

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



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

Praca doktorska

Maria Małgorzata Kawalec

Promotor:

Prof. dr hab. Barbara Zabłocka

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. Małgorzata Beręsewicz

Warszawa 2016

Streszczenie

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

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

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

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

Mitofuzyna 2 jest białkiem o aktywności GTPazy, kodowanym przez genom jądrowy, ale zlokalizowanym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, gdzie, wraz z Mfn1, uczestniczy

w procesie fuzji mitochondriów. Mfn2 występuje także na powierzchni siateczki śródplazmatycznej (ER), umożliwiając tworzenie połączeń pomiędzy ER a mitochondriami, przez co wpływa na szereg procesów związanych z uwalnianiem lub pobieraniem jonów wapnia. Dotychczasowe badania wykazały, że zahamowaniu ekspresji genu Mfn2 towarzyszą zaburzenia morfologii i metabolizmu mitochondriów, objawiające się m.in. obniżeniem aktywności łańcucha oddechowego oraz nagromadzeniem mutacji w mitochondrialnym DNA (mtDNA).

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

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

Na podstawie przeprowadzonej analizy porównawczej trzech typów komórek MEF zadecydowano, że ocena stosunku ilości mtDNA/nDNA zostanie wykorzystana do dalszych badań nad patogennością mutacji Mfn2. Decyzję oparto o spostrzeżenie, że stosunek mtDNA/nDNA był znacznie obniżony w komórkach MEF^{Mfn1-/-Mfn2/-} w odniesieniu do MEFwt, a nadekspresja prawidłowego genu Mfn2 podnosiła istotnie wartość stosunku mtDNA/nDNA. Jednocześnie wykorzystanie mtDNA do oceny patogenności mutacji Mfn2 było podyktowane próbą wyboru parametru, który można przedstawić w bezwzględnych wartościach liczbowych, nieobarczonych subiektywną oceną badacza.

W związku z pozytywną weryfikacją hipotezy o stosunkowo niskiej ekspresji Mfn1 w nerwach obwodowych stosunek ilości mtDNA/nDNA oceniano w komórkach, w których nie

dochodzi do ekspresji genu Mfn1, mianowicie MEF^{Mfn1-/-Mfn2-/-}. Zarówno analiza ilości mRNA, jak i immunoreaktywności białka Mfn1 i Mfn2 w wybranych narządach myszy wykazały, że stosunek Mfn1/Mfn2 był najniższy w zwojach czuciowych, reprezentujących obwodowy układ nerwowy w stosunku do pozostałych badanych struktur układu nerwowego (kora mózgu, mózdzek, rdzeń kręgowy), jak i narządów (serce, wątroba, nerka, mięsień szkieletowy, skóra).

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

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

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

Abstract

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

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

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

Considering Mfn2 function and localization in the cell, cellular bioenergetics as well as mitochondrial features were investigated. It was observed that both, Mfn2 and Mfn1/2 gene knockout in MEFs causes metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis.

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

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

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

The mtDNA/nDNA ratio was investigated in MEFs after over-expression of wt-Mfn2 gene and Mfn2 with mutations recognized in Polish families with CMT2A: c.281G>A (Arg94Gln, R94Q), c.748C>T (Arg250Trp, R250W) and c.1198C>T (Arg400X, R400X). R94Q is one of the most common Mfn2 gene mutations observed in unrelated CMT2A patients. R94Q and R250W are point mutations located close to the GTPase domain of Mfn2 and within, respectively. The R400X mutation is also a point mutation, however it results in premature stop-codon. Therefore Mfn2^{R400X} lacks transmembrane motifs as well as HR2 domain, which participates in mitofusins tethering during mitochondrial fusion. Polish

patient carrying both mutation R250W/R400X developed CMT2A symptoms, while his parents and sibling, who carry only one mutation, have no clinical symptoms so far.

Over-expression of wtMfn2 in Mfn1/2-null MEFs restored mtDNA/nDNA ratio from 0.43 ± 0.11 to 0.74 ± 0.04 and this result seems to confirm presumed connexion between Mfn2 and mtDNA in the cell. While over-expression of Mfn2^{R94Q} and Mfn2^{R250W} increased mtDNA/nDNA ratio to 0.64 ± 0.11 and 0.65 ± 0.24 respectively, Mfn2^{R400X} did not changed mtDNA/nDNA ratio in Mfn1/2-null MEFs.

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