

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK

Marta Urszula Tomczyk

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Metabolizm nukleotydów i przemiany energetyczne w sercu
w eksperymentalnym modelu płasawicy Huntingтона**

Ph.D. THESIS

**Cardiac nucleotides and energy metabolism in an experimental
model of Huntington's disease**



GDAŃSK 2019

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Issued with the consent of
Dean of the Medical Faculty

Katedra i Zakład Biochemii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Department of Biochemistry
Medical University of Gdansk

Promotor/Supervisor
prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński

Promotor pomocniczy/Associated supervisor
dr Michał Mielcarek

Pragnę podziękować

*mojemu Promotorowi, **Panu Profesorowi Ryszardowi Tomaszowi Smoleńskiemu** za opiekę merytoryczną, przekazanie pasji do pracy naukowej i wiarę w moje możliwości.*

*mojemu Promotorowi pomocniczemu, **Panu Doktorowi Michałowi Mielcarkowi** za opiekę merytoryczną, pomoc w przeprowadzeniu badań oraz wskazanie niezmiernie ciekawej tematyki badań jaką jest płasawica Huntingtona.*

***Pani dr. hab. Ewie Słomińskiej** za okazane ciepło, pomoc oraz cenne wskazówki.*

***Współautorom prac** za pomoc w badaniach będących podstawą publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską.*

***Koleżankom i kolegom z Katedry i Zakładu Biochemii** za codzienny uśmiech, wsparcie i motywację do działania.*

***Mężowi, Synkowi oraz Rodzicom** za troskę, pomoc, zrozumienie i ciągłą motywację w dążeniu do obranych przeze mnie celów.*

Marta Tomczyk,

Gdańsk 2019

Badania wykonano w ramach realizacji projektów Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (TEAM/2011-8/7), Narodowego Centrum Nauki (PRELUDIUM 2015/17/N/NZ4/02841) oraz zadania badawczego młodych naukowców finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MN 01-0243/08/256) w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanej przez prof. Juliana Świerczyńskiego (do 09/2016) oraz prof. Ryszarda T. Smoleńskiego (od 10/2016).

This research has been performed within the projects supported by the Foundation for Polish Science (TEAM/2011-8/7), National Science Centre of Poland (PRELUDIUM 2015/17/N/NZ4/02841), and the Polish Ministry of Science and Higher Education (MN 01-0243/08/256) at the Department of Biochemistry, Medical University of Gdansk, headed by prof. Julian Swierczynski (untill 09/2016) and prof. Ryszard T. Smolenski (from 10/2016).

1.	WYKAZ SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS.....	7
2.	WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/LIST OF PAPERS INCLUDED IN PH.D. THESIS.....	8
3.	STRESZCZENIE.....	9
4.	ABSTRACT.....	10
5.	WSTĘP	11
5.1.	Podstawowe aspekty patologii płasawicy Huntingтона.....	11
5.1.1.	Kardiomiopatia towarzysząca płasawicy Huntingтона.....	12
5.2.	Przemiany energetyczne i metabolizm nukleotydów w sercu.....	13
5.2.1.	Metabolizm nukleotydów adeninowych w sercu.....	15
6.	CEL PRACY.....	16
7.	MODELE I METODY DOŚWIADCZALNE.....	17
8.	NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ	18
8.1.	Analiza metabolizmu energetycznego i przemian nukleotydów w sercach eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingтона.	18
8.2.	Analiza zmian metabolizmu energetycznego i preferencji substratowej mięśni szkieletowych eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingтона i porównanie ich do zmian zaobserwowanych w sercu.	23
8.3.	Analiza stężeń metabolitów nukleotydów w surowicy eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingтона oraz w osoczu pacjentów z zaawansowaną płasawicą Huntingтона.	28
8.4.	Analiza metabolizmu energetycznego oraz szlaku przemian nukleotydów adeninowych w komórkowym modelu płasawicy Huntingтона.	30
9.	WNIOSKI	33
10.	PERSPEKTYWY	34
11.	INTRODUCTION	35
11.1.	Basic aspects of Huntington's disease pathology.....	35
11.1.1.	Huntington's disease related cardiomyopathy.....	36
11.2.	Cardiac energy and nucleotides metabolism	37
11.2.1.	Cardiac adenine nucleotides metabolism.....	38
12.	AIMS	40
13.	EXPERIMENTAL MODELS AND METHODS.....	41
14.	MOST IMPORTANT RESULTS.....	41
14.1.	Analysis of cardiac energy and nucleotide metabolism in experimental models of Huntington's disease.....	42
14.2.	Analysis of energy metabolism and substrate preference in skeletal muscle of experimental models of Huntington's disease and its comparison to the changes observed in the heart.	47
14.3.	Analysis of nucleotide metabolites concentration in experimental models of Huntington's disease serum and Huntington's disease patients plasma.	52

14.4.	Analysis of energy and nucleotide metabolism in the cellular model of Huntington's disease.	54
15.	CONCLUSIONS	56
16.	PERSPECTIVES	57
17.	PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES	58
18.	ZAŁĄCZNIKI/ APPENDICES:.....	61

1. WYKAZ SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS

ADA	- deaminaza adenozyiny/ <i>adenosine deaminase</i>
ADP	- adenozyino-5'-difosforan / <i>adenosine-5'-diphosphate</i>
AK	- kinaza adenylanowa/ <i>adenylate kinase</i>
AMP	- adenozyino-5'-monofosforan / <i>adenosine-5'-monophosphate</i>
AMPD	- deaminaza AMP/ <i>AMP deaminase</i>
AMPK	- kinaza zależna od AMP/ <i>AMP- activated protein kinase</i>
ATP	- adenozyino-5'-trifosforan/ <i>adenosine-5'-triphosphate</i>
ATPaza	- adenozyino-5'-trifosfataza/ <i>adenosine-5'-triphosphatase</i>
BCAA	- aminokwasy o rozgałęzionych łańcuchach/ <i>branched chain amino acids</i>
CBP	- białko wiążące czynnik transkrypcyjny CREB/ <i>CREB-binding protein</i>
CK	- kinaza kreatynowa/ <i>creatine kinase</i>
e5NT	- ekto-5'-nukleotydaza/ <i>ecto-5'-nucleotidase</i>
eADA	- ekto-deaminaza adenozyiny/ <i>ecto-adenosine deaminase</i>
EDL	- <i>Extensor digitorum longus/ Extensor digitorum longus</i>
eNTPD	- ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa/ <i>ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase</i>
HD	- płasawica Huntingtona/ <i>Huntington's disease</i>
HTT	- huntingtina/ <i>huntingtin</i>
IMP	- inozynomonofosforan/ <i>inosine monophosphate</i>
iPSC	- indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste/ <i>induced pluripotent stem cells</i>
mHTT	- zmutowana forma huntingtyny/ <i>mutant huntingtin</i>
mTORC1	- kompleks kinazy 1 ssaczego celu dla rapamycyny/ <i>mammalian target of rapamycin kinase complex 1</i>
NAD ⁺	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy/ <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	- zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego/ <i>nicotinamide adenine dinucleotide reduced form</i>
PCr	- fosfokreatyna/ <i>phosphocreatine</i>
PPAR γ	- receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów gamma/ <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PNP	- fosforylaza nukleozydów purynowych/ <i>purine nucleoside phosphorylase</i>
TA	- <i>Tibialis anterior/ Tibialis anterior</i>
5NT	- 5'-nukleotydaza/ <i>5'-nucleotidase</i>

2. WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/LIST OF PAPERS

- A. **Toczek M.**, Zielonka D., Zukowska P., Marcinkowski J.T., Slominska E., Isalan M., Smolenski R.T, Mielcarek M. (2016) An impaired metabolism of nucleotides underpins a novel mechanism of cardiac remodeling leading to Huntington's disease related cardiomyopathy. *Biochimica Et Biophysica Acta- Molecular Basis of Disease*, 1862 (11): 2147-2157.

IF= 5.158

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 40.000

- B. Mielcarek M.*, **Toczek M.***, Smeets C. J.L.M., Franklin S.A., Bondulich M. K., Jolinon N., Muller T., Ahmed M., Dick J.R.T., Piotrowska I., Greensmith L., Smolenski R.T., Bates G.P. (2015) HDAC4-myogenin axis as an important marker of HD-related skeletal muscles atrophy. *PLoS Genetics*, 11(3) : e1005021.* współautorstwo/equal contribution.

IF= 7.170

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 45.000

- C. **Toczek M.**, Kutryb-Zajac B., Zukowska P., Slominska E., Isalan M., Mielcarek M., Smolenski R.T. (2016) Changes in cardiac nucleotide metabolism in Huntington's disease. *Nucleotides, nucleosides and nucleic acids*; 35(10/12): 707-712.

IF= 0.868

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 15.000

- D. **Toczek M.**, Pierzynowska K., Kutryb-Zajac B., Gaffke L., Slominska E.M., Wegrzyn G., Smolenski R.T. (2018) Characterization of adenine nucleotide metabolism in the cellular model of Huntington's disease. *Nucleotides, nucleosides and nucleic acids*; 37(11): 630-638.

IF =0.831

Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego / Ministry of Science and Higher Education Score = 15.000

Łączna wartość współczynnika IF prezentowanych prac/Total IF of presented papers =14.027

Łączna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego prezentowanych prac/ Total Ministry of Science and Higher Education Score: 115.00

3. STRESZCZENIE

Choroba Huntingtona (HD) jest dziedziczną chorobą neurodegeneracyjną, której przyczynę stanowi wydłużenie powtórzeń CAG w obrębie genu huntingtyny (*HTT*), co prowadzi do tworzenia agregatów zmutowanej HTT (mHTT), znaku rozpoznawczego molekularnej patologii HD. Badania kliniczne pacjentów dotkniętych tym schorzeniem oraz badania doświadczalne z użyciem mysich modeli HD wykazały współistniejące wraz z procesem neurodegeneracyjnym zaburzenia układu mięśniowego oraz sercowo-naczyniowego.

Celem pracy było zbadanie metabolizmu energetycznego oraz przemian nukleotydów adeninowych w sercu w eksperymentalnym modelu HD. W badaniach wykorzystano dwa mysie modele HD (szczep R6/2 oraz *HdhQ150*), osocze pacjentów z HD w zaawansowanym stadium choroby oraz komórkowy model HD (komórki HEK 293T transfekowane plazmidem zawierającym 74 powtórzeń CAG w obrębie genu *Htt*). Zastosowane techniki badawcze obejmowały wysokosprawną chromatografię cieczową, spektrometrię mas, testy enzymatyczne oraz immunoenzymatyczne, a także metody biologii molekularnej.

W sercach mysich modeli HD w porównaniu do kontroli zaobserwowano obniżone stężenie fosfokreatyny, adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), puli dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD^+) oraz obniżony stosunek ATP do adenozyno-5'-difosforanu (ADP) i NADH do NAD^+ . Odnotowano również podwyższony stopień fosforylacji kinazy zależnej od adenozyno-5'-monofosforanu (AMP) oraz zmianę preferencji substratowej serca (zwiększony udział glukozy w metabolizmie energetycznym). W porównaniu do zwierząt kontrolnych, serca myszy szczepu R6/2 charakteryzowały się zmianami aktywności enzymów przemian nukleotydów adeninowych tj. zmniejszoną aktywnością deaminazy AMP (AMPD) oraz ekto-5'-nukleotyduazy (e5NT), a także podwyższoną aktywnością deaminazy adenozyny (ADA). Mięśnie szkieletowe (*Soleus*, *Tibialis anterior* oraz *Extensor digitorum longus*) mysich modeli HD również cechowały się zaburzeniami metabolizmu energetycznego podobnymi do zmian zaobserwowanymi w sercu (tj. obniżone stężenie fosfokreatyny, ATP oraz NAD^+), a także zmniejszonym utlenianiem glukozy. Ponadto zaobserwowano znaczący wzrost stężeń katabolitów nukleotydów tj. hipoksantyny oraz urydyny zarówno w surowicy mysich modeli HD jak i w osoczu pacjentów z zaawansowaną HD. Badania *in vitro* potwierdziły zmiany zaobserwowane w mysich modelach HD. Wykazały m.in. obniżone wewnątrzkomórkowe stężenie ATP, podwyższoną aktywność ADA oraz zmniejszoną aktywność enzymów zaangażowanych w zewnątrzkomórkowy katabolizm nukleotydów adeninowych tj. ekto-difosfohydrolazy trifosfonukleozydowej (eNTPD), ekto-5'-nukleotyduazy (e5NT), ekto-deaminazy adenozyny (eADA) w modelu linii komórkowej HD.

Zaburzenia przemian energetycznych i metabolizmu nukleotydów mogą mieć szczególne znaczenie w patologii kardiomiopatii towarzyszącej HD. Dodatkowo zaobserwowane we krwi pacjentów z HD zaburzenia metaboliczne wskazywać mogą na nowe biomarkery.

4. ABSTRACT

Huntington's Disease (HD) is an inherited neurodegenerative disease, which is caused by the elongation of CAG repeats within the huntingtin gene (*HTT*), that leads to the formation of mutant HTT aggregates (mHTT), a hallmark of molecular pathology in HD. Clinical research in HD patients and experimental studies with HD mice models demonstrated HD related myopathies, coexisting with the neurodegenerative process.

The aim of the study was the evaluation of cardiac energy and adenine nucleotide metabolism in HD mice experimental models. Two HD mice models (strain R6/2 and *Hdh*Q150), plasma of HD patients in an advanced stage of the disease and an HD cellular model (HEK 293T cells transfected with a plasmid containing 74 CAG repeats within the *Htt* gene) were used in the study. The research techniques included high performance liquid chromatography, mass spectrometry, enzymatic and immunoenzymatic tests as well as molecular biology methods.

Concentrations of phosphocreatine, adenosine 5'-triphosphate (ATP) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) pool, as well as reduced ratios of ATP to adenosine-5'-diphosphate (ADP) and NADH to NAD⁺, were observed in HD mice models hearts as compared to controls. Furthermore, increased phosphorylation of adenosine-5'-monophosphate (AMP) activated protein kinase (AMPK) and a change in cardiac substrate preference (decreased glucose use in energy metabolism) were noted. Compared to control animals, R6/2 mice hearts were characterized by changes in activities of enzymes involved in adenine nucleotide catabolism, i.e. decreased AMP deaminase (AMPD) and ecto-5'-nucleotidase (e5NT) activity, as well as increased adenosine deaminase (ADA) activity. HD mice models skeletal muscle (*Soleus*, *Tibialis anterior* and *Extensor digitorum longus*) were also characterized by energy metabolism changes similar to that observed in the heart (i.e. reduced concentration of phosphocreatine, ATP as well as reduced glucose oxidation). In addition, a significant increase in the concentration of nucleotides catabolites, i.e. hypoxanthine and uridine, was observed in both HD mice models serum and HD patients plasma. *In vitro* studies confirmed the changes observed in HD mice models. Decreased intracellular ATP concentration, elevated ADA activity and decreased activity of enzymes involved in extracellular catabolism of adenine nucleotides, i.e. ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (eNTPD), ecto-5'-nucleotidase (e5NT), ecto-adenosine deaminase (eADA) in HD cellular model was underlined.

Disruption of energy and nucleotide metabolism may be important in the pathology of Huntington's disease related cardiomyopathy. In addition, metabolic abnormalities observed in HD patients' blood may highlight new biomarkers.

