

Streszczenie

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest chorobą genetyczną sprzężoną z chromosomem X spowodowaną mutacjami w genie kodującym dystrofinę, białko, które pełni ważną rolę w utrzymywaniu integralności błony komórkowej komórek mięśniowych. Brak tego białka prowadzi do postępującego osłabienia mięśni, natomiast w późniejszych etapach choroby jest także związany z niewydolnością oddechową i kardiomiopatią, która jest główną przyczyną śmierci chorych na DMD. Mechanizm jej rozwoju nie został jeszcze dokładnie poznany, a zatem celem tej pracy było zbadanie molekularnego podłoża kardiomiopatii u pacjentów z DMD.

W niniejszej pracy jako model badawczy wykorzystano kardiomiocyty uzyskane z ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSC-CM). W tym celu pobrano próbki krwi od dwóch zdrowych dawców i jednego dawcy chorego na DMD, z których wyizolowano monojądrzaste komórki krwi obwodowej i poddano je reprogramowaniu z wykorzystaniem wektorów Sendai. Następnie, wyprowadzono trzy pary izogenicznych linii indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSC) poprzez wprowadzenie mutacji w genie *DMD* (delecji eksonu 50) w kontrolnych komórkach hiPSC uzyskanych od dwóch zdrowych dawców oraz naprawę mutacji w genie *DMD* w komórkach uzyskanych od dawcy chorego na DMD poprzez zastosowanie systemu do edycji genów CRISPR/Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9)*). Wszystkie linie hiPSC poddano dokładnej charakterystyce potwierdzającej ich pluripotencję oraz optymalizacji warunków różnicowania do kardiomiocytów.

Pierwszym celem pracy było przeprowadzenie globalnych analiz transkryptomu i proteomu komórek DMD hiPSC-CM w porównaniu do ich kontrolnych odpowiedników. Te analizy ujawniły kilka zmienionych ścieżek molekularnych oraz procesów w obrębie cytoszkieletu, błony komórkowej i macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest bezpośrednim efektem braku dystrofiny. Co ciekawe, wyniki te wykazały zmiany w ekspresji genów oraz/lub poziomu białka czynników zaangażowanych w metabolizm wapnia, stres oksydacyjny oraz dysfunkcję serca. Ponadto, zaobserwowano obniżony poziom białka mitoNEET, kodowanego przez gen *CISD1*. Ponieważ funkcje tego białka w kardiomiocytach dystroficznych nigdy nie zostały opisane w literaturze, to poddano je bardziej szczegółowemu zbadaniu. Białko to jest zaangażowane w regulację homeostazy żelaza w komórkach, w związku z czym sprawdzono poziom wolnego żelaza w cytoplazmie i mitochondriach kardiomiocytów pozbawionych

dystrofiny i wykazano, że poziom ten jest zwiększony zarówno w cytoplazmie jak i w mitochondriach tych komórek. Jednocześnie, obniżony poziom ferroportyny oraz zwiększony poziom ferrytyny w komórkach DMD hiPSC-CM są innymi cechami charakterystycznymi dla przeładowania żelaza. Jednym z głównych efektów przeładowania żelaza jest zwiększony poziom stresu oksydacyjnego oraz produkcji reaktywnych form tlenu (ROS). W naszych badaniach, produkcja ROS ma tendencję do wzrostu w komórkach DMD hiPSC-CM i komórki te wykazują znacząco zwiększony poziom Nrf-2 i oksydoreduktazy NAD(P)H chinonowej 1, białek odpowiedzialnych za utrzymanie odpowiedniego statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego. Co ciekawe, wykazaliśmy, że poziom produkcji ROS może być bezpośrednim efektem zawartości żelaza w komórkach, ponieważ stymulacja komórek chelatorem żelaza - deferoksaminą, skutkowała tendencją do zmniejszenia poziomu produkcji ROS, podczas gdy stymulacja żelazem zwiększyła ich poziom w komórkach DMD hiPSC-CM. Analiza ultrastruktury dystroficznych kardiomiocytów z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *transmission electron microscopy* - TEM) uwidoczniała obszary zdegenerowanych mitochondriów z uszkodzoną strukturą grzebieni mitochondrialnych.

