, Baines CP (2012) The role of VDAC in cell death: Friend or foe? *Biochim Biophys Acta.* 1818:1444-1450.
- McCourt AC, Jakobsson L, Larsson S, Holm C, Piel S, Elmér E, Björkqvist M (2016) White Adipose Tissue Browning in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS One.* 11:e0159870.
- Mena NP, Urrutia PJ, Lourido F, Carrasco CM, Núñez MT (2015) Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Mitochondrion.* 21:92-105.
- Menalled LB, Sison JD, Wu Y, Olivieri M, Li XJ, Li H, Zeitlin S, Chesselet MF (2002) Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice. *J Neurosci.* 22:8266-8276.
- Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF (2003) Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol.* 465:11-26.
- Messina A, Reina S, Guarino F, De Pinto V (2012) VDAC isoforms in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 1818:1466-1476.
- Michel AH, Kornmann B (2012) The ERMES complex and ER–mitochondria connections. *Biochem Soc Trans.* 40:445-450.
- Mitra S, Tsvetkov AS, Finkbeiner S (2009) Single neuron ubiquitin-proteasome dynamics accompanying inclusion body formation in huntington disease. *J Biol Chem.* 284:4398-403.
- Mochel F, Haller RG (2011) Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J Clin Invest.* 121:493-499.
- Mochly-Rosen D, Disatnik MH, Qi X (2014) The challenge in translating basic research discoveries to treatment of Huntington disease. *Rare Dis.* 2:e28637.
- Morton AJ, Howland DS (2013) Large genetic animal models of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis.* 2:3-19.
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 417:1-13.
- Naia L, Ferreira IL, Cunha-Oliveira T, Duarte AI, Ribeiro M, Rosenstock TR, Laço MN, Ribeiro MJ, Oliveira CR, Saudou F, Humbert S, Rego AC (2015) Activation of IGF-1 and insulin signaling pathways ameliorate mitochondrial function and energy metabolism in Huntington's Disease human lymphoblasts. *Mol. Neurobiol.* 51:331-348.
- Nevzglyadova OV, Kuznetsova IM, Mikhailova EV, Artamonova TO, Artemov AV, Mittenberg AG, Kostyleva EI, Turoverov KK, Khodorkovskii MA, Soidla TR (2011) The effect of red pigment on the amyloidization of yeast proteins. *Yeast.* 28:505-526.
- Ni HM, Williams JA, Ding WX (2015) Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol.* 4:6-13.
- Nicolas G, Devys D, Goldenberg A, Maltête D, Hervé C, Hannequin D (2011) Juvenile Huntington disease in an 18-month-old boy revealed by global developmental delay and reduced cerebellar volume. *Am J Med Genet A.* 155:815-818.
- Nickel A, Kohlhaas M, Maack C (2014) Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol.* 73:26-33.
- Noskov SY, Rostovtseva TK, Chamberlin AC, Teijido O, Jiang W, Bezrukov SM (2016) Current state of theoretical and experimental studies of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *Biochim Biophys Acta.* 1858:1778-1790.