5. WSTĘP

5.1. Podstawowe aspekty patologii płasawicy Huntingtona

Płasawica Huntingtona (ang. Huntington's disease (HD)) jest neurodegeneracyjną chorobą centralnego układu nerwowego, dziedziczną w sposób autosomalny dominujący. Choroba ta klinicznie objawia się występowaniem zaburzeń poznawczych, psychicznych oraz motorycznych.¹ Jednym z najwcześniejszych objawów ruchowych choroby Huntingtona jest płasawica (łac. *chorea*), czyli mimowolne ruchy przypominające taniec. Pacjenci z HD charakteryzują się również bradykinezją (spowolnieniem ruchowym). Kolejnym objawem HD jest dystonia, czyli występowanie nienaturalnie powolnych, przedłużonych skurczów mięśni, które powodują powtarzające się ruchy skrętne dotyczące różnych części ciała.² Podsumowując, objawy ruchowe choroby Huntingtona stanowią kombinację płasawicy, bradykinezji i dystonii, które w widoczny sposób wpływają na postawę, równowagę i chód pacjentów z HD. Często występują również zaburzenia okoruchowe. Wraz z rozwojem choroby, mowa pacjenta z HD staje się niewyraźna, mogą pojawić się trudności z połykaniem, które z kolei prowadzić mogą do utraty masy ciała.³

Oprócz zaburzeń ruchowych, choroba Huntingtona powoduje zmiany osobowości i nastroju. Najczęściej objawiają się one depresją, apatią, niepokojem, drażliwością, wybuchami gniewu, impulsywnością, zespołami obsesyjno-kompulsywnymi, zaburzeniami snu i wycofywaniem się z życia społecznego.⁴ Cechą charakterystyczną choroby Huntingtona są również zaburzenia zdolności poznawczych, które wpływają na problemy z rozumieniem, rozumowaniem oraz pamięcią. Do zaburzeń zdolności poznawczych w HD zaliczamy: powolniejsze myślenie, problemy z koncentracją, organizacją, planowaniem, podejmowaniem decyzji, odpowiadaniem na pytania; występują również kłopoty z pamięcią krótkotrwałą, jak i ograniczone umiejętności rozwiązywania problemów oraz przyjmowania i rozumienia nowych informacji.²

Częstość występowania HD w Europie szacuje się na 5 do 10 przypadków na 100 000 osób. U osób dorosłych pierwsze objawy pojawiają się między 30 a 50 rokiem życia. Przyczyną HD jest występowanie wielokrotnych powtórzeń sekwencji nukleotydowej CAG w obrębie genu huntingtyny (*HTT*) zlokalizowanym na chromosomie 4, które skutkują wydłużeniem fragmentu poliglutaminowego w białku HTT. Liczba powtórzeń sekwencji nukleotydowej CAG w populacji osób zdrowych waha się od 6 do 35, natomiast obecność powyżej 36 powtórzeń stanowi przyczynę HD. W przypadku osób, u których występuje od 36 do 39 powtórzeń CAG w obrębie genu *HTT* objawy choroby mogą być zredukowane bądź całkowicie niezauważalne.¹

Huntingtina (HTT) to wielodomenowe białko o wielkości 348 kDa, którego największą ilość wykazano w mózgu.^{5,6} Jego obecność wykazano także poza układem nerwowym, w narządach takich jak mięśnie szkieletowe czy serce.³ Dane dostępne w piśmiennictwie wykazują, iż wydłużenie fragmentu poliglutaminowego w eksonie 1 *HTT* prowadzi do powstawania nierozpuszczalnych agregatów huntingtyny, które to obserwuje się zarówno we wczesnym jak i zaawansowanym stadium choroby.⁷ Agregaty

zmutowanej formy HTT (mHTT) zostały zidentyfikowane w mózgu jak i poza ośrodkowym układem nerwowym m.in. w mięśniach szkieletowych.⁸ Biorąc pod uwagę lokalizację subkomórkową, obecność HTT zaobserwowano w jądrze komórkowym, retikulum endoplazmatycznym, aparacie Golgiego czy też endosomach.⁹⁻¹¹ Wykazano, iż HTT oddziałuje z białkami zaangażowanymi w transkrypcję genów (np. białko wiążące czynnik transkrypcyjny CREB (CBP)), sygnalizację wewnątrzkomórkową (np. białko HIP14), transport wewnątrzkomórkowy (np. białko HIP1, HAP1), endocytozę i metabolizm (np. fosfoproteina PACSIN 1, receptor wiążący witaminę D, wątrobowy receptor X).^{12,13} Jednakże ścieżki biochemiczne, przez które mHTT powoduje dysfunkcję, a co za tym idzie śmierć komórki, pozostają niejasne. W piśmiennictwie sugeruje się, że istotną rolę pełnią zaburzenia metabolizmu energetycznego wywołane dysfunkcją mitochondriów.¹⁴⁻¹⁶

Wykazano, iż pacjenci cierpiący na HD poza obecnością licznych zaburzeń motorycznych i psychicznych cechują się również zmniejszoną (o około 50%) siłą mięśniową w porównaniu do osób zdrowych.¹⁷ Za jedną z możliwych przyczyn zaburzonej funkcji mięśni szkieletowych w HD uważa się pogorszenie metabolizmu energetycznego. Mięśnie szkieletowe pacjentów z HD charakteryzują się dysfunkcją metabolizmu oksydacyjnego.¹⁸ Badania na mysich modelach eksperymentalnych wykazały ponadto, że mitochondria wyizolowane z mięśnia czworogłowego mysiego modelu R6/2 cechowały się obniżoną aktywnością kompleksów łańcucha oddechowego.¹⁹ Zaobserwowano również zwiększoną produkcję substratów energetycznych takich jak mleczan i octan, co również potwierdza obecność zaburzeń metabolizmu oksydacyjnego.²⁰ Hodowle komórek mięśniowych *in vitro* wykazały zaburzenia potencjału błony mitochondrialnej jak i uwalniania cytochromu c.²¹ Co ciekawe, badania eksperymentalne wykazały redukcję poziomu jednego z koaktywatorów receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma (PPAR γ)- PGC-1 α w mięśniach szkieletowych zarówno mysich modeli jak i pacjentów z HD.²² Dodatkowo farmakologiczna aktywacja tego koaktywatora prowadziła do zwiększonej ekspresji białek włókien mięśniowych.²³

5.1.1. Kardiomiopatia towarzysząca płasawicy Huntingtona

Liczne badania epidemiologiczne, wskazują iż choroby sercowo-naczyniowe stanowią drugą co do częstości występowania, przyczynę śmierci pacjentów z HD.^{24,25} Zaobserwowano, iż pacjenci z HD cechują się m.in. zmniejszonym korowym i podkorowym przepływem krwi oraz obniżoną częstością akcji serca.²⁶⁻²⁹ Badania wykonane na zwierzęcych modelach HD, potwierdziły występowanie patologii układu sercowo-naczyniowego tj. zmiany częstości akcji serca czy też jego remodeling.³⁰⁻³² Serca mysich modeli HD wykazywały zaburzenia kurczliwości podobne do zaburzeń występujących w kardiomiopatii rozstrzeniowej. Zmianom tym towarzyszyła zwiększona ekspresja genów charakterystycznych dla okresu płodowego (taką samą obserwuje się podczas patologicznego remodelingu serca) czy też obecność zwłóknień śródmiąższowych.³⁰ Co ciekawe, serca w mysim modelu HD - R6/2, nie reagowały

w takim samym stopniu na długotrwałe traktowanie izoproterenolem (związkiem wywołującym przerost serca) w takim samym stopniu jak serca myszy typu dzikiego, co sugeruje obecność dysfunkcji sygnałowania pobudzającego przebudowę serca.³³ Opierając się na tych danych badacze sugerują, iż zaburzona funkcja serca w HD spowodowana jest dysfunkcją osi mózg-serce, jednak jednoznaczna przyczyna zaburzeń sercowo-naczyniowych w HD pozostaje nadal niejasna.

Badania eksperymentalne wykazały, iż serca mysich modeli HD cechowały się zwiększoną liczbą komórek apoptotycznych oraz podwyższonym stopniem zwłóknienia.³⁴ Kardiomiocyty innego mysiego modelu HD - BACHD, wykazywały ponadto nieprawidłowości elektromechaniczne, w tym przedłużony potencjał czynnościowy czy też skurcze arytmiczne. Obserwowanej arytmii komórkowej towarzyszyła zwiększona aktywność kinazy białkowej II zależnej od Ca^{2+} /kalmoduliny, co sugeruje zaburzoną gospodarkę wapnia w komórce. Co więcej, badacze zaobserwowali również zaburzenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej jak i peroksydazy glutationowej w mitochondriach kardiomiocytów.³⁵ Dane w piśmiennictwie wykazują ponadto, iż kardiomiocyty wspomnianego wcześniej modelu R6/2, charakteryzują się obecnością licznych nieprawidłowości w strukturze mitochondriów (utrata podłużnego kształtu oraz zmiany w gęstości mitochondriów) mogących prowadzić do pogorszenia metabolizmu energetycznego kardiomiocytów.³⁶ Badania wykonane na tym modelu wykazały również, że serca tych myszy cechują się zmniejszoną aktywnością kompleksu kinazy I ssaczego celu dla rapamycyny (mTORC1), co według badaczy przyczynia się do obserwowanej u tego szczepu zmniejszonej masy serca oraz braku odporności na silny i przewlekły stres.³⁷

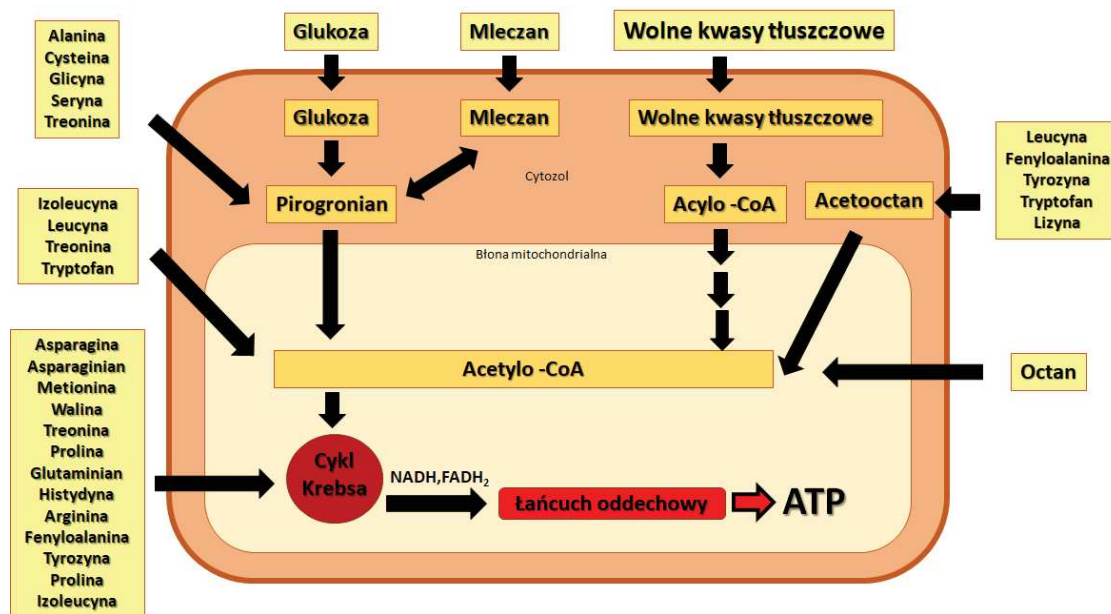
5.2. Przemiany energetyczne i metabolizm nukleotydów w sercu

Serce charakteryzuje się bardzo wysokim zapotrzebowaniem energetycznym. Zapasy ATP są jednak stosunkowo niskie w stosunku do zapotrzebowania na wysokoenergetyczne związki fosforanowe, niezbędne do podtrzymania funkcji mechanicznej, metabolizmu oraz równowagi jonowej. Rezerwy wysokoenergetycznego fosforanu w sercu są bardzo niewielkie nawet jeżeli uwzględni się fosfokreatynę (PCr), która obecna jest w stężeniu dwukrotnie przekraczającym stężenie ATP. Rola PCr to nie tylko rezerwa energetyczna. Związek ten uczestniczy również w transporcie energii pomiędzy układem mitochondrialnym, a aparatem kurczliwym serca. W przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, energia wysokoenergetycznego wiązania fosforanowego z ATP może zostać przeniesiona na kreatynę przez mitochondrialną kinazę kreatynową (CK), czego skutkiem jest utworzenie PCr. Natomiast w cytozolu PCr może być użyta do odtworzenia ATP z ADP przy udziale cytozolowej CK.

Inną ważną cechą metabolizmu energetycznego serca jest jego zależność od przemian tlenowych. W warunkach fizjologicznych za produkcję wysokoenergetycznego fosforanu w sercu w ok. 90 % odpowiadają procesy fosforylacji oksydacyjnej.³⁸

Serce cechuje się natomiast zdolnością do zużywania wielu substratów metabolicznych, co przejawia się poprzez zdolność pozyskiwania energii m.in.

z przemian kwasów tłuszczowych, glukozy, mleczanu, aminokwasów rozgałęzionych czy też ciał ketonowych. Udział każdego z tych substratów energetycznych jest ściśle regulowany. W warunkach fizjologicznych, przemiany kwasów tłuszczowych (β -oksydacja) produkują od 60 do 80% całkowitej puli wytwarzanego ATP z ADP. Za pozostałą część odpowiedzialne są przemiany glukozy (ok. 20%), mleczanu (ok. 15%) oraz innych substratów energetycznych tj. pirogronianu, ciał ketonowych, aminokwasów czy też octanu (ok. 5 %).³⁹ Na **Rycinie 1** przedstawiono schematycznie przemiany substratów energetycznych serca. W stanach patologicznych dochodzić może jednak do głębokich zaburzeń przemian metabolicznych substratów energetycznych, co w rezultacie prowadzić może do zwiększenia zaburzeń funkcji serca.⁴⁰



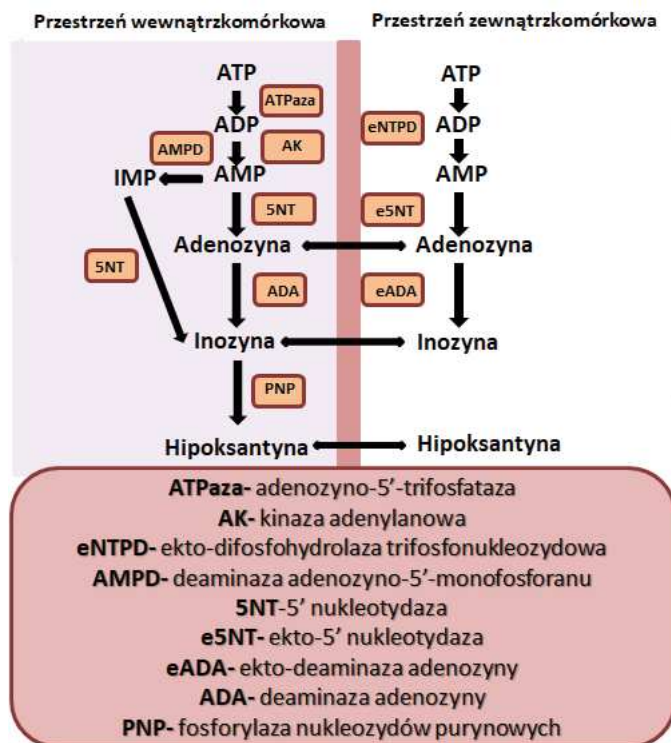
Rycina 1. Przemiany substratów energetycznych w sercu.

5.2.1. Metabolizm nukleotydów adeninowych w sercu

ATP poza fundamentalną rolę w przemianach wewnątrzkomórkowych, gdzie jest substratem energetycznym dla licznej grupy enzymów, może w kontrolowany lub niekontrolowany sposób wydostawać się z komórki i ulegać degradacji w zewnątrzkomórkowym szlaku katabolizmu nukleotydów adeninowych. Uproszczony schemat katabolizmu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego ATP przedstawiono na **Rycinie 2**. W przemianie wewnątrzkomórkowej przekształcającej ATP do adenozyno-5'-difosforanu (ADP) biorą udział ATP-azy, przede wszystkim ATP-aza miozynowa (również sodowo-potasowa czy wapniowa). Przemiana ta zachodzi również w reakcji omówionej powyżej kinazy kreatynowej. Dalsza przemiana ADP do AMP (i ATP) zachodzi przy udziale kinazy adenylanowej (AK). Powstający AMP jest substratem dla kolejnych enzymów: 1) występującej w wielu izoformach 5'nukleotyduazy (5NT)

defosforylującej AMP do działającej kardioprotekcyjnie adenozyiny; oraz 2) deaminazy AMP (AMPD) przekształcającej AMP do inozynomonofosforanu (IMP). Powstająca w wyniku aktywności 5NT adenozyina może być degradowana we wnętrzu kardiomiocyta do inozyny przy pomocy deaminazy adenozyiny (ADA). Inozyna przekształcana może być następnie do hipoksantyny w wyniku aktywności fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP).

W przestrzeni zewnątrzkomórkowej za przemiany ATP do ADP i dalej do AMP odpowiedzialna jest natomiast ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa (eNTPD). Powstający AMP jest następnie katabolizowany przez białko CD73, inaczej ekto-5'-nukleotydamę (e5NT) do adenozyiny. W środowisku zewnątrzkomórkowym adenozyina degradowana jest do inozyny, a za tę przemianę odpowiada ekto-deaminaza adenozyiny (eADA).



Rycina 2. Katabolizm nukleotydu adeninowego w sercu.