W następnym etapie, zbadaliśmy efekty funkcjonalne zaburzenia metabolizmu wapniowego w komórkach DMD hiPSC-CM poprzez pomiary oscylacji wapniowych. Opisano kilka patologicznych cech tych oscylacji, takich jak zwiększona liczba oscylacji o przedłużonym plateau, obniżona częstotliwość oscylacji oraz zwiększony odsetek występowania długich przerw pomiędzy oscylacjami. Zaburzenia w homeostazie wapniowej są też prawdopodobnie związane z obserwowaną zwiększoną sztywnością komórek DMD hiPSC-CM. Z drugiej strony, pomiary patch-clamp pojedynczych kardiomiocytów dystroficznych wykazały podwyższone wartości hiperpolaryzacji następczej oraz obniżony czas trwania potencjału czynnościowego przy 20% repolaryzacji w porównaniu do komórek kontrolnych.

Następnym celem pracy było sprawdzenie roli utrofiny w kardiomiopatii związanej z DMD. Utrofina jest białkiem o dużym podobieństwie strukturalnym i funkcjonalnym do dystrofiny, a zatem postawiono hipotezę, że może przynajmniej częściowo kompensować brak dystrofiny. Przeprowadzono wiele badań z wykorzystaniem tzw. mikroutrofiny, której dostarczenie do komórek wiązało się z korzystnym efektem terapeutycznym u myszy *mdx*, jednak jej rola w sercu i kardiomiocytach nigdy nie została poznana. W niniejszym badaniu zbadano wpływ zarówno nokautu utrofiny, jak i aktywacji utrofiny w komórkach DMD hiPSC-CM.

Kardiomiocyty uzyskane poprzez różnicowanie komórek hiPSC mają niedojrzały fenotyp i, jak pokazano w naszych badaniach, wciąż posiadają ekspresję utrofiny. Wszystkie badania *in vitro* z wykorzystaniem dystroficznych komórek hiPSC-CM mogą być w pewien sposób zniekształcone ze względu na obecność utrofiny. W niniejszym badaniu, sprawdzono czy brak zarówno dystrofiny jak i utrofiny upośledza fenotyp komórek hiPSC-CM w porównaniu do komórek pozbawionych jedynie ekspresji dystrofiny. Co ciekawe, zaobserwowaliśmy znaczące pogorszenie parametrów oscylacji wapniowych, natomiast żadnych większych oznak takiego pogorszenia w przypadku parametrów potencjału czynnościowego i sztywności komórek. Ta rozbieżność może być wytłumaczona lokalizacją utrofiny w kardiomiocytach, która oprócz błony komórkowej, zlokalizowana jest także w dyskach interkalarnych (jak wykazano wcześniej w mysim sercu). Może ona zatem wpływać na przewodzenie sygnału skutkując zaobserwowanymi nieprawidłowościami w oscylacjach wapniowych, natomiast nie upośledzać właściwości elektrofizjologicznych pojedynczej komórki.

Naszym następnym celem było sprawdzenie, czy aktywacja ekspresji utrofiny w komórkach DMD hiPSC-CM może poprawić ich nieprawidłowy fenotyp. W celu aktywowania ekspresji utrofiny, zastosowano system CRISPR/dCas9 do aktywacji transkrypcyjnej opartej o nieaktywne katalitycznie białko Cas9 oraz domenę aktywacyjną VP64 oraz wektory AAV (ang. *adeno-associated virus*). Komórki DMD hiPSC-CM z aktywowaną utrofiną poddano pomiarom patch-clamp, które wykazały przywrócenie wartości hiperpolaryzacji następczej (podwyższonych w komórkach DMD hiPSC-CM) do poziomu komórek kontrolnych.

Podsumowując, komórki hiPSC-CM są pożytecznym narzędziem w badaniach nad kardiomiopatią związaną z DMD. Globalne analizy transkryptomowe i proteomowe dystroficznych kardiomiocytów wykazały zmiany w kilku szlakach ważnych z punktu widzenia prawidłowego funkcjonowania serca (metabolizm wapniowy, stres oksydacyjny). Uzyskane dane uwiaryściły także znaczący poziom przeładowania żelaza w cytoplazmie i mitochondriach komórek DMD hiPSC-CM. Ta obserwacja nie została nigdy wcześniej opisana, natomiast może ona dostarczyć nowych możliwości terapeutycznych, związanych np. z zastosowaniem chelatorów żelaza. Brak utrofiny w komórkach DMD hiPSC-CM pogarsza właściwości oscylacji wapniowych, natomiast nie wpływa na potencjał czynnościowy pojedynczych kardiomiocytów, podczas gdy aktywacja utrofiny przywraca odpowiedni poziom AHP w komórkach DMD hiPSC-CM.