

Mgr Katarzyna Chabros

Zespół Chorób Nerwowo-Mięśniowych

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Summary of the doctoral dissertation "Pathogenicity of mutations in the *GDAP1* gene"

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

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

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

In the study group of 14 patients from 9 families affected by CMT-GDAP1 disease, additional rare sequence variants were found in other "CMT genes" following the whole exome

sequencing analysis. As "CMT genes" in this work, we accept genes related to pure CMT polyneuropathy and genes related to selected hereditary syndromes in which peripheral polyneuropathy is present. Interestingly, in patients with autosomal dominant *GDAP1* mutations, an average of 2 times more sequence variants were identified compared to patients with autosomal recessive mutations. A correlation was observed between the genotype and the clinical phenotype of the studied patients.

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

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

Mgr Katarzyna Chabros

Zespół Chorób Nerwowo-Mięśniowych

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. „Patogenność mutacji w genie *GDAP1*”

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

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

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

W badanej grupie 14 pacjentów pochodzących z 9 rodzin dotkniętych chorobą CMT-GDAP1, po przeprowadzeniu analizy sekwencjonowania całego egzomu, stwierdzono obecność dodatkowych rzadkich wariantów sekwencji w innych „genach CMT”. Jako „geny CMT” w niniejszej pracy przyjmujemy geny związane z czystą (ang., *pure*) polineuropatią CMT, jak i geny związane z wybranymi dziedzicznymi zespołami, w których występuje polineuropatia obwodowa. Co ciekawe, u pacjentów z mutacjami w genie *GDAP1*, dziedziczonymi w sposób autosomalny dominujący zidentyfikowano średnio 2 razy więcej wariantów sekwencji w porównaniu do pacjentów z mutacjami dziedziczonymi w sposób autosomalny recesywny. Zaobserwowano korelację pomiędzy genotypem, a fenotypem klinicznym badanych chorych.

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

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