Jedną z fundamentalnych adaptacji w patologii serca są zmiany aktywności szlaków metabolicznych w tym przemian energetycznych i metabolizmu nukleotydu. ⁴¹ Dlatego też istotne wydaje się zbadanie roli zaburzeń metabolizmu energetycznego jak i przemian nukleotydu w kardiomiopatii towarzyszącej płasawicy Huntingтона.

6. CEL PRACY

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie adaptacji metabolizmu nukleotydów i przemian energetycznych serca w płasawicy Huntingtona.

Szczegółowe cele pracy obejmowały:

1. Analiza metabolizmu energetycznego i przemian nukleotydów w sercach eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingtona.
2. Analiza zmian metabolizmu energetycznego i preferencji substratowej mięśni szkieletowych w eksperymentalnych modelach płasawicy Huntingtona i porównanie ich do zmian zaobserwowanych w sercu.
3. Analiza stężeń metabolitów nukleotydów w surowicy eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingtona oraz w osoczu pacjentów z zaawansowaną płasawicą Huntingtona.
4. Analiza metabolizmu energetycznego oraz szlaku przemian nukleotydów adeninowych w komórkowym modelu płasawicy Huntingtona.

7. MODELE I METODY DOŚWIADCZALNE

W badaniach wykorzystano dwa mysie modele HD w objawowym stadium choroby: 2-miesięczne myszy szczepu R6/2 oraz 22-miesięczne myszy szczepu *Hdh*Q150. Szczep R6/2 posiada insert fragmentu 5' ludzkiego genu huntingtyny, natomiast szczep *Hdh*Q150 nadmierną ilość (150) powtórzeń CAG w obrębie mysiego genu huntingtyny.⁴¹ Myszy R6/2 charakteryzują się szybkim pojawieniem się pierwszych objawów, a także postępem choroby. W przypadku myszy *Hdh*Q150 pierwsze objawy pojawiają się dopiero około 2 roku życia zwierzęcia. Poza zwierzęcymi modelami eksperymentalnymi, w pracy doktorskiej wykorzystano również materiał (osocze) pochodzący od pacjentów (n=5) z zaawansowaną HD oraz osób zdrowych (n=5).

Modelem komórkowym HD prezentowanym w pracy doktorskiej jest linia komórkowa HEK 293T, którą transfekowano z wykorzystaniem plazmidów pEGFP-Q23, zawierających 23 powtórzenia CAG w obrębie genu huntingtyny (grupa kontrolna) oraz pEGFP-Q74, zawierających 74 powtórzenia CAG w obrębie genu huntingtyny (grupa badana). Model ten został wcześniej opisany w piśmiennictwie jako model komórkowy odpowiedni do krótkoterminowych badań nad efektami komórkowymi w HD. Pozwala on na tworzenie agregatów zmutowanej huntingtyny z wysoką wydajnością, odwzorowując fenotyp komórkowy w zaawansowanym stadium choroby.⁴³

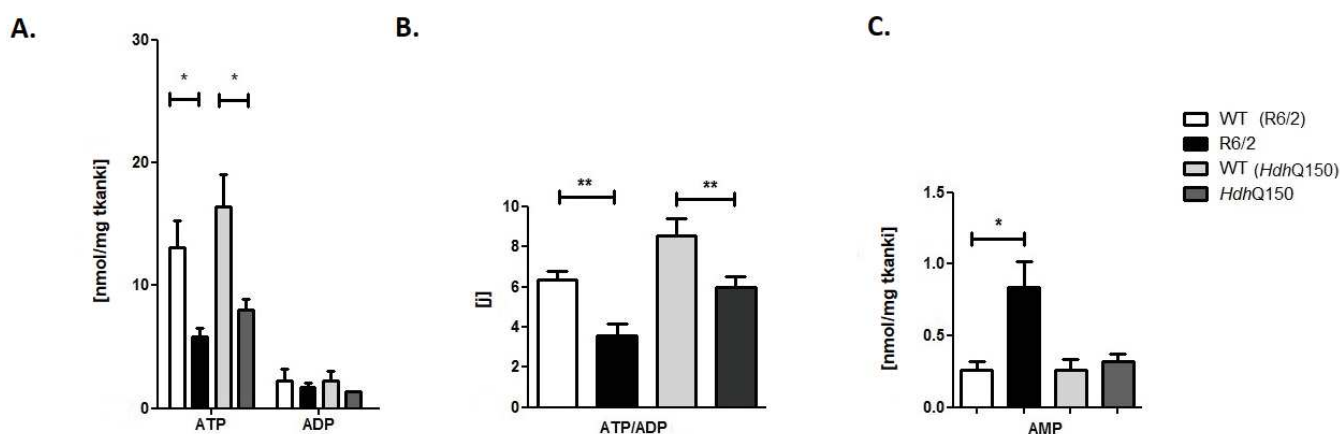
Metodami wykorzystanymi w pracy doktorskiej były: wysokosprawna chromatografia cieczowa (oznaczanie stężeń nukleotydów adeninowych i ich katabolitów, a także analiza aktywności enzymatycznych), chromatografia cieczowa z detekcją masową (analiza preferencji substratowej serca i mięśni szkieletowych), test immunoenzymatyczny (oznaczenie stopnia fosforylacji kinazy zależnej od AMP w sercu), metody biologii molekularnej (izolacja DNA, transfekcja komórkowa).

Ocena preferencji substratowej serca polegała na podskórnej iniekcji (w fałd skórny w okolicy karku) 250 μ l 20% nieradioaktywnego izotopomeru ^{13}C glukozy. Przed podaniem jak i w 120 min od podania, pobrano krew z żyły ogonowej w celu oznaczenia wzbogacenia ^{13}C glukozą (stosunek ^{13}C glukozy/ ^{12}C glukozy we krwi). Po podaniu, wzbogacenie ^{13}C glukozą we krwi w każdej z grup wynosiło ok. 50%. Następnie, po 120 min od podania izotopomeru zwierzę znieczulano oraz pobierano serce w celu oznaczenia stosunku ^{13}C alaniny oraz ^{13}C glutamianu w sercu do ^{13}C glukozy we krwi, a także oznaczenia stosunku ^{13}C glutaminiu/ ^{13}C alaniny w sercu.

8. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI BADAŃ

8.1. Analiza metabolizmu energetycznego i przemian nukleotydów w sercach eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingtona.

Jednym z celów badań przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie metabolizmu energetycznego serc mysich modeli HD. Oznaczono stężenia nukleotydów adeninowych: ATP, ADP oraz AMP, a także stosunek ATP/ADP, stanowiący parametr bilansu energetycznego komórki (**Rycina 3**; Praca A; Fig.1). Powszechnie wiadomo, iż wysokie stężenie ATP niezbędne jest do zachowania prawidłowej funkcji serca. Zaobserwowano, iż serca mysich modeli HD cechowały się obniżonym stężeniem ATP, a także stosunkiem ATP/ADP. Co ciekawe obniżone stężenie ATP wykazano również w sercach pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową.⁴⁴ Dodatkowo odnotowano podwyższone stężenie AMP w sercach myszy R6/2, które aktywować może kinazę zależną od AMP (AMPK).

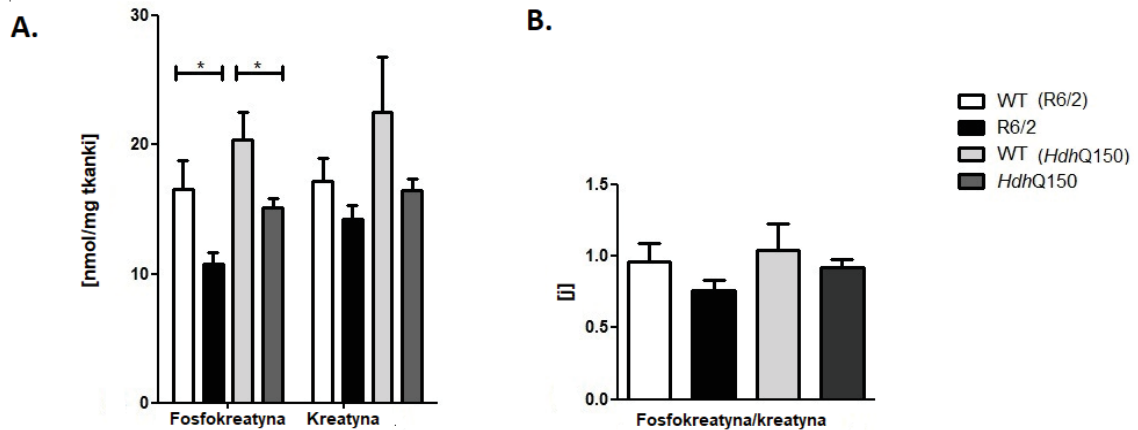


Rycina 3. Obniżone stężenie ATP oraz stosunek ATP/ADP w sercach mysich modeli HD (R6/2 i *HdhQ150*) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (WT). Podwyższone stężenie AMP w sercach myszy R6/2 w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (WT).

A) Stężenie ATP oraz ADP, B) Stosunek ATP/ADP, C) Stężenie AMP w sercach myszy szczepu R6/2, *HdhQ150* oraz myszy kontrolnych (WT). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5), * p <0.05, ** p <0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca A.

Kolejnymi istotnymi związkami, których stężenie oraz wzajemny stosunek świadczą o stanie energetycznym serca są fosfokreatyna i kreatyna. Związki te tworzą wspomniany wcześniej system kinazy kreatynowej mającej na celu szybką regenerację puli ATP w warunkach silnego zapotrzebowania energetycznego.⁴⁵ Zaobserwowano, iż serca obu badanych mysich modeli HD charakteryzowały się obniżonym stężeniem fosfokreatyny w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej (**Rycina 4**; Praca A; Fig.1). Nie zaobserwowano natomiast różnic pomiędzy grupami w stężeniu kreatyny oraz stosunku fosfokreatyny do kreatyny. Obniżenie puli fosfokreatyny, obserwowane

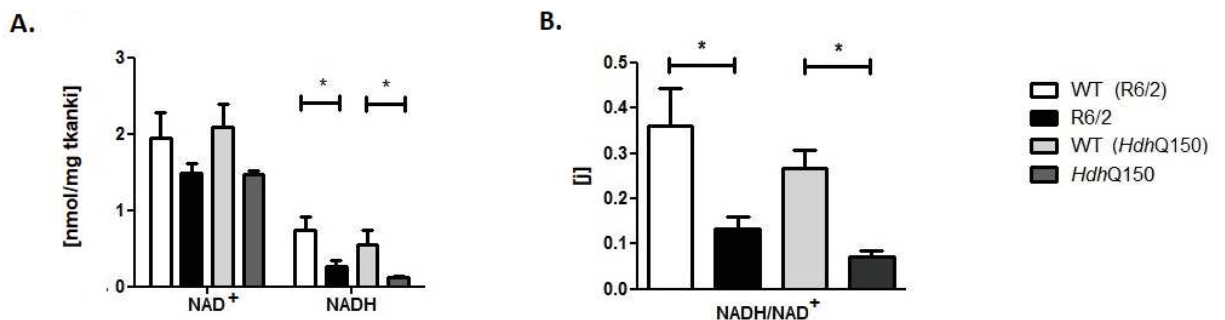
u mysich modeli HD, stanowi istotny marker zaburzeń funkcji serca. Zmianę tę zaobserwowano także w wielu zwierzęcych modelach kardiomiopatii.^{46,47}



Rycina 4. Obniżone stężenie fosfokreatyny oraz brak zmian w stosunku fosfokreatyna/kreatyna w sercach mysich modeli HD (R6/2 i *HdhQ150*) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (WT).

A) Stężenie fosfokreatyny i kreatyny, B) Stosunek fosfokreatyna/kreatyna w sercach myszy szczepu R6/2, *HdhQ150* oraz myszy kontrolnych (WT). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5), * p <0.05, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca A.

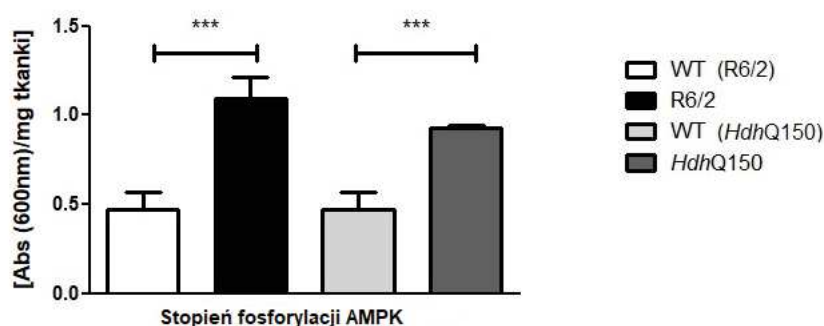
Dodatkowo w celu zbadania równowagi oksydoredukcyjnej w sercach mysich modeli HD oznaczono stężenia utlenionej oraz zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺ i NADH). W obu badanych mysich modelach HD, wykazano obniżone stężenie NADH oraz stosunek NADH/NAD⁺, co sugerować może zaburzenia procesów redoks czy też dysfunkcję mitochondriów (**Rycina 5**; Praca A; Fig.2).



Rycina 5. Obniżone stężenie NADH oraz stosunek NADH/NAD⁺ w sercach mysich modeli HD (R6/2 i *HdhQ150*) w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (WT).

A) Stężenie utlenionej i zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺ i NADH), B) Stosunek NADH/NAD⁺ w sercach myszy szczepu R6/2, *HdhQ150* oraz myszy kontrolnych (WT). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5), * p <0.05, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca A.

Zaobserwowane w mysich modelach HD zaburzenia metabolizmu energetycznego, równowagi oksydoredukcyjnej oraz podwyższone stężenie AMP aktywować może szlak kinazy zależnej od AMP. AMP, przyłączając się do podjednostki γ AMPK, powoduje pięciokrotny wzrost aktywności enzymu. Dodatkowo, związanie cząsteczki AMP przez podjednostkę γ uniemożliwia defosforylację, a tym samym inhibicję aktywności AMPK przez fosfatazy.⁴⁸ W celu potwierdzenia tej hipotezy, kolejny etap badań stanowiło określenie stopnia fosforylacji kinazy zależnej od AMP w sercach mysich modeli HD. Zaobserwowano, iż serca mysich modeli HD charakteryzowały się podwyższonym stopniem fosforylacji kinazy zależnej od AMP (**Rycina 6**; Praca A; Fig.5), co wskazuje na aktywację szlaku kinazy zależnej od AMP.

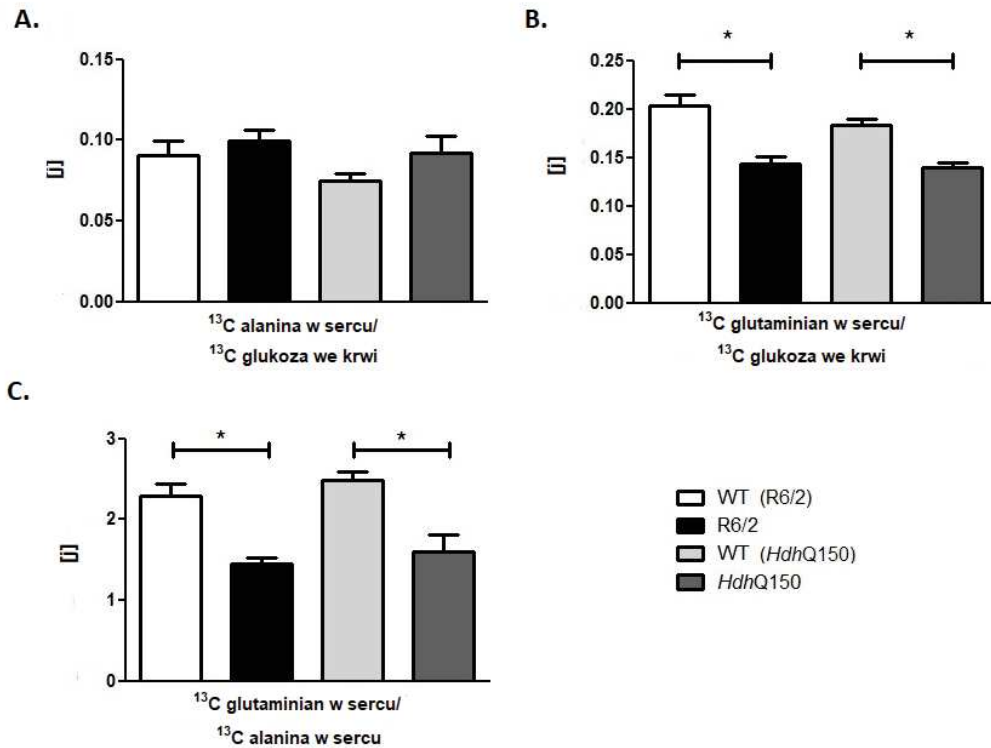


Rycina 6. Podwyższony stopień fosforylacji kinazy zależnej od AMP w sercach mysich modeli HD (R6/2 i *HdhQ150*) w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (WT).