- Nunnari J, Suomalainen A (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 148: 1145–1159.
- O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M, Poyton RO (2004) Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem*. 279:51817-51827.
- Okamoto K, Kondo-Okamoto N (2012) Mitochondria and autophagy: Critical interplay between the two homeostats. *Biochim Biophys Acta*. 1820:595-600.
- Okazaki M, Kurabayashi K, Asanuma M, Saito Y, Dodo K, Sodeoka M (2015) VDAC3 gating is activated by suppression of disulfide-bond formation between the N-terminal region and the bottom of the pore. *Biochim Biophys Acta*. 1848:3188-3196.
- Oliveira JM (2010) Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. *J Neurochem*. 114:1-12.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 12:913-922.
- Orr AL, Li S, Wang CE, Li H, Wang J, Rong J, Xu X, Mastroberardino PG, Greenamyre JT, Li XJ (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J Neurosci*. 28:2783-2792.
- Palfi S, Brouillet E, Jarraya B, Bloch J, Jan C, Shin M, Conde F, Li XJ, Aebischer P, Hantraye P, Deglon N (2007) Expression of mutated huntingtin fragment in the putamen is sufficient to produce abnormal movement in non-human primates. *Mol Ther*. 15:1444-1451.
- Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N (2015) Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death Differ*. 22:1399–1401.
- Pandey M, Mohanakumar KP, Usha R (2010) Mitochondrial functional alterations in relation to pathophysiology of Huntington's disease. *J Bioenerg Biomembr*. 42:217-226.
- Park JH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A (2008) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 134:877–886.
- Pastorino JG, Hoek JB (2008) Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr*. 40:171–182.
- Paulson HL, Perez MK, Trottier Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH, Pittman RN (1997) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*. 19:333-344.
- Peixoto PM, Dejean LM, Kinnally KW (2012) The therapeutic potential of mitochondrial channels in cancer, ischemia-reperfusion injury, and neurodegeneration. *Mitochondrion*. 12:14-23.
- Pesaresi P, Schneider A, Kleine T, Leister D (2007) Interorganellar communication. *Curr Opin Plant Biol*. 10:600-606.
- Poleti MD, Tesch AC, Crepaldi CR, Souza GH, Eberlin MN, de Cerqueira César M (2009) Relationship between expression of voltage-dependent anion channel (VDAC) isoforms and type of hexokinase binding sites on brain mitochondria. *J Mol Neurosci*. 41:48-54.
- Polyzos AA, McMurray CT (2017) The chicken or the egg: mitochondrial dysfunction as a cause or consequence of toxicity in Huntington's disease. *Mech Ageing Dev*. 161:181-197.
- Putkhao K, Kocerha J, Cho I-K, Yang J, Parnpai R, Chan AW (2013) Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's disease. *Stem Cells Dev*. 22:1198-1205.
- Qiu J, Tan YW, Hagenston AM, Martel MA, Kneisel N, Skehel PA, Wyllie DJ, Bading H, Hardingham GE (2013) Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nat Commun*. 4:2034.
- Raymond LA (2014) Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington's disease. *Drug Discov Today*. 19:990-996.

- Reddy PH, Mao P, Manczak M (2009) Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain Res Rev.* 61:33-48.
- Reddy PH, Shirendeb UP (2012) Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1822:101-110.
- Reina S, Saletti VCR, Gupta A, Chaturvedi D, Guardiani C, Guarino F, Scorciapino MA, Magri A, Foti S, Ceccarelli M, Messina A A, Mahalakshmi R, Szabo I, De Pinto V (2016a) VDAC3 as a sensor of oxidative state of the intermembrane space of mitochondria: the putative role of cysteine residue modifications. *Oncotarget.* 7:2249-2268.
- Reina S, Guarino F, Magri A, De Pinto V (2016b) VDAC3 As a Potential Marker of Mitochondrial Status Is Involved in Cancer and Pathology. *Front Oncol.* 6:264.
- Ring KL, An MC, Zhang N, O'Brien RN, Ramos EM, Gao F, Atwood R, Bailus BJ, Melov S, Mooney SD, Coppola G, Ellerby LM (2015) Genomic Analysis Reveals Disruption of Striatal Neuronal Development and Therapeutic Targets in Human Huntington's Disease Neural Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 5:1023-1038.
- Rostovtseva TK, Bezrukov SM (2008) VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *J Bioenerg Biomembr.* 40:163-170.
- Ross JM, Olson L, Coppotelli G (2015) Mitochondrial and ubiquitin proteasome system dysfunction in ageing and disease: two sides of the same coin? *Int J Mol Sci.* 16:19458-19476.
- Rui YN, Xu Z, Patel B, Cuervo AM, Zhang S (2015) HTT/Huntingtin in selective autophagy and Huntington disease: A foe or a friend within? *Autophagy.* 11:858-860.
- Sahin E, DePinho RA (2012) Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:397-404.
- Sampson MJ, Decker WK, Beaudet AL, Ruitenbeek W, Armstrong D, Hicks MJ, Craigen WJ (2001) Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J Biol Chem.* 276:39206-39212.
- Santello M, Volterra A (2009) Synaptic modulation by astrocytes via Ca²⁺-dependent glutamate release. *Neuroscience.* 158:253-259.
- Schein SJ, Colombini M, Finkelstein A (1976) Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol.* 30:99-120.
- Schiffer NW, Broadley SA, Hirschberger T, Tavan P, Kretzschmar HA, Giese A, Haass C, Hartl FU, Schmid B (2007) Identification of anti-prion compounds as efficient inhibitors of polyglutamine protein aggregation in a zebrafish model. *J Biol Chem.* 282:9195-203.
- Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuc JA, Slunt HH, Ratovitski T, Cooper JK, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Ross CA, Borchelt DR (1999) Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet.* 8:397-407.
- Schredelseker J, Paz A, López CJ, Altenbach C, Leung CS, Drexler MK, Chen JN, Hubbell WL, Abramson J (2014) High resolution structure and double electron-electron resonance of the zebrafish voltage-dependent anion channel 2 reveal an oligomeric population. *J Biol Chem.* 289:12566-12577.
- Schwarz TL (2013) Mitochondrial Trafficking in Neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(6).
- Schwarzer C, Barnikol-Watanabe S, Thinnies FP, Hilschmann N (2002) Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol.* 34:1059-1070.
- Segref A, Kevei É, Pokrzywa W, Schmeisser K, Mansfeld J, Livnat-Levanon N, Ensauer R, Glickman MH, Ristow M, Hoppe T (2014) Pathogenesis of human mitochondrial diseases is modulated by reduced activity of the ubiquitin/proteasome system. *Cell Metab.* 19:642-652.
- Shaw CS, Jones DA, Wagenmakers AJ (2008) Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres. *Histochem Cell Biol.* 129:65-72.