Stopień fosforylacji kinazy zależnej od AMP w sercach myszy szczepu R6/2, *HdhQ150* oraz myszy kontrolnych (WT). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5), *** p <0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca A.

Aktywacja szlaku kinazy zależnej od AMP, zaobserwowana w sercach mysich modeli HD odgrywa istotną rolę w modyfikacji preferencji substratowej serca oraz regulacji biogenogenezy mitochondriów.⁴⁹ Dlatego też kolejny etap badań wykonanych w ramach rozprawy doktorskiej stanowiło określenie preferencji substratowej serca w mysich modelach HD z wykorzystaniem stabilnego izotopomeru glukozy. Stosunek wzbogacenia ¹³C alaniny w sercu do ¹³C glukozy we krwi świadczy o efektywności procesu glikolizy, natomiast stosunek ¹³C glutaminianu do ¹³C glukozy o wydajności dalszych przemian acetylo-CoA w cyklu Krebsa. Dodatkowo parametr wzbogacenia ¹³C glutaminianu do wzbogacenia ¹³C alaniny w sercu odzwierciedla całkowitą efektywność przemian i udział glukozy w metabolizmie energetycznym serca. W sercach mysich modeli HD zaobserwowano obniżony stosunek ¹³C glutaminianu w sercu do ¹³C glukozy we krwi, co świadczy o zmniejszonej wydajności cyklu Krebsa (**Rycina 7B**; Praca A; Fig.5). Ponadto, zaobserwowano obniżony stosunek ¹³C glutaminianu do ¹³C alaniny w sercach obu przebadanych mysich modeli HD, co sugeruje obniżony udział glukozy w metabolizmie energetycznym serca (**Rycina 7C**; Praca A; Fig.5). Wyniki te wskazują, iż pomimo aktywacji szlaku kinazy zależnej od AMP, w sercach mysich modeli HD nie

dochodzi do przestawienia preferencji substratowej z wolnych kwasów tłuszczowych na glukozę (charakterystyczna modyfikacja metabolizmu w warunkach silnego zapotrzebowania energetycznego i niedotlenienia), co pogłębiać może obserwowane niedobory energetyczne.

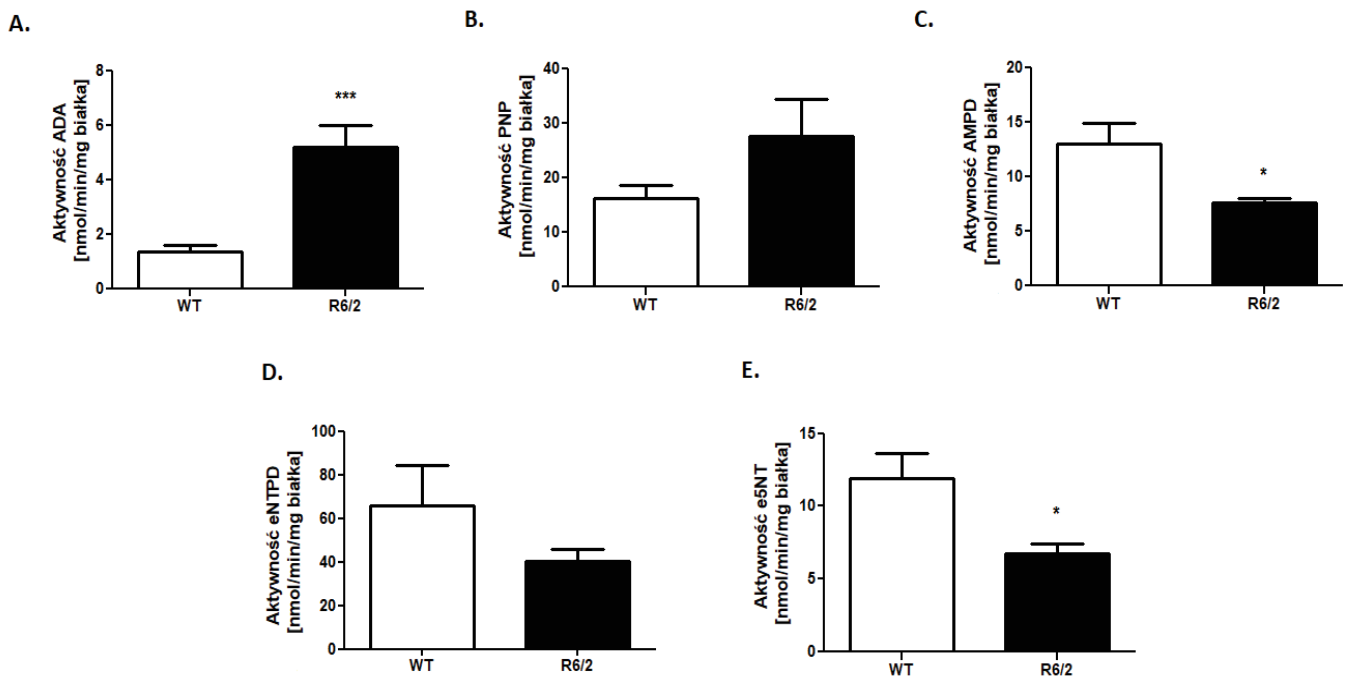


Rycina 7. Zwiększony udział glukozy w metabolizmie energetycznym serc mysich modeli HD (R6/2 i HdhQ150) w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (WT).

A) Stosunek wzbogacenia ^{13}C alaniny w sercu do wzbogacenia ^{13}C glukozy we krwi, B) Stosunek wzbogacenia ^{13}C glutaminianu w sercu do wzbogacenia ^{13}C glukozy we krwi, C) Stosunek wzbogacenia ^{13}C glutaminianu w sercu do wzbogacenia ^{13}C alaniny w sercu. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5), * p <0.05, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t -Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca A.

Zaburzenia metabolizmu energetycznego, obserwowane w sercach myszy z HD, spowodowane być mogą zaburzeniami aktywności enzymów zaangażowanych w przemianę nukleotydów adeninowych. Wyniki zawarte w pracy A składającej się na niniejszą rozprawę doktorską wykazały obecność licznych zmian w ekspresji genów zaangażowanych m.in. w syntezę puryn *de novo* (np. *Adsl*- liazy adenylobursztynianowej), a także genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm adenozyliny (np. *Ada*- deaminazy adenozyliny, *Dpp4*-dipeptylopeptydazy 4) czy też katabolizmu nukleotydów adeninowych (tj. *Entpd2*- ekto difosfohydrolazy trifosfonukleozydowej 2). Kolejnym celem badań było zbadanie aktywności enzymów zaangażowanych w wewnątrzkomórkowy (ADA, PNP, AMPD) oraz zewnątrzkomórkowy (eNTPD, e5NT) katabolizm nukleotydów adeninowych w homogenatach serc jednego z przebadanych wcześniej mysich modeli HD, R6/2. Zaobserwowano, iż serca myszy szczepu R6/2 charakteryzowały się podwyższoną aktywnością enzymu degradującego

adenozynę– deaminazy adenozy (ADA) oraz obniżoną aktywność enzymu przekształcającego AMP do IMP- deaminazy AMP (**Rycina 8A, 8C**; Praca C; Fig.1). Nie zaobserwowano zmian istotnych statystycznie w aktywnościach PNP pomiędzy grupą badaną (R6/2) oraz kontrolną (WT) (**Rycina 8B**; Praca C; Fig.1). Wykazano ponadto obniżoną aktywność enzymu zaangażowanego w zewnątrzkomórkową produkcję adenozy - ekto-5'-nukleotydu (e5NT) (**Rycina 8E**; Praca C; Fig.1). Nie odnotowano jednak zmian w aktywności ekto-difosfohydrolazy trifosfonukleozydowej (eNTPD) pomiędzy badanymi grupami (**Rycina 8D**; Praca C; Fig.1). Obniżona produkcja i zwiększona degradacja, znanej ze swoich kardioprotekcyjnych właściwości, adenozy w sercach myszy R6/2 przyczyniać się może do obniżonego stężenia adenozy, a co za tym idzie do zaburzeń sygnałowania poprzez receptory adenozynowe i obecności licznych zaburzeń funkcji układu sercowo-naczyniowego tj. obniżonej wazodylatacji czy też tachykardii.



Rycina 8. Podwyższona aktywność ADA oraz obniżona aktywność AMPD i e5NT w sercach myszy szczepu R6/2 w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (WT).

A) Aktywność ADA, B) Aktywność PNP, C) Aktywność AMPD, D) Aktywność eNTPD, E) Aktywność e5NT w sercach myszy szczepu R6/2 oraz myszy kontrolnych (WT).

Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5), * p <0.05, *** p <0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t -Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca C.

8.2. Analiza zmian metabolizmu energetycznego i preferencji substratowej mięśni szkieletowych eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingtona i porównanie ich do zmian zaobserwowanych w sercu.

Wyniki badań zawarte w pracy B składającej się na niniejszą rozprawę doktorską wykazały obecność dysfunkcji mięśni szkieletowych w mysich modelach HD. Zaobserwowano m.in. zmianę kurczliwości szybkich włókien mięśniowych z towarzyszącym jej wyraźnym spadkiem siły skurczu oraz liczby jednostek motorycznych unerwiających mięśnie kończyn tylnych. Zaburzenia funkcji mięśni szkieletowych mogą być spowodowane obecnością zaburzeń w metabolizmie energetycznym mięśni. Analizę metabolizmu energetycznego przeprowadzono w trzech rodzajach mięśni szkieletowych (EDL -*Extensor digitorum longus*, TA -*Tibialis anterior*, *Soleus*) kończyn tylnych mysich modeli HD (R6/2 i *HdhQ150*).

Na podstawie wykonanych oznaczeń nukleotydów adeninowych tj. ATP, ADP oraz AMP (**Tabela 1**; Praca B; Fig.5 i Tab.1), wykazano, iż mięśnie EDL, TA jak i *Soleus* obu mysich modeli HD charakteryzowały się obniżonym stężeniem ATP. Tendencje te pokrywały się ze zmianami zaobserwowanymi w sercach mysich modeli HD. Istotnie statystycznie obniżone stężenie ADP obserwowane było w mięśniach EDL, TA i *Soleus* mysiego modelu *HdhQ150* i w mięśniu TA szczepu R6/2 w porównaniu do wartości otrzymanych u zwierząt kontrolnych. W przypadku stężenia AMP zaobserwowano odwrotną tendencję niż tą obserwowaną w sercu, wykazano obniżone stężenie AMP w mięśniach EDL i *Soleus* myszy szczepu *HdhQ150* jak i w mięśniu *Soleus* myszy szczepu R6/2. Pomimo braku istotności statystycznej we wszystkich badanych parametrach, uzyskane wyniki sugerują jednoznacznie obecność zaburzeń metabolizmu energetycznego w mięśniach szkieletowych w mysich modelach HD.

<i>Extensor digitorum longus</i> (EDL)	ATP [nmol/ mg tkanki]	ADP [nmol/ mg tkanki]	AMP [nmol/ mg tkanki]
WT (R6/2)	7.4 ± 1.8	2.4 ± 0.3	0.22 ± 0.06
R6/2	5.9 ± 0.7	2.4 ± 0.3	0.20 ± 0.05
WT (<i>HdhQ150</i>)	7.6 ± 0.8	2.0 ± 0.1	0.49 ± 0.07
<i>HdhQ150</i>	2.1 ± 0.4***	1.6 ± 0.1 *	0.37 ± 0.06*
<i>Tibialis anterior</i> (TA)	ATP [nmol/ mg tkanki]	ADP [nmol/ mg tkanki]	AMP [nmol/ mg tkanki]
WT (R6/2)	29.8 ± 6.3	2.8 ± 0.4	1.0 ± 0.1
R6/2	14.1 ± 1.6*	2.5 ± 0.1*	0.9 ± 0.1
WT (<i>HdhQ150</i>)	33.3 ± 7.9	3.5 ± 0.6	3.9 ± 1.5
<i>HdhQ150</i>	9.5 ± 0.8*	2.3 ± 0.2 *	2.6 ± 1.5

<i>Soleus</i> (S)	ATP [nmol/ mg tkanki]	ADP [nmol/ mg tkanki]	AMP [nmol/ mg tkanki]
WT (R6/2)	3.5 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.3
R6/2	1.9 ± 0.1**	2.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1**
WT (<i>HdhQ150</i>)	6.0 ± 0.5	3.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1
<i>HdhQ150</i>	3.3 ± 0.3**	1.5 ± 0.2***	0.52 ± 0.05***

Tabela 1. Obniżone stężenia nukleotydów adeninowych (ATP, ADP, AMP) w mięśniach szkieletowych w mysich modelach HD (R6/2 i *HdhQ150*) w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (WT).

Stężenia ATP, ADP, AMP w mięśniach szkieletowych *Extensor digitorum longus* (EDL), *Tibialis anterior* (TA), *Soleus* (S) myszy szczepu R6/2, *HdhQ150* oraz myszy kontrolnych (WT). Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM (n=5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca B.

W wyżej wymienionych rodzajach mięśni oznaczono także stężenie fosfokreatyny i kreatyny oraz stosunek fosfokreatyny do kreatyny (Tabela 2; Praca B; Tab.1). Zaobserwowano znaczące obniżenie obu tych parametrów w większości badanych mięśni w mysich modelach HD (zmiany te nie były istotne statystycznie jedynie w przypadku mięśnia *Soleus* myszy szczepu R6/2). Ponadto zmiany zaobserwowane w mięśniach w mysich modelach HD pokrywają się ze zmianami zaobserwowanymi zarówno w sercach tych zwierząt, ale co ciekawe także w biopsjach mięśni pacjentów z HD. U pacjentów tych wykazano zmniejszony stosunek ATP do fosfokreatyny jak i ATP/wolnego fosforanu (Pi) zarówno w stanie objawowym, jak i przed wystąpieniem objawów choroby.⁵⁰

<i>Extensor digitorum longus</i> (EDL)	Fosfokreatyna [nmol/mg tkanki]	Fosfokreatyna/ Kreatyna
WT (R6/2)	157.1 ± 31.2	5.7 ± 1.4
R6/2	50.7 ± 5.7***	2.4 ± 0.3**
WT (<i>HdhQ150</i>)	52.1 ± 1.9	2.3 ± 0.1
<i>HdhQ150</i>	29.1 ± 1.3***	2.1 ± 0.2*
<i>Tibialis anterior</i> (TA)	Fosfokreatyna [nmol/mg tkanki]	Fosfokreatyna/ Kreatyna
WT (R6/2)	219.3 ± 21.2	5.7 ± 0.5
R6/2	79.6 ± 5.1***	2.9 ± 0.5**
WT (<i>HdhQ150</i>)	176.4 ± 28.9	3.3 ± 0.4
<i>HdhQ150</i>	160.9 ± 8.0*	1.9 ± 0.1***

<i>Soleus</i> (S)	Fosfokreatyna [nmol/mg tkanki]	Fosfokreatyna/ Kreatyna
WT (R6/2)	118.98±11.85	7.05±0.75
R6/2	96.75±12.62	7.07±0.79
WT (<i>Hdh</i> Q150)	144.43±18.53	4.72±0.68
<i>Hdh</i> Q150	70.31±7.64**	4.34±0.87

Tabela 2. Obniżone stężenia fosfokreatyny oraz obniżony stosunek fosfokreatyny/kreatyny w mięśniach szkieletowych w mysich modelach HD (R6/2 i *Hdh*Q150) w odniesieniu do zwierząt kontrolnych (WT).

Stężenia fosfokreatyny oraz stosunek fosfokreatyny/kreatyny w mięśniach szkieletowych *Extensor digitorum longus* (EDL), *Tibialis anterior* (TA), *Soleus* (S) myszy szczepu R6/2, *Hdh*Q150 oraz myszy kontrolnych (WT). Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM (n=5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca B.