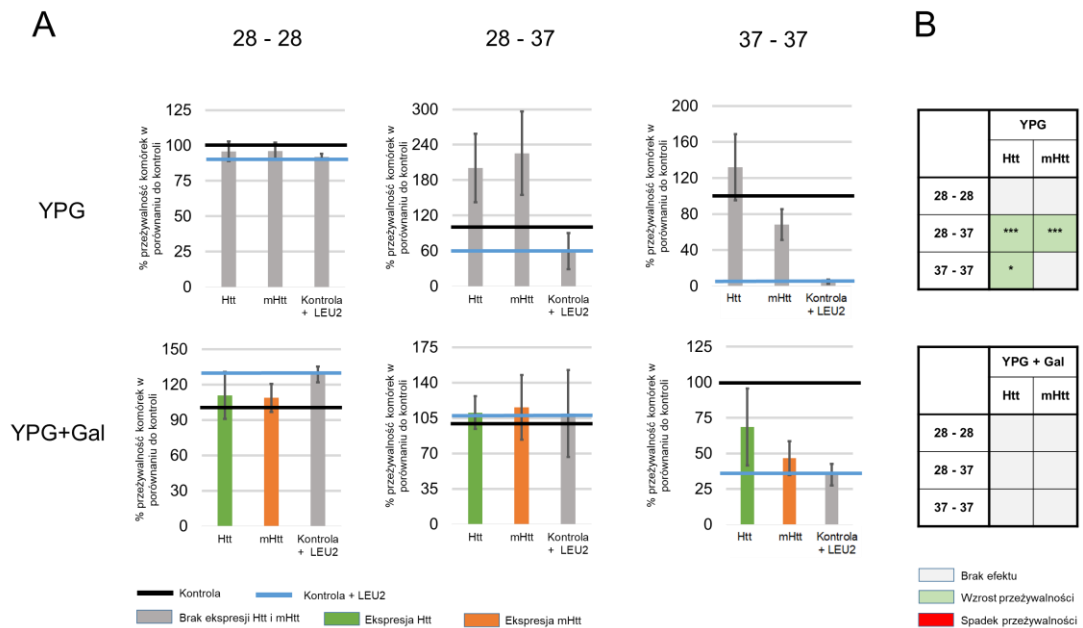
- Sheftel AD, Zhang AS, Brown C, Shirihai OS, Ponka P (2007) Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood*. 110:125-132.
- Shelbourne PF, Killeen N, Hevner RF, Johnston HM, Tecott L, Lewandoski M, Ennis M, Ramirez L, Li Z, Iannicola C, Littman DR, Myers RM (1999) A Huntington's disease CAG expansion at the murine Hdh locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Hum Mol Genet*. 8:763-774.
- Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, MacDonald M, Yankner B, Yuan J (2006) Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem*. 281:14474-14485.
- Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y (2000) BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Nat Acad Sci USA*. 97:3100-3105.
- Shin JH, Ko HS, Kang H, Lee Y, Lee YI, Pletinkova O, Troconso JC, Dawson VL, Dawson TM (2011) PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*. 144:689-702.
- Shirasaki DI, Greiner ER, Al-Ramahi I, Gray M, Boontheung P, Geschwind DH, Botas J, Coppola G, Horvath S, Loo JA, Yang XW (2012) Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron*. 75:41-57.
- Shirendeb UP, Reddy AP, Manczak M, Calkins MJ, Mao P, Tagle DA, Reddy PH (2011) Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Hum Mol Genet*. 20:1438-1455.
- Shirendeb UP, Calkins MJ, Manczak M, Anekonda V, Dufour B, McBride JL, Mao P, Reddy PH (2012) Mutant Huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 21:406-420.
- Shoshan-Barmatz V, Israelson A (2005) The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmicreticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol*. 204:57-66.
- Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS (2006) The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des*. 12:2249-2270.
- Shoshan-Barmatz V, Arbel N, Arzoine L (2008a). VDAC, the voltage-dependent anion channel: function, regulation mitochondria signaling in cell life and death. *Cell Sci*. 4:74-118.
- Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N (2010) VDAC, a multifunctional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med*. 31:227-285.
- Shoshan-Barmatz V, Golan M (2012) Mitochondrial VDAC1: function in cell life and death and a target for cancer therapy. *Curr Med Chem*. 19:714-735.
- Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D, Admoni L, Krelm Y, Tripathi SS. (2015) The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochim Biophys Acta*. 1848:2547-2575.
- Shoshan-Barmatz V, Krelm Y, Shteinfein-Kuzmine A (2017) VDAC1 functions in Ca²⁺ homeostasis and cell life and death in health and disease. *Cell Calcium*. 30105-30107.
- Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, Oh R, Bissada N, Hossain SM, Yang YZ, Li XJ, Simpson EM, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR (2003) Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet*. 12:1555-1567.
- Solans A, Zambrano A, Rodríguez M, Barrientos A (2006) Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Hum Mol Genet*. 15:3063-3081.