W celu porównania obecnych w sercach mysich modeli HD zaburzeń gospodarki oksydoredukcyjnej do zmian zaobserwowanych w mięśniach szkieletowych, oznaczono stężenia NAD^+ , NADH oraz stosunek NADH/NAD^+ (Tabela 3; Praca B; Fig.5 i Tab.1). Zaobserwowano, iż mięśnie EDL i TA myszy szczepu R6/2 również cechowały się obniżonym stężeniem NADH. Zaobserwowano ponadto obniżone stężenie NAD^+ w mięśniach EDL i TA zarówno szczepu R6/2 jak i *Hdh*Q150. Co ciekawe, oznaczenie stosunku NADH/NAD^+ w mięśniach szkieletowych wykazywało odwrotną tendencję w porównaniu do zmian zaobserwowanych w sercu. Zaobserwowano, iż mięśnie EDL oraz *Soleus* myszy szczepu R6/2 charakteryzowały się podwyższonym stosunkiem NADH/NAD^+ . Wyniki te, tak jak w przypadku tych z serc mysich modeli HD, sugerują obecność zaburzeń gospodarki oksydoredukcyjnej.

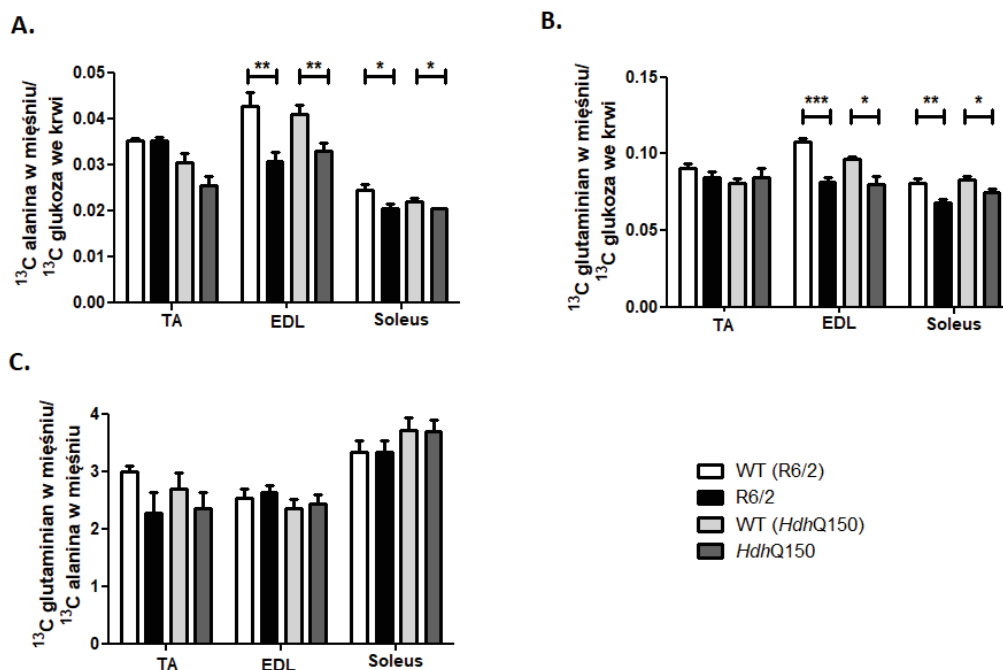
<i>Extensor digitorum longus</i> (EDL)	NAD^+ [nmol/ mg tkanki]	NADH [nmol/ mg tkanki]	NADH/NAD^+
WT (R6/2)	1.0 ± 0.2	0.15 ± 0.05	0.10 ± 0.02
R6/2	0.34 ± 0.08**	0.09 ± 0.1	0.29 ± 0.01***
WT (<i>Hdh</i> Q150)	0.7 ± 0.1	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.02
<i>Hdh</i> Q150	0.21 ± 0.05**	0.022 ± 0.005**	0.14 ± 0.03

<i>Tibialis anterior</i> (TA)	NAD ⁺ [nmol/ mg tkanki]	NADH [nmol/ mg tkanki]	NADH/NAD ⁺
WT (R6/2)	2.7 ± 0.5	0.30 ± 0.01	0.15 ± 0.02
R6/2	1.1 ± 0.1**	0.16 ± 0.01***	0.14 ± 0.01
WT (<i>Hdh</i> Q150)	2.4 ± 0.5	0.13 ± 0.04	0.06 ± 0.02
<i>Hdh</i> Q150	1.4 ± 0.1***	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01
<i>Soleus</i> (S)	NAD ⁺ [nmol/ mg tkanki]	NADH [nmol/ mg tkanki]	NADH/NAD ⁺
WT (R6/2)	0.58±0.036	0.11 ± 0.01	0.12±0.02
R6/2	0.38±0.038**	0.29 ± 0.02	0.75±0.01***
WT (<i>Hdh</i> Q150)	1.00±0.14	0.10 ± 0.04	0.09±0.02
<i>Hdh</i> Q150	0.81±0.17	0.031 ± 0.004	0.13±0.01

Tabela 3. Obniżone stężenia NAD⁺, NADH oraz podwyższony stosunek NADH/NAD⁺ w mięśniach szkieletowych w mysich modelach HD (R6/2 i *Hdh*Q150) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (WT).

Stężenia NAD⁺, NADH, stosunek NADH/NAD⁺ w mięśniach szkieletowych *Extensor digitorum longus* (EDL), *Tibialis anterior* (TA), *Soleus* (S) myszy szczepu R6/2, *Hdh*Q150 oraz myszy kontrolnych (WT). Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM (n=5), **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca B.

W mięśniach szkieletowych oceniono także wzbogacenie ¹³C alaniny i ¹³C glutaminianu do ¹³C glukozy we krwi tych zwierząt, a także stosunek ¹³C glutaminianu do ¹³C alaniny w mięśniach (**Rycina 9**; Praca B; Fig.5). Zaobserwowano obniżone utlenianie glukozy (obniżenie stosunku ¹³C alaniny w mięśniu/ ¹³C glukozy we krwi), a także zmniejszony udział powstałego podczas glikolizy acetylo-CoA w cyklu Krebsa (obniżony stosunek ¹³C glutaminianu w mięśniu/¹³C glukozy we krwi) w mięśniach EDL i *Soleus* w obu badanych mysich modelach HD. Zmiany te pokrywają się ze zmianami zaobserwowanymi w sercach tych zwierząt. Parametry te nie różniły się jednak istotnie statystycznie w przypadku mięśni TA. Nie odnotowano również zmian w całkowitym stosunku ¹³C glutaminianu/¹³C alaniny w mięśniach.

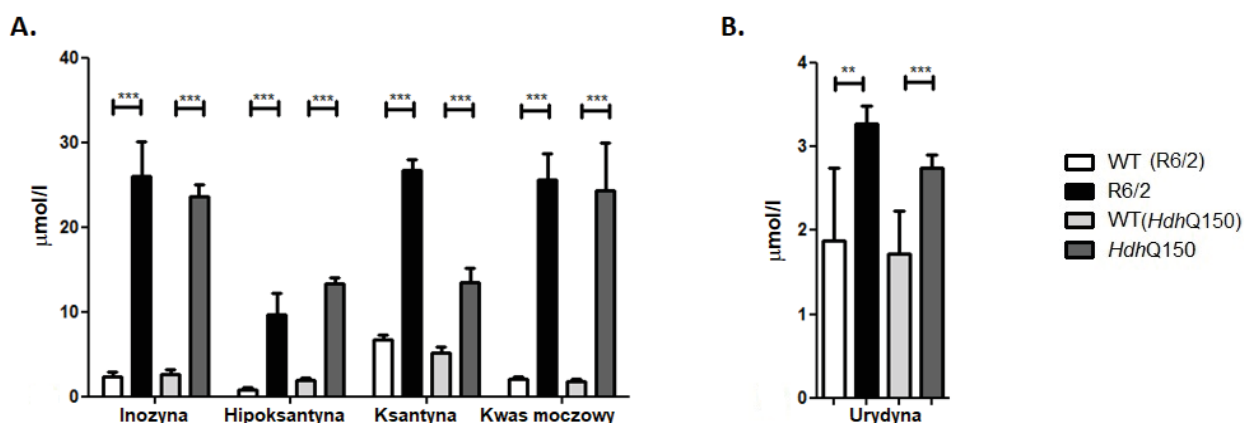


Rycina 9. Obniżone utlenianie glukozy w sercach mysich modeli HD (R6/2 i *HdhQ150*) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (WT).

A) Stosunek wzbogacenia ^{13}C alaniny w mięśni do wzbogacenia ^{13}C glukozy we krwi,
 B) Stosunek wzbogacenia ^{13}C glutaminianu w mięśni do wzbogacenia ^{13}C glukozy we krwi,
 C) Stosunek wzbogacenia ^{13}C glutaminianu w mięśni do wzbogacenia ^{13}C alaniny w mięśni
Tibialis anterior (TA), *Extensor digitorum longus* (EDL) oraz *Soleus* (S) myszy szczepu R6/2
HdhQ150 oraz myszy kontrolnych (WT). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5),
 * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu
t-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca B.

8.3. Analiza stężeń metabolitów nukleotydów w surowicy eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingtona oraz w osoczu pacjentów z zaawansowaną płasawicą Huntingtona.

Zaobserwowany w sercach i w mięśniach szkieletowych w mysich modelach HD, zaburzony metabolizm energetyczny może powodować zmiany w profilu katabolitów nukleotydów w surowicy. Pomimo braku istotnych różnic w stężeniach ATP, ADP oraz NAD^+ w surowicy myszy (R6/2, *HdhQ150*) zaobserwowano kilkukrotny wzrost katabolitów nukleotydów adeninowych tj. inozyny, hipoksantyny, ksantyny, kwasu moczowego, w porównaniu do stężeń tych związków u zwierząt z grup kontrolnych (**Rycina 10A**; Praca A; Fig.3). Dodatkowo, odnotowano około 2-krotny wzrost stężenia urydyny w surowicy tych zwierząt (**Rycina 10B**; Praca A; Fig.3), stanowiącej marker zaburzeń energetycznych komórki.⁵¹ Wzrost katabolitów nukleotydów adeninowych w surowicy spowodowany może być ich intensywnym uwalnianiem przez dysfunkcyjne mięśnie szkieletowe oraz serce.

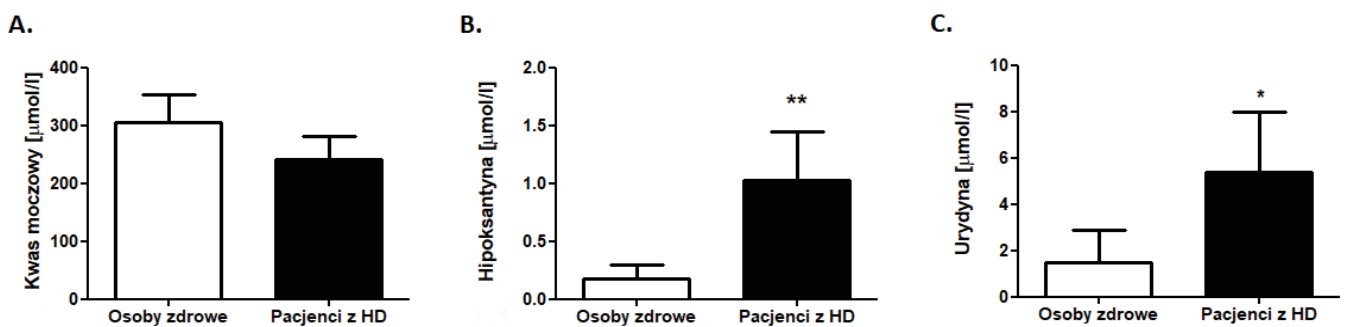


Rycina 10. Podwyższone stężenie inozyny, hipoksantyny, ksantyny i kwasu moczowego, a także wzrost stężenia urydyny w surowicy myszy HD (R6/2 i *HdhQ150*) w porównaniu do zwierząt kontrolnych (WT).

A) Stężenia inozyny, hipoksantyny, ksantyny, kwasu moczowego w surowicy, B) Stężenie urydyny w surowicy myszy szczepu R6/2, *HdhQ150* oraz myszy kontrolnych (WT).

Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5), **p<0.01, ***p<0.001, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca A.

Kolejnym etapem badań pracy doktorskiej była analiza stężeń katabolitów nukleotydów w osoczu pacjentów z zaawansowaną HD oraz osób z grupy kontrolnej. U osób z HD nie zaobserwowano różnic w stężeniu kwasu moczowego w osoczu w porównaniu do osób zdrowych. Zaobserwowano podwyższone stężenie hipokszantyny oraz urydyny w osoczu pacjentów z zaawansowanym HD (**Rycina 11**, Praca A; Fig.4). Takie same wyniki uzyskano też w mysich modelach HD. Wyniki wskazują, iż u pacjentów z zaawansowaną HD mogą również występować deficyty energetyczne tkanek obwodowych, skutkujące wzrostem katabolitów nukleotydów w osoczu. Dodatkowo, obserwowany zarówno w modelach doświadczalnych jak i u pacjentów, znaczący wzrost hipokszantyny i urydyny sugeruje istotną wartość tych parametrów jako nowych biomarkerów HD związanych z metabolizmem energetycznym komórki.

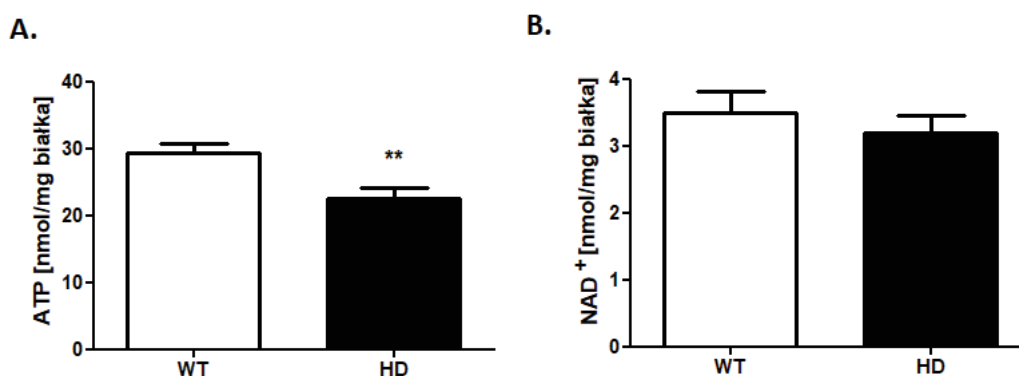


Rycina 11. Podwyższone stężenie hipokszantyny i urydyny w osoczu pacjentów z HD w porównaniu do osób zdrowych.

A) Stężenie kwasu moczowego, B) Stężenie hipokszantyny, C) Stężenie urydyny w osoczu pacjentów z zaawansowaną płasawicą Huntingtona oraz osób z grupy kontrolnej (osoby zdrowe). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=5), * p <0.05, ** p <0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t -Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca A.

8.4. Analiza metabolizmu energetycznego oraz szlaku przemian nukleotydów adeninowych w komórkowym modelu płasawicy Huntingtona.

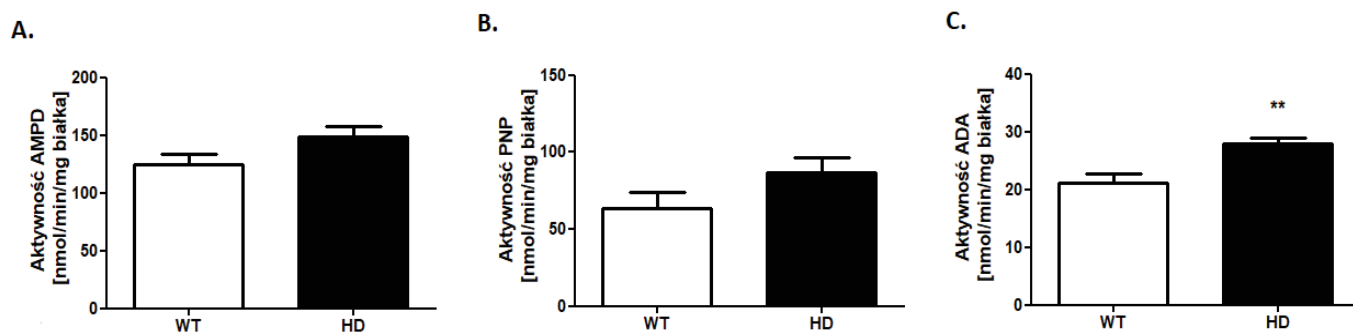
W celu określenia roli zmutowanej formy HTT (mHTT) w zaburzeniach metabolizmu energetycznego i przemian nukleotydów adeninowych wykonano eksperymenty *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej HEK 293T transfekowanej plazmidem pEGFP-Q74, zawierającym 74 powtórzeń CAG w obrębie genu *Htt*. Grupę kontrolną stanowiły komórki transfekowane plazmidem pEGFP-Q23, zawierającym 23 powtórzeń CAG. Ocenę metabolizmu energetycznego komórek (stężenia ATP i NAD^+) oraz analizę aktywności enzymów szlaku zewnątrzkomórkowego (eNTPD, e5NT, eADA) jak i wewnątrzkomórkowego katabolizmu nukleotydów adeninowych (ADA, PNP, AMPD) wykonano trzy dni po transfekcji, kiedy wydajność procedury wynosiła 90%, a poziom konfluencji wynosił ok. 80-100%. Zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie stężenia ATP w komórkach charakteryzujących się większą liczbą powtórzeń CAG w obrębie genu *Htt* w odniesieniu do grupy kontrolnej. Nie wykazano jednak różnicy w stężeniu NAD^+ pomiędzy badanymi grupami (**Rycina 12**; Praca D; Fig.1). Wyniki te sugerują, iż obecność mHTT w komórce przyczynia się do obniżenia ATP, a w konsekwencji zaburzeń metabolizmu energetycznego komórki.



Rycina 12. Obniżone stężenie ATP oraz brak zmian w stężeniu NAD^+ w komórkowym modelu płasawicy Huntingtona (HD) w porównaniu do komórek kontrolnych (WT).

A) Stężenie ATP, B) Stężenie NAD^+ w linii komórkowej HEK 293T transfekowanej plazmidami pEGFP-Q23 (WT) oraz pEGFP-Q74 (HD). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=20), **p<0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca D.

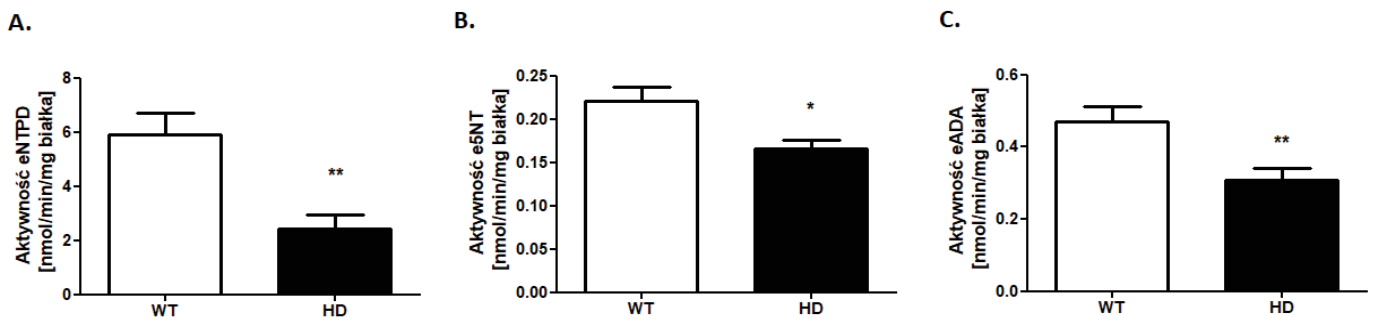
Wewnątrzkomórkowa pula ATP jak i innych nukleotydów adeninowych kontrolowana jest poprzez wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe enzymy szlaku katabolizmu nukleotydów adeninowych. Zaobserwowano istotnie statystycznie wyższą wewnątrzkomórkową aktywność ADA w modelu komórkowym HD, co skutkować może obniżoną pulą wewnątrzkomórkowej adenozyiny (**Rycina 13**; Praca D; Fig.2). Obniżone stężenie adenozyiny prowadzić może do pogłębienia zaburzeń metabolizmu energetycznego komórki. Nie odnotowano jednakże istotnych różnic w aktywności AMPD oraz PNP pomiędzy badanymi grupami.



Rycina 13. Podwyższona aktywność ADA oraz brak zmian w aktywności AMPD i PNP w komórkowym modelu płaswicy Huntingtonga (HD) w odniesieniu do komórek kontrolnych (WT).

A) Aktywność deaminazy AMP (AMPD), B) Aktywność fosforylasy nukleozydów purynowych (PNP), C) Aktywność deaminazy adenozyiny (ADA) w linii komórkowej HEK 293T transfekowanej plazmidami pEGFP-Q23 (WT) oraz pEGFP-Q74 (HD). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=20), **p<0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca D.

Zmutowana forma huntingtyny wchodzić może w interakcje z białkami zaangażowanymi w transkrypcję genów, sygnalizację czy też transport wewnątrzkomórkowy. Uzyskane w pracy wyniki sugerują ponadto, iż komórki cechujące się nadmierną liczbą powtórzeń CAG w obrębie genu huntingtyny, charakteryzują się obecnością zaburzeń sygnalizacji zewnątrzkomórkowej. Świadczą o tym obniżone aktywności wszystkich zbadanych enzymów zewnątrzkomórkowych takich jak : ekto- difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa (eNTPD) - przekształcająca ATP do ADP i AMP; ekto-5'-nukleotydaza (e5NT) -odpowiedzialna za hydrolizę AMP do adenozyiny; ekto- deaminaza adenozyiny (eADA) -degradująca adenozyinę do inozyny (**Rycina 14**; Praca D; Fig.3).



Rycina 14. Obniżona aktywność enzymów zaangażowanych w zewnątrzkomórkowy katabolizm nukleotydów adeninowych (eNTPD, e5NT, eADA) w komórkowym modelu płasawicy Huntingтона (HD) w odniesieniu do komórek kontrolnych (WT).

A) Aktywność ekto-difosfohydrolazy trifosfonukleozydowej (eNTPD), B) Aktywność ekto-5'-nukleotydaży (e5NT), C) Aktywność ekto-deaminazy adenozy (eADA) w linii komórkowej HEK 293T transfekowanej plazmidami pEGFP-Q23 (WT) oraz pEGFP-Q74 (HD). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM (n=20), *p<0.05, **p<0.01, analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-Studenta. Na podstawie: Załącznik-Praca D.

9. WNIOSKI

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdziły jednoznacznie fundamentalne znaczenie przemian energetycznych i metabolizmu nukleotydów w patomechanizmie kardiomiopatii towarzyszącej Płasawicy Huntingtona.

Szczegółowe wnioski są następujące:

1. Serca eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingtona charakteryzują się zaburzonym metabolizmem energetycznym, zmianą preferencji substratowej (zmniejszonym udziałem glukozy w metabolizmie energetycznym) oraz zmianami w profilu aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm nukleotydów adeninowych.
2. Zmiany metabolizmu energetycznego oraz preferencji substratowej w mięśniach szkieletowych eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingtona mają podobny charakter do zmian zaobserwowanych w sercu.
3. Wzrost stężenia hipoksantyny i urydyny zaobserwowano zarówno w surowicy eksperymentalnych modeli płasawicy Huntingtona jak i osoczu pacjentów z zaawansowaną płasawicą Huntingtona.
4. Komórkowy model HD, charakteryzował się zmienionym metabolizmem energetycznym (obniżone stężenie ATP), aktywnościami wewnątrzkomórkowych przemian nukleotydów adeninowych (podwyższona aktywność ADA) oraz obniżonymi aktywnościami ekto-enzymów (eNTPD, e5NT oraz eADA). Obserwacje te pokrywają się ze zmianami zaobserwowanymi *in vivo*.

10. PERSPEKTYWY

Zaburzenia metabolizmu nukleotydów i przemian energetycznych obserwowane są w wielu stanach patologicznych układu sercowo-naczyniowego. Wyniki badań składających się na rozprawę doktorską sugerują, iż zaburzenia te mają znaczenie w dysfunkcyjnych w płasawicy Huntingtona mięśniach szkieletowych i sercu. Dlatego też terapie mające na celu poprawę metabolizmu energetycznego w tych narządach mogą przynieść pozytywne implikacje kliniczne.

Związkami mogącymi mieć zastosowanie kliniczne są także substancje bezpośrednio poprawiające metabolizm energetyczny komórki np. koenzym Q10. Innymi kandydatami mogą być związki dostarczające substraty dla cyklu Krebsa np. rozgałęzione aminokwasy, tym bardziej, że stężenia BCAA we krwi są znacznie obniżone u pacjentów z HD.⁵² Alternatywę stanowią mogłyby również aktywatory receptorów PPAR, szeroko stosowane już w badaniach przedklinicznych. W 2016 roku przetestowano jeden z agonistów receptorów PPAR delta - KD3010 w mysim modelu HD N171-82Q. Zaobserwowano m.in. poprawę funkcji motorycznych, zmniejszenie progresji procesu neurodegeneracyjnego oraz dłuższą przeżywalność u tych zwierząt.⁵³ Jednak funkcja oraz metabolizm serca i mięśni szkieletowych w powyższych terapiach nie zostały jeszcze zbadane.

Strategie terapeutyczne obejmować mogą również farmaceutyki mające na celu bezpośrednią poprawę zaburzonego w HD metabolizmu nukleotydów. Badania wykonane w naszym zespole wykazały, iż jednoczesne podawanie inhibitorów metabolizmu adenozyliny oraz substratów do syntezy nukleotydów adeninowych, przyczyniło się do poprawy funkcji mechanicznej serca, metabolizmu energetycznego oraz puli nukleotydów adeninowych.^{54,55}

Ciekawym rozwiązaniem terapeutycznym wydają się również zastosowanie prekursorów NAD⁺ np. rybozydu nikotynamidu, który regenerowałby obniżoną pulę NAD⁺, poprawiał funkcję mitochondriów, a co za tym idzie metabolizm energetyczny komórek. Dane z piśmiennictwa wykazują, iż zastosowanie rybozydu nikotynamidu w indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (iPSC) izolowanych od pacjentów z chorobą Parkinsona, znacznie zmniejszyło defekty mitochondrialne i polepszyło funkcję komórek neuronalnych.⁵⁶

Należy pamiętać, iż płasawica Huntingtona stanowi trudną do diagnozy chorobę wykrywaną najczęściej dopiero podczas manifestacji pierwszych objawów choroby. Do tej pory jedyną pewną diagnozę HD stanowią badania genetyczne wykazujące nadmierną liczbę powtórzeń CAG w obrębie genu *HTT*. Pomimo wielu badań klinicznych nie udało się zidentyfikować związku, który miałby jednoznaczne powiązanie i wskazywał na obecność HD. Obiecujące wydają się być metabolity związane z dysfunkcją motoryczną tj. łańcuch lekki neurofilamentu.⁵⁷ Zaobserwowany w pracy doktorskiej wzrost hipoksantyny i urydyny w osoczu pacjentów HD korelujący z parametrami stopnia zaawansowania oraz progresji choroby (liczbą powtórzeń CAG), stanowiąc mogą nowe biomarkery HD związane z zaburzeniami energetyki komórki. Jednakże zważywszy na małą liczbę przebadanych pacjentów hipoteza ta wymaga dalszej weryfikacji.

11. INTRODUCTION

11.1. Basic aspects of Huntington's disease pathology

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disease of the central nervous system, inherited in an autosomal dominant manner. HD is clinically manifested by the occurrence of cognitive, mental and motor disorders.¹ One of the earliest signs of motor disorder in Huntington's disease is chorea, i.e. involuntary dance-like movements. Patients with HD are also characterized by bradykinesia (motor slowness). Another symptom of HD is dystonia, which is the occurrence of unnaturally slow, prolonged muscle spasms that cause repetitive torsional movements affecting various parts of the body.² In conclusion, the motor disorders in Huntington's disease are a combination of chorea, bradykinesia and dystonia that visibly affect the attitude, balance and gait of HD patients. Oculomotor disturbances are also common. With the development of the disease, a speech of a patient with HD becomes unclear. Moreover, swallowing difficulties may also occur, which may lead to weight loss.³

In addition to movement disorders, Huntington's disease causes changes in personality and mood. Most often HD patients suffer for depression, apathy, anxiety, irritability, outbursts of anger, impulsiveness, obsessive-compulsive syndromes, sleep disorders and withdrawal from social life.⁴ A characteristic feature of Huntington's disease is also cognitive impairment, which affects understanding, reasoning and memory. The cognitive disorders in HD include: slower thinking, problems with concentration, organization, planning, decision making, answering questions; there are also problems with short-term memory, as well as limited problem-solving skills and the adaptation to, and understanding of new information.²

The incidence of HD in Europe is estimated at 5 to 10 cases per 100,000 people. In adults, the first symptoms appear between 30 and 50 years of age. The cause of HD is the occurrence of multiple repeats of the CAG nucleotide sequence within the huntingtin gene (*HTT*) localized on chromosome 4, which results in the elongation of the polyglutamine stretch in the HTT protein. The number of CAG nucleotide sequence repeats in the healthy population varies from 6 to 35, while the presence of over 36 repeats defines the pathogenic HD allele. In cases with 36 to 39 CAG repeats within the *HTT* gene, the symptoms of the disease may be reduced or completely unnoticeable.¹

Huntingtin (HTT) is a multi-domain protein with a size of 348 kDa, with the highest level of HTT, demonstrated in the brain.^{5,6} It has also been demonstrated outside the nervous system, in organs such as skeletal muscles or a heart.³ Data available in the literature show that the elongation of the polyglutamine stretch in exon 1 HTT leads to the formation of insoluble huntingtin aggregates, which are observed in both early and advanced stages of the disease.⁷ Aggregates of the mutated form of HTT (mHTT) have been identified in the brain as well as outside central nervous system, e.g. in skeletal muscle.⁸ On the cellular level, HTT was found in the nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, and endosomes.⁹⁻¹¹ It has been shown that HTT interacts with proteins involved in the gene transcription (eg., CREB-binding transcription factor (CBP)),

intracellular signaling (e.g., HIP14 protein), intracellular transport (e.g., HIP1 protein, HAP1), endocytosis and metabolism (e.g., PACSIN1 phosphoprotein, vitamin D-binding receptor, hepatic X-receptor).^{12,13} Biochemical pathways by which mutant huntingtin cause cellular dysfunction and death remain unclear, however there is some strong evidence implicating metabolic and energetic dysfunctions caused by mitochondrial abnormalities.¹⁴⁻¹⁶

It has been shown that HD patients, except for the motor and mental disorders, are also characterized by a reduced (by about 50%) muscular strength compared to healthy controls.¹⁷ One of the possible cause of impaired skeletal muscle function in HD might be the deteriorations in energy metabolism. Skeletal muscles of HD patients are characterized by dysfunction of oxidative metabolism.¹⁸ Studies in experimental mouse models have also shown that mitochondria isolated from the quadriceps muscle of the R6/2 mice model were characterized by reduced activity of the respiratory chain complexes.¹⁹ Increased production of energy substrates such as lactate and acetate were also shown, which also confirms the presence of oxidative metabolism disorders.²⁰ *In vitro* myocyte cultures revealed disturbances of the mitochondrial membrane potential and cytochrome c release.²¹ Interestingly, experimental studies have also shown a reduction in the level of PGC-1 α , one of the proteins activated by peroxisomal proliferator gamma (PPAR γ) in skeletal muscles of HD mice models as well as HD patients.²² Additionally, the pharmacological activation of this co-activator led to increased expression of skeletal muscle fiber proteins.²³

11.1.1. Huntington's disease related cardiomyopathy

Multiple epidemiological studies have shown that heart failure is the second cause of death in HD patients.^{24,25} Reduced cortical and subcortical blood flow and a reduced heart rate have been reported as examples of pathological abnormalities in HD hearts.²⁶⁻²⁹ On the other hand, there are more lessons from studies on HD animal models that reaffirmed cardiac pathological events such as variations in the heart rate and cardiac remodeling.³⁰⁻³² Interestingly, HD mouse models showed also a heart contractile dysfunction, which might be a part of dilated cardiomyopathy. These changes were accompanied by an increased expression of fetal genes (the same is observed during the pathological remodeling of the heart) or the presence of interstitial fibrosis.³⁰ Interestingly, the hearts in the HD mouse model R6/2 did not react to the same extent with long-term treatment with isoproterenol (a compound that causes hypertrophy of the heart) to the same extent as the heart of wild-type mice, suggesting the presence of signaling dysfunction that stimulates heart remodeling.³³ Hence, there is a hypothesis that cardiac malfunction could be caused by sympathetic nervous system dysfunction. However, the definitive source of cardiac derangements is still unclear.

Experimental studies have shown that the hearts of HD mice models were characterized by an increased number of apoptotic cells and an increased degree of fibrosis.³⁴ Cardiomyocytes of another HD mice model - BACHD, also showed electromechanical abnormalities, including prolonged action potential or arrhythmic contractions. Cellular arrhythmia was accompanied by increased activity of Ca²⁺/

calmodulin-dependent protein kinase II, suggesting disturbed calcium metabolism in the cell. Furthermore, abnormalities of superoxide dismutase activity and glutathione peroxidase in the mitochondria of cardiomyocytes were observed.³⁵ Cardiomyocytes from R6/2 mice also showed abnormalities in the mitochondrial structure (loss of longitudinal shape and changes in mitochondrial density) that may lead to deteriorations in energy metabolism.³⁶ The studies performed on this model have also shown that the hearts of these mice are characterized by decreased activity of the mammalian target of rapamycin kinase complex 1 (mTORC1) that could be the cause of the reduced heart weight which is observed in this strain as well as the lack of resistance to severe and chronic stress.³⁷

11.2. Cardiac energy and nucleotides metabolism

The heart is characterized by very high energy demand. However, ATP reserves are relatively low in relation to the need for high-energy phosphates necessary to maintain the mechanical function, metabolism and ion balance. The reserves of high-energy phosphate in the heart are very small even when considering phosphocreatine (PCr), which is present at a concentration that is twice the concentration of ATP. PCr role is not just energy reserve. This compound also participates in energy transport between the mitochondrial system and the contractile apparatus. In the mitochondrial inter-membrane space, the energy of high-energy phosphate bound of ATP can be transferred to creatine by mitochondrial creatine kinase (CK) resulting in the formation of PCr. In the cytosol, PCr can be used to resynthesize ATP from ADP by cytosolic CK.

Another important feature of the energy metabolism of the heart is its dependence on oxygen metabolism. Under physiological conditions, oxidative phosphorylation is responsible for the production of about 90% of high-energy phosphates in the heart.

On the other hand, the heart is characterized by the ability to consume and acquire energy from many metabolic substrates such as fatty acids, glucose, lactate, branched chain amino acids or ketone bodies. The contribution of each of these energy substrates is strictly regulated. Under physiological conditions, fatty acid conversions (β -oxidation) produce between 60 and 80% of the total pool of ATP produced from ADP. The remainder is responsible for the transformation of glucose (about 20%), lactate (about 15%) and other energy substrates, i.e. pyruvate, ketones, amino acids or acetate (about 5%).³⁹ **Figure 1** shows the metabolism of the most important energy substrates in the heart. Under pathological conditions, cardiac substrate preference may adversely change, which may lead to an enhancement of heart failure.⁴⁰

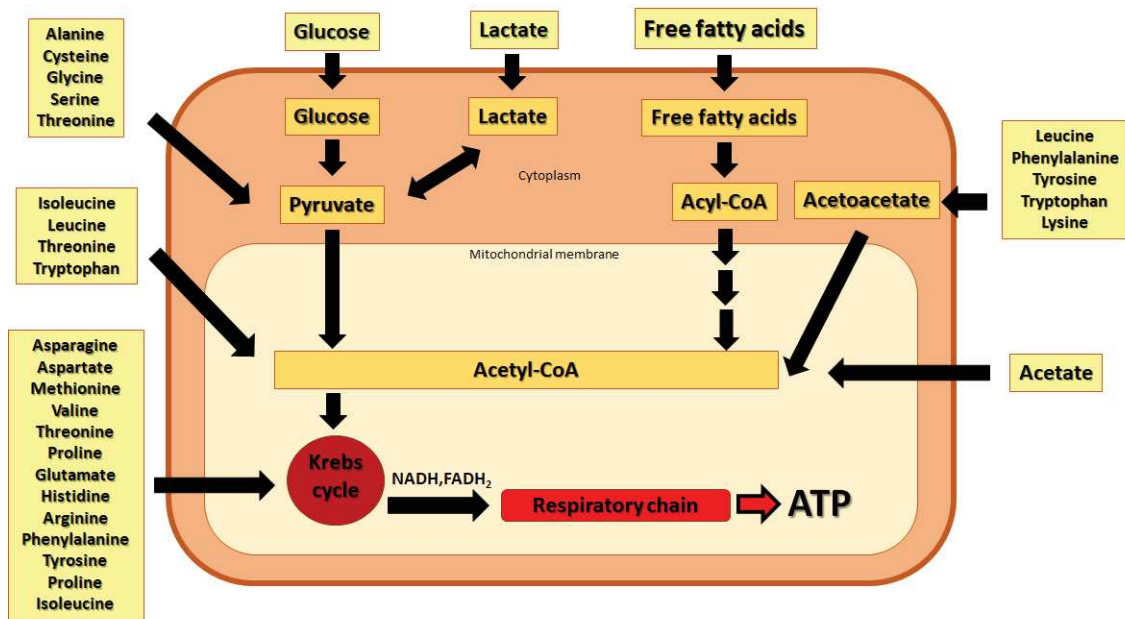


Figure 1. Cardiac metabolism of energy substrates.

11.2.1. Cardiac adenine nucleotides metabolism

Besides the fundamental role of ATP in intracellular metabolism, where it is a substrate for a large group of enzymes, ATP can be released from the cell in a controlled or uncontrolled manner and degraded in the intra- or extracellular adenine nucleotide catabolism pathway. A simplified scheme of catabolism of intracellular and extracellular ATP is shown in **Figure 2**. In the first intracellular reaction converting ATP to adenosine-5'-diphosphate (ADP), ATP-ases are involved eg. myosin ATP-ase (also sodium-potassium or calcium). This conversion is also related to the mentioned above reaction of creatine kinase. Further conversion of ADP to AMP (and ATP) is mediated by adenylate kinase (AK). Next, AMP is a substrate for two consecutive enzymes: 1) occurring in multiple isoforms 5'-nucleotidase (5'NT) dephosphorylating AMP to the cardioprotective adenosine; and 2) AMP deaminase (AMPD) converting AMP to inosine monophosphate (IMP). The adenosine can be degraded inside the cardiomyocyte into inosine by adenosine deaminase (ADA). Afterwards, inosine can be converted to hypoxanthine by a purine nucleoside phosphorylase (PNP).

In the extracellular space, the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (eNTPD) is responsible for the conversion of ATP to ADP and further to AMP. Then, AMP is converted by the CD73 protein, or ecto-5'-nucleotidase (e5NT) to adenosine. Extracellularly, adenosine is degraded to inosine by ecto-adenosine deaminase (eADA).

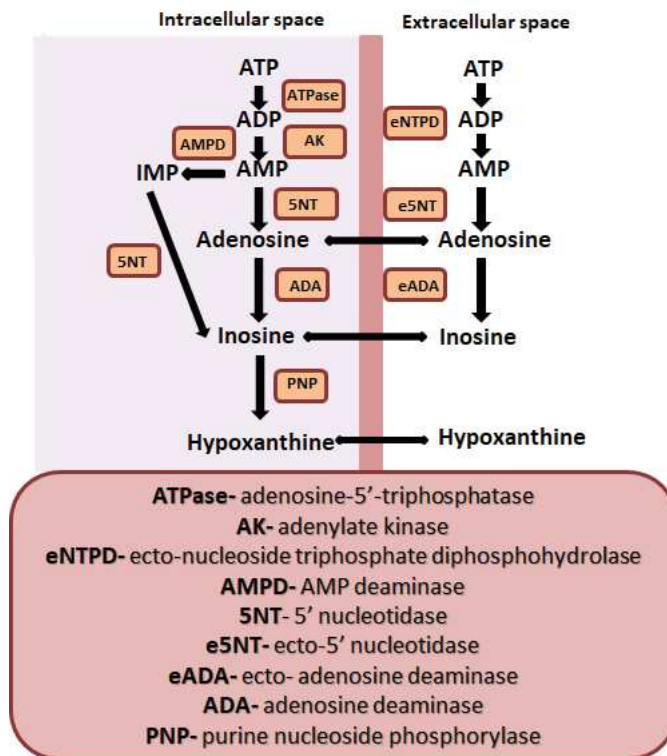


Figure 2. Cardiac adenine nucleotides catabolism.

Changes in the activity of metabolic pathways including energy and nucleotide metabolism are the most fundamental adaptations in the pathology of the heart.⁴¹ Therefore, it seems important to study the role of energy and nucleotide metabolism changes in Huntington's disease related cardiomyopathy.

12. AIMS

The main aim of this thesis was to investigate the adaptations of cardiac energy and nucleotide metabolism in Huntington's disease.

The detailed objectives of the work include:

1. Analysis of cardiac energy and nucleotide metabolism in experimental models of Huntington's disease.
2. Analysis of energy metabolism and substrate preference in skeletal muscle of experimental models of Huntington's disease and its comparison to the changes observed in the heart.
3. Analysis of nucleotide metabolites concentration in experimental models of Huntington's disease serum and in Huntington's disease patients plasma.
4. Analysis of energy and nucleotide metabolism in the cellular model of Huntington's disease.

13. EXPERIMENTAL MODELS AND METHODS

Two HD mice models in the symptomatic stage of the disease were used: 2-month-old R6/2 mice and 22-month-old *Hdh*Q150 mice. The R6/2 strain has a fragment of the 5' human huntingtin gene, whereas the *Hdh*Q150 strain has an excessive amount (150) of CAG repeats within the mouse huntingtin gene.^{41,42} The R6/2 mice are characterized by the rapid onset of the first symptoms and progression of the disease. In *Hdh*Q150 mice, the first symptoms appear at 2 years of age. In addition to animal experimental models, we used also plasma from HD patients (n=5) and healthy controls (n=5).

Furthermore, the HEK 293T cell line was used. It was transfected using plasmids pEGFP-Q23, containing 23 CAG repeats within the huntingtin gene (control group) and pEGFP-Q74, containing 74 CAG repeats within the huntingtin gene (study group). This model has been previously described as a cellular model suitable for short-term research on cellular effects in HD. It allows the formation of mutant huntingtin aggregates with high efficiency, reflecting the cellular phenotype in the advanced stage of the disease.⁴³

Experimental methods used in the doctoral thesis were: high performance liquid chromatography (determination of concentrations of adenine nucleotides and their catabolites, as well as analysis of enzymatic activities), liquid chromatography with mass spectrometry (analysis of cardiac and skeletal muscle substrate preference), enzyme-linked immunosorbent assay test (determination of AMP-activated protein kinase phosphorylation level in the heart), methods of molecular biology (DNA isolation, transfection).

The assessment of cardiac substrate preference based on the subcutaneous injection (in the skin fold in the nape of the neck) of 250 μ l of 20% non-radioactive ¹³C glucose isotopomer. Before and after 120 minutes of injection, blood was collected from the tail vein to determine ¹³C glucose enrichment (¹³C glucose/¹²C glucose ratio in the blood). After ¹³C glucose administration, the enrichment of ¹³C glucose in the blood in each group was about 50%. Then, in 120 min after ¹³C glucose administration, mice were anesthetized and the heart was collected to determine the ¹³C alanine and ¹³C glutamate in the heart to ¹³C glucose ratio in the blood, as well as ¹³C glutamine/¹³C alanine ratio in the heart.

14. MOST IMPORTANT RESULTS

14.1. Analysis of cardiac energy and nucleotide metabolism in experimental models of Huntington's disease.

One of the objectives of this doctoral thesis is an evaluation of cardiac energy metabolism in HD mice models. Adenine nucleotides such ATP, ADP, and AMP as well as ATP/ADP ratio (which is a parameter of the energy balance of the cell) were determined (**Figure 3**; Work A; Fig.1). It is well known that high levels of ATP are necessary to maintain proper heart function. HD mice models hearts were characterized by decreased ATP concentration as well as ATP/ADP ratio. Interestingly, decreased ATP concentration was also demonstrated in the hearts of patients with dilated cardiomyopathy.⁴⁴ In addition, elevated concentration of AMP in the R6/2 mice hearts may activate AMP- activated protein kinase (AMPK).

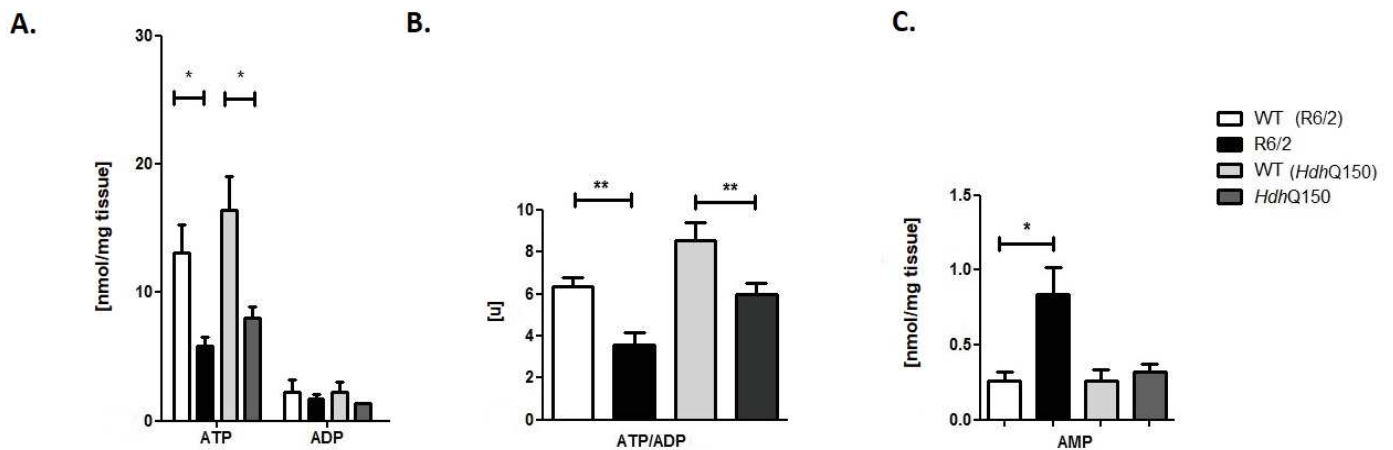


Figure 3. Reduced ATP concentration and ATP/ADP ratio in HD mice models hearts (R6/2 and HdhQ150) in comparison to control animals (WT). Elevated cardiac AMP concentration in R6/2 mice.

A) ATP and ADP concentration, B) ATP/ADP ratio, C) AMP concentration in R6/2, HdhQ150 and control mice (WT) hearts. Results presented as mean \pm SEM (n=5), * p < 0.05, ** p < 0.01, statistical analysis was performed using the Student's t-test. Based on: Appendix-Work A.

Other important compounds whose concentration and relationship reflect the cardiac energy metabolism energy are phosphocreatine and creatine. These compounds form the creatine kinase system responsible for rapid regeneration of ATP pool in high energy demand.⁴⁵ The hearts of both HD mice models were characterized by a reduced concentration of phosphocreatine (**Figure 4**; Work A; Fig.1). However, no differences were observed between the groups in creatine concentration and in the phosphocreatine to creatine ratio. The reduction of the phosphocreatine pool is an important marker of cardiac dysfunction and was also observed in many animal models of cardiomyopathy.^{46,47}

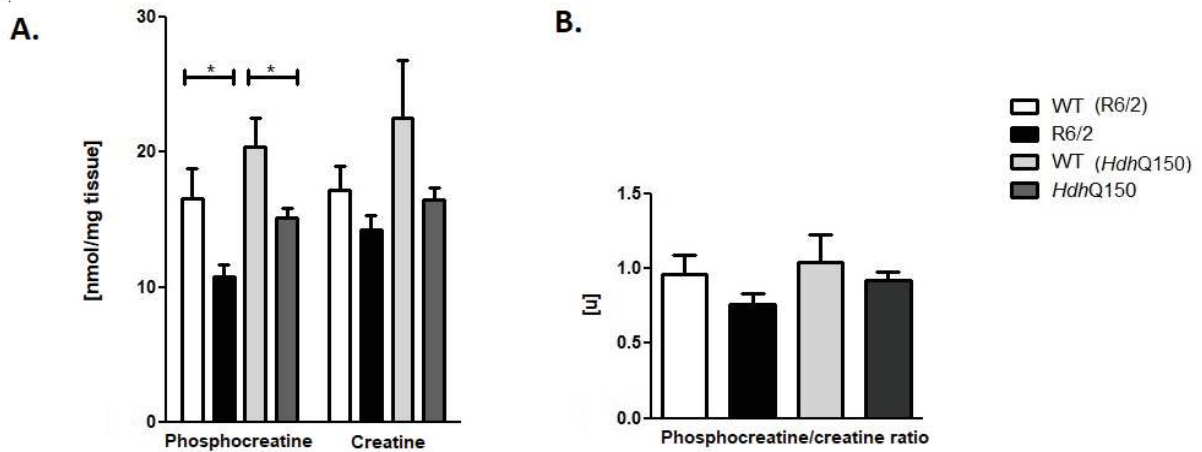


Figure 4. Reduced phosphocreatine concentration and no changes in phosphocreatine/creatine ratio in HD mice models hearts (R6/2 and *HdhQ150*) compared to control animals (WT).

A) The concentration of phosphocreatine and creatine, B) Phosphocreatine/creatine ratio in the R6/2, *HdhQ150* and control mice (WT) hearts. Results are presented as mean \pm SEM (n=5), * p < 0.05, statistical analysis was performed using the Student's t-test. Based on: Appendix-Work A.

In addition, to investigate the steady-state internal redox status in HD mice hearts, concentrations of oxidized and reduced forms of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺ and NADH) were assessed. In both HD mice models, a decreased NADH concentration and NADH/NAD⁺ ratio were indicated, which may suggest the disturbances of redox processes or mitochondrial dysfunction (**Figure 5**, Work A, Fig.2).

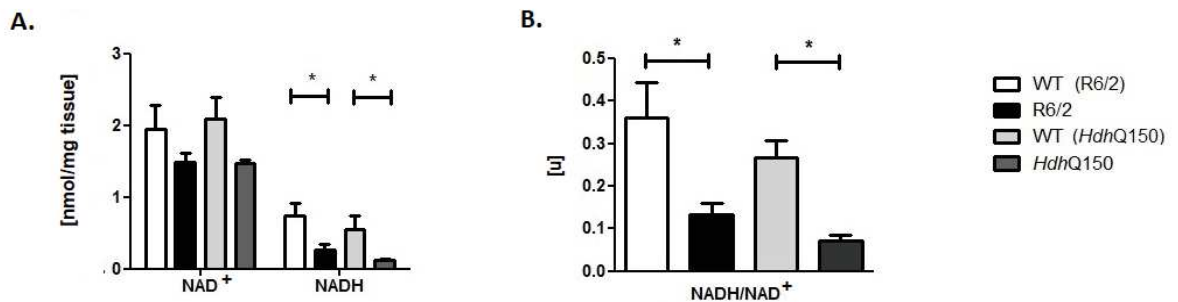


Figure 5. Reduced NADH concentration and NADH/NAD⁺ ratio in HD mice models hearts (R6/2 and *HdhQ150*) in comparison to control animals (WT).

A) The concentration of the oxidized and reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺ and NADH), B) NADH/NAD⁺ ratio in R6/2, *HdhQ150* and control mice (WT) hearts. Results are presented as mean \pm SEM (n=5), * p < 0.05, statistical analysis was performed using Student's t-test. Based on: Appendix-Work A.

Deteriorations in cardiac energy metabolism, redox status imbalance, as well as an elevated concentration of AMP, may activate the AMP-activated protein kinase pathway (AMPK). AMP binding to the AMPK γ -subunit leading to a five-fold increase in enzyme activity. In addition, binding of the AMP molecule through the γ subunit prevents dephosphorylation of protein which blocks the inhibition of AMPK by phosphatases.⁴⁸ To confirm this hypothesis, cardiac AMPK phosphorylation level was determined. HD mice models hearts were characterized by an increased AMPK phosphorylation level (**Figure 6**, Work A, Fig. 5), which indicates the activation of the AMPK pathway.

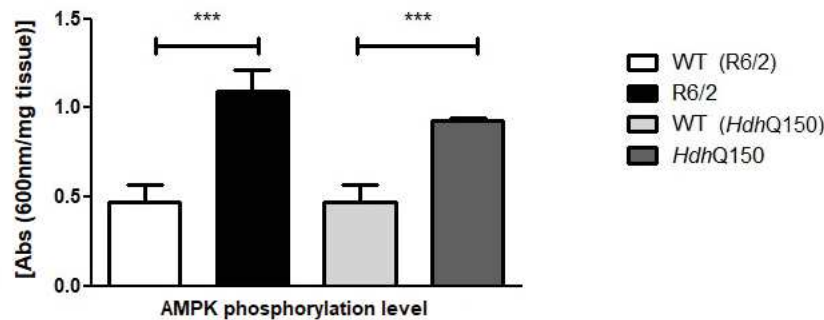


Figure 6. Elevated AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation level in HD mice models hearts (R6/2 and *HdhQ150*) in comparison to control animals (WT).

Level of AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation in R6/2, *HdhQ150* and control (WT) mice hearts. Results are presented as mean \pm SEM (n=5), *** p <0.001, statistical analysis was performed using the Student's t-test. Based on: Appendix-Work A.

The activation of the AMPK pathway plays an important role in modifying the cardiac substrate preference and regulation of mitochondrial biogenesis.⁴⁹ Therefore, the next step of this research was the determination of cardiac substrate preference in both investigated HD mice models using a stable ^{13}C glucose isotopomer. In this method, ^{13}C alanine enrichment in the heart to ^{13}C glucose in the blood ratio indicates the efficiency of the glycolysis process, while the ^{13}C glutamate enrichment in heart to ^{13}C glucose enrichment in the blood reflects the efficiency of further acetyl-CoA catabolism in the Krebs cycle. In addition, ^{13}C glutamine to ^{13}C alanine enrichment in the heart represents the overall efficiency of glucose utilization in cardiac energy metabolism. In the HD mice models hearts, a reduced ratio of ^{13}C glutamate in the heart to ^{13}C glucose in the blood was observed that indicated an altered Krebs cycle (**Figure 7B**, Work A; Fig.5). In addition, a reduced cardiac ^{13}C glutamate to ^{13}C glucose ratio was observed in tested HD mice models, that suggested a reduced glucose contribution in overall cardiac energy metabolism (**Figure 7C**, Work A; Fig. 5). These results indicate that despite the activation of AMPK pathway, there is no change in cardiac substrate preferences from free fatty acids to glucose (a characteristic modification of cardiac metabolism in high energy demand and under hypoxia conditions), which may intensify energy metabolism deficiencies.

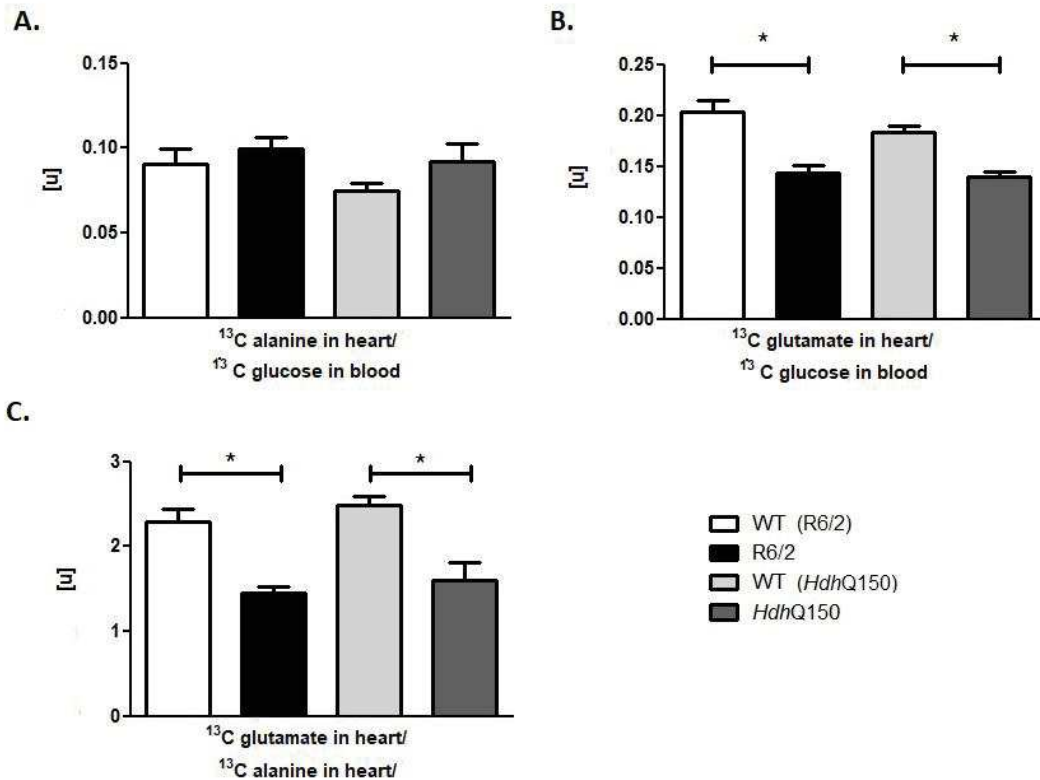


Figure 7. Increased glucose use in HD mice models (R6/2 and *HdhQ150*) cardiac metabolism relative to control (WT).

A) ^{13}C alanine enrichment in heart to ^{13}C glucose enrichment in blood ratio, B) ^{13}C glutamate enrichment in heart to ^{13}C glucose enrichment in blood ratio, C) ^{13}C glutamate enrichment in heart to ^{13}C alanine enrichment in heart ratio. Results are presented as mean \pm SEM (n=5), * p < 0.05, statistical analysis was performed using the Student's t-test. Based on: Appendix-Work A.

Cardiac energy metabolism deterioration may be caused by disturbances in activities of enzymes involved in adenine nucleotide catabolism. Results described in [paper A](#) of this PhD thesis revealed the changes in expression of genes involved in *de novo* purine synthesis (eg. *Adsl* - adenylosuccinate lyase), as well as genes coding the proteins involved in adenosine metabolism (eg. *Ada* - adenosine deaminase, *Dpp4* - dipeptidyl peptidase 4) or adenine nucleotide catabolism (eg. *Entpd2* - ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2). Following these findings, we examine the activity of enzymes involved in intracellular (ADA, PNP, AMPD) and extracellular (eNTPD, e5NT) adenine nucleotide catabolism in hearts homogenates of the one previously tested HD mice model, R6/2. R6/2 mice hearts were characterized by increased activity of the adenosine-degrading enzyme - adenosine deaminase (ADA) and reduced activity of the AMP deaminase, the enzyme converting AMP to IMP (**Figure 8A, 8C, Work C, Figure 1**). There were no statistically significant differences in PNP activities between groups (**Figure 8B, Work C, Fig.1**). Moreover, the decreased activity of the enzyme involved in the extracellular production of adenosine, ecto-5'-nucleotidase (e5NT) has been demonstrated (**Figure 8E, Work C, Fig.1**). However, there were no changes in

the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity (eNTPD) in HD mice models hearts relative to WT (**Figure 8D**, Work C, Fig.1). Reduced production and increased degradation cardioprotective adenosine in R6/2 mice hearts may lead to reduced cardiac concentration of adenosine, and therefore to impaired adenosine signaling through adenosine receptors and cardiovascular system dysfunction i.e. reduced vasodilatation or tachycardia.

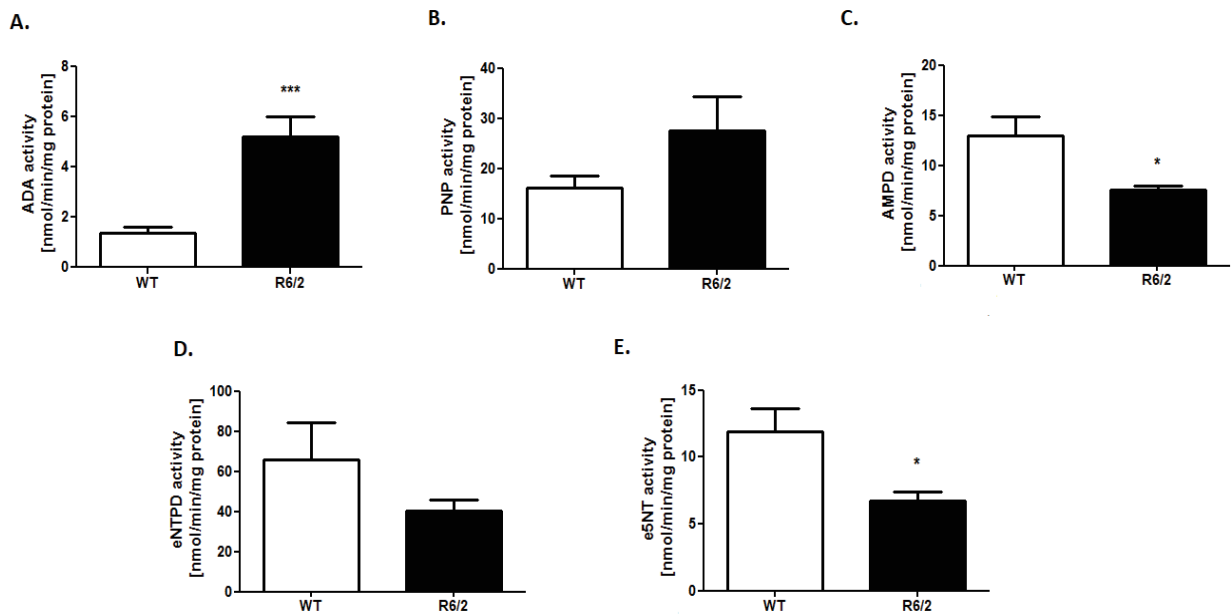


Figure 8. Elevated ADA activity, decreased AMPD and e5NT activity in R6/2 mice hearts relative to control (WT).

A) ADA activity, B) PNP activity, C) AMPD activity, D) eNTPD activity, E) e5NT activity in the R6/2 and control (WT) mice hearts.

Results are presented as mean \pm SEM (n = 5), * p < 0.05, *** p < 0.001, statistical analysis was performed using the Student's t-test. Based on: Appendix-Work C.

14.2. Analysis of energy metabolism and substrate preference in skeletal muscle of experimental models of Huntington's disease and its comparison to the changes observed in the heart.

The results published in [paper B](#) that comprises this Ph.D. thesis revealed the presence of skeletal muscle dysfunctions in investigated HD mice models. Changes in the contractility of fast muscle fibers accompanied by a decrease in contraction force and the number of motor units innervating the muscles of the hind legs were observed. Skeletal muscle dysfunction may be caused by disturbances in skeletal muscle energy metabolism. Analysis of energy metabolism was performed in three types of skeletal muscles (*EDL-Extensor digitorum longus*, *TA-Tibialis anterior*, *Soleus*) of the HD mice models (R6/2 and *HdhQ150*).

The ATP, ADP, and AMP concentrations were measured (**Table 1**, Work B, Fig. 5 and Table 1). *EDL*, *TA*, and *Soleus* in both HD mice models were characterized by a decreased ATP concentration. These trends coincided with the changes observed in the HD mice models hearts. A statistically significantly reduced ADP concentration was observed in the *EDL*, *TA*, and *Soleus* from *HdhQ150* mice model and in the *TA* from R6/2 mice strain compared to the control animals. Nevertheless, the opposite tendency was observed in AMP concentration (than that observed in the heart). AMP concentration was decreased in the *EDL* and *Soleus* from *HdhQ150* mice as well as in *Soleus* from R6/2 mice. Despite the lack of statistical significance in all the examined parameters, the obtained results clearly suggest the presence of energy metabolism deteriorations in HD mice models skeletal muscles.

<i>Extensor digitorum longus (EDL)</i>	ATP [nmol/mg tissue]	ADP [nmol/mg tissue]	AMP [nmol/mg tissue]
WT (R6/2)	7.4 ± 1.8	2.4 ± 0.3	0.22 ± 0.06
R6/2	5.9 ± 0.7	2.4 ± 0.3	0.20 ± 0.05
WT (<i>HdhQ150</i>)	7.6 ± 0.8	2.0 ± 0.1	0.49 ± 0.07
<i>HdhQ150</i>	2.1 ± 0.4***	1.6 ± 0.1 *	0.37 ± 0.06*

<i>Tibialis anterior (TA)</i>	ATP [nmol/mg tissue]	ADP [nmol/mg tissue]	AMP [nmol/mg tissue]
WT (R6/2)	29.8 ± 6.3	2.8 ± 0.4	1.0 ± 0.1
R6/2	14.1 ± 1.6*	2.5 ± 0.1*	0.9 ± 0.1
WT (<i>HdhQ150</i>)	33.3 ± 7.9	3.5 ± 0.6	3.9 ± 1.5
<i>HdhQ150</i>	9.5 ± 0.8*	2.3 ± 0.2 *	2.6 ± 1.5

<i>Soleus</i> (S)	ATP [nmol/ mg tissue]	ADP [nmol/ mg tissue]	AMP [nmol/ mg tissue]
WT (R6/2)	3.5 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.3
R6/2	1.9 ± 0.1**	2.1 ± 0.3	0.7 ± 0.1**
WT (<i>HdhQ150</i>)	6.0 ± 0.5	3.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1
<i>HdhQ150</i>	3.3 ± 0.3**	1.5 ± 0.2***	0.52 ± 0.05***

Table 1. Reduced concentrations of adenine nucleotides (