- Solesio ME, Saez-Atienzar S, Jordan J, Galindo MF (2017) 3-Nitropropionic acid induces autophagy by forming mitochondrial permeability transition pores rather than activating the mitochondrial fission pathway. *Br J Pharmacol.* 168:63-75.
- Song W, Chen J, Petrilli A, Liot G, Klinglmayr E, Zhou Y, Poquiz P, Tjong J, Pouladi MA, Hayden MR, Masliah E, Ellisman M, Rouiller I, Schwarzenbacher R, Bossy B, Perkins G, Bossy-Wetzel E (2011) Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat Med.* 17:377-382.
- Soubannier V, McLelland GL, Zunino R, Braschi E, Rippstein P, Fon EA, McBride HM (2012a) A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr Biol.* 22:135-141.
- Stoy N, Mackay GM, Forrest, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG (2005) Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem.* 93:611-623.
- Su J, Liu J, Yan XY, Zhang Y, Zhang JJ, Zhang LC, Sun LK (2017) Cytoprotective Effect of the UCP2-SIRT3 Signaling Pathway by Decreasing Mitochondrial Oxidative Stress on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci.* 18(7).
- Sugiyama T, Shimizu S, Matsuoka Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y (2002) Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene.* 21:4944-4956.
- Szymański J, Janikiewicz J, Michalska B, Patalas-Krawczyk P, Perrone M, Ziolkowski W, Duszyński J, Pinton P, Dobrzyń A, Więckowski MR (2017) Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *Int J Mol Sci.* 18(7).
- Tajeddine N, Galluzzi L, Kepp O, Hangen E, Morselli E, Senovilla L, Araujo N, Pinna G, Larochette N, Zamzami N, Modjtahedi N, Harel-Bellan A, Kroemer G (2008) Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. *Oncogene.* 10:4221-4232.
- Tereshchenko A, McHugh M, Lee JK, Gonzalez-Alegre P, Crane K, Dawson J, Nopoulos P (2015) Abnormal Weight and Body Mass Index in Children with Juvenile Huntington's Disease. *J Huntingt Dis.* 4:231-238.
- Truant R, Atwal RS, Desmond C, Munsie L, Tran T (2008) Huntington's disease: revisiting the aggregation hypothesis in polyglutamine neurodegenerative diseases. *FEBS J.* 275:4252-4262.
- Trushina E, Dyer RB, Badger JD II, Ure D, Eide L, Tran DD, Vrieze BT, Legendre-Guillemain V, McPherson PS, Mandavilli BS, Van Houten B, Zeitlin S, McNiven M, Aebersold R, Hayden M, Parisi JE, Seeburg E, Dragatsis I, Doyle K, Bender A, Chacko C, McMurray CT (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol.* 24:8195-8209.
- Tsoi H, Chan HY (2014) Roles of the nucleolus in the CAG RNA-mediated toxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1842:779-84.
- Túnez I, Sánchez-López F, Agüera E, Fernández-Bolaños R, Sánchez FM, Tasset-Cuevas I (2011) Important role of oxidative stress biomarkers in Huntington's disease. *J Med Chem.* 54:5602-5606.
- Usdin K, House NCM, Freudenreich CH (2015) Repeat instability during DNA repair: Insights from model systems. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 50:142-167.
- Vendramin R, Marine JC, Leucci E (2017) Non-coding RNAs: the dark side of nuclear-mitochondrial communication. *EMBO J.* 36:1123-1133.
- Venkatraman P, Wetzel R, Tanaka M, Nukina N, Goldberg AL (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell.* 14:95-104.
- Villena JA (2015) New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J.* 282:647-672.
- von Horsten S, Schmitt I, Nguyen HP, Holzmann C, Schmidt T, Walther T, Bader M, Pabst R, Kobbe P, Krotova J, Stiller D, Kask A, Vaarmann A, Rathke-Hartlieb S, Schulz JB, Grasshoff U,

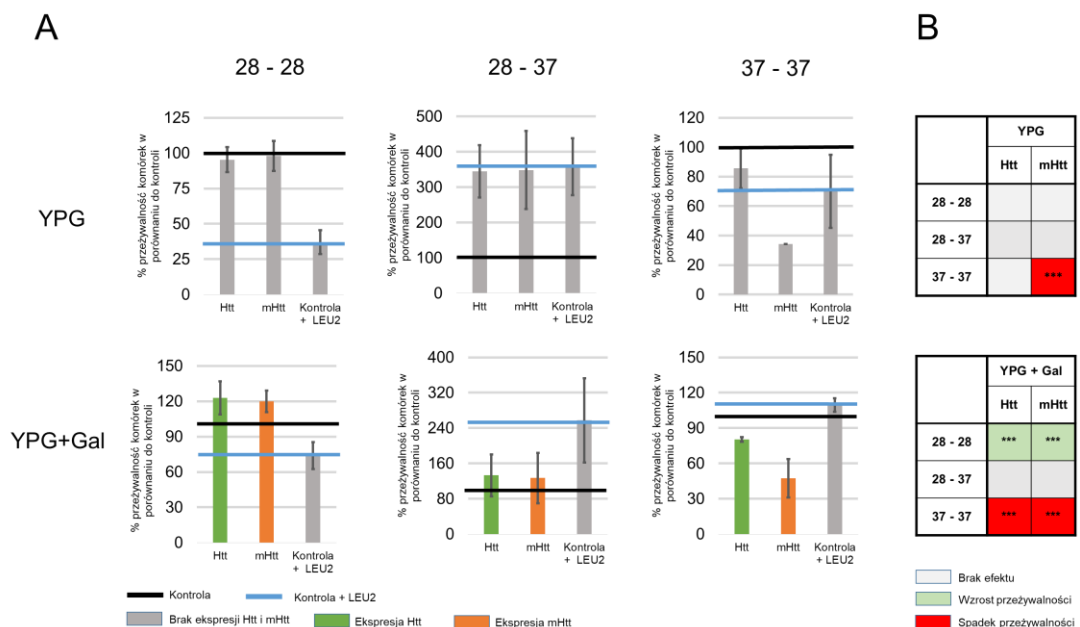
- Bauer I, Vieira-Saecker AM, Paul M, Jones L, Lindenberg KS, Landwehrmeyer B, Bauer A, Li XJ, Riess O (2003) Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 12:617-624.
- Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 137:413-431.
- Vysokikh MY, Zorova L, Zorov D, Heimlich G, Jurgensmeier J, Schreiner D, Brdiczka D (2004) The intra-mitochondrial cytochrome c distribution varies correlated to the formation of a complex between VDAC and the adenine nucleotide translocase: this affects Bax-dependent cytochrome c release. *Biochim Biophys Acta.* 1644:27-36.
- Walther TC, Farese RV Jr (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem.* 81:687-714.
- Wang, CE, Tydlacka S, Orr AL, Yang SH, Graham RK, Hayden MR, Li S, Chan AW, Li XJ (2008) Accumulation of N-terminal mutant huntingtin in mouse and monkey models implicated as a pathogenic mechanism in Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 17:2738-2751.
- Wang X, Su B, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009a) The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2009, 109:153-159.
- Wang H, Lim PJ, Karbowski M, Monteiro MJ (2009) Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Hum Mol Genet.* 18:737-752.
- Wang R, Ross CA, Cai H, Cong WN, Daimon CM, Carlson OD, Egan JM, Siddiqui S, Maudsley S, Martin B (2014) Metabolic and hormonal signatures in pre-manifest and manifest Huntington's disease patients. *Front. Physiol.* 5:231.
- Wang W, Zhang F, Li L, Tang F, Siedlak SL, Fujioka H, Liu Y, Su B, Pi Y, Wang X (2015) MFN2 Couples Glutamate Excitotoxicity and Mitochondrial Dysfunction in Motor Neurons. *J Biol Chem.* 290:168-182.
- Wang Z, Figueiredo-Pereira C, Oudot C, Vieira HL, Brenner C (2017) Mitochondrion: A Common Organelle for Distinct Cell Deaths? *Int Rev Cell Mol Biol.* 331:245-287.
- Wasilewski M, Chojnacka K, Chacińska A (2016) Mitochondrial proteins - import, export, degradation. *Postepy Biochem.* 62:94-102.
- Westermann B (2012) Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta.* 1817:1833-1838.
- Weydt P, Soyal SM, Gellera C, Didonato S, Weidinger C, Oberkofler H, Landwehrmeyer GB, Patsch W (2009) The gene coding for PGC-1alpha modifies age at onset in Huntington's Disease. *Mol Neurodegener.* 4:3.
- Wheeler VC, Auerbach W, White JK, Srinidhi J, Auerbach A, Ryan A, Duyao MP, Vrbanc V, Weaver M, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME (1999) Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum Mol Genet.* 8:115-22.
- Wheeler VC, White JK, Gutekunst CA, Vrbanc V, Weaver M, Li XJ, Li SH, Yi H, Vonsattel JP, Gusella JF, Hersch S, Auerbach W, Joyner AL, MacDonald ME (2000) Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 9:503-513.
- Wiatr K, Szlachcic WJ, Trzeciak M, Figlerowicz M, Figiel M (2017) Huntington Disease as a Neurodevelopmental Disorder and Early Signs of the Disease in Stem Cells. *Mol Neurobiol.* 1-21.
- Wong YC, Holzbaur EL (2014) The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *J Neurosci.* 34:1293-1305.
- Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet.* 9:383-395.
- Wytenbach A, Swartz J, Kita H, Thykjaer T, Carmichael J, Bradley J, Brown R, Maxwell M, Schapira A, Orntoft TF, Kato K, Rubinstein DC (2001) Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 10:1829-1845.

- Xu X, Forbes JG, Colombini M (2001) Actin modulates the gating of *Neurospora crassa* VDAC. *J Membr Biol.* 180:73–81.
- Yamamoto T, Yamada A, Watanabe M, Yoshimura Y, Yamazaki N, Yoshimura Y, Yamauchi T, Kataoka M, Nagata T, Terada H, Shinohara Y (2006) VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. *J Proteome Res.* 5:3336-3344.
- Yang SH, Cheng PH, Banta H, Piotrowska-Nitsche K, Yang JJ, Cheng EC, Snyder B, Larkin K, Liu J, Orkin J, Fang ZH, Smith Y, Bachevalier J, Zola SM, Li SH, Li XJ, Chan AW (2008) Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature.* 453:921-924.
- Yang D, Wang CE, Zhao B, Li W, Ouyang Z, Liu Z, Yang H, Fan P, O'Neill A, Gu W, Yi H, Li S, Lai L, Li XJ (2010) Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum Mol Genet.* 19:3983-3994.
- Yohrling IV GJ, Jiang GC-T, DeJohn MM, Miller DW, Young AB, Vrana KE, Cha JH (2003) Analysis of cellular, transgenic and human models of Huntington's disease reveals tyrosine hydroxylase alterations and substantia nigra neuropathology. *Brain Res Mol Brain Res.* 119:28-36.
- Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:9-14.
- Young MJ, Bay DC, Hausner G, Court DA (2007) The evolutionary history of mitochondrial porins. *BMC Evol Biol.* 7:31.
- Yu ZX, Li SH, Evans J, Pillarisetti A, Li H, Li XJ (2003) Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci.* 23:2193-2202.
- Yuan J, Zhang Y, Sheng Y, Fu X, Cheng H, Zhou R (2015) MYBL2 guides autophagosome suppressor VDAC2 in the developing ovary to inhibit autophagy through a complex of VDAC2-BECN1- BCL2L1 in mammals. *Autophagy.* 11:1081-1098.
- Yun J, Finkel T (2014) Mitohormesis. *Cell Metab.* 19:757-766.
- Yu-Taeger L, Petrasch-Parwez E, Osmand AP, Redensek A, Metzger S, Clemens LE, Park L, Howland D, Calaminus C, Gu X, Pichler B, Yang XW, Riess O, Nguyen HP (2012) A Novel BACHD Transgenic Rat Exhibits Characteristic Neuropathological Features of Huntington Disease. *J Neurosci.* 32:15426-15438.
- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem.* 265:16330-16336.
- Zeth K (2010) Structure and evolution of mitochondrial outer membrane proteins of beta-barrel topology. *Biochim Biophys Acta.* 1797:1292-1299.
- Zhang YX, Zhao W, Tang YJ (2016) Multilevel induction of apoptosis by microtubule-interfering inhibitors 4β-S-aromatic heterocyclic podophyllum derivatives causing multi-fold mitochondrial depolarization and PKA signaling pathways in HeLa cells. *Oncotarget.* 7:24303-24313.
- Zhao T, Hong Y, Li XJ, Li SH (2016) Subcellular Clearance and Accumulation of Huntington Disease Protein. *Front Mol Neurosci.* 9:27.
- Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E (2010) Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev.* 90:905-981.

Załącznik



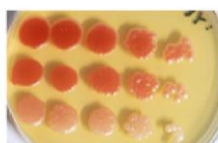
Rysunek 36. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek z ekspresją hVDAC2 w warunkach braku ekspresji (YPG) oraz ekspresji Htt i mHtt (YPG+Gal). A - porównanie wyników z otrzymanymi dla komórek bez wprowadzonego marera *LEU2*, przedstawione jako % przeżywalności komórek; B - Analiza statystyczna otrzymanych wyników, wykonana dwustronnym testem t-Studenta na podstawie 3-5 powtórzeń. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. 28-28, 28-37, 37-37 (temperatura hodowli w pożywkach płynnych – temperatura hodowli na pożywkach stałych).



Rysunek 37. Wpływ ekspresji Htt i mHtt na przeżywalność komórek z ekspresją hVDAC3 w warunkach braku ekspresji (YPG) oraz ekspresji Htt i mHtt (YPG+Gal). A - porównanie wyników z otrzymanymi dla komórek bez wprowadzonego marera *LEU2*, przedstawione jako % przeżywalności komórek; B - Analiza statystyczna otrzymanych wyników, wykonana dwustronnym testem t-Studenta na podstawie 3-5 powtórzeń. Istotność statystyczną oznaczano: * przy $p < 0,05$; ** przy $p < 0,01$; *** przy $p < 0,001$. 28-28, 28-37, 37-37 (temperatura hodowli w pożywkach płynnych – temperatura hodowli na pożywkach stałych).

YPG+Gal

WT
WTQ25
WTQ103



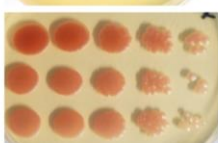
Δ por1T4hVDAC1
 Δ por1T4hVDAC1Q25
 Δ por1T4hVDAC1Q103



Δ por1T4hVDAC2
 Δ por1T4hVDAC2Q25
 Δ por1T4hVDAC2Q103



Δ por1T4hVDAC3
 Δ por1T4hVDAC3Q25
 Δ por1T4hVDAC3Q103



28°C

37°C

Rysunek 38. Wpływ temperatury na kolor kolonii drożdży *S.cerevisiae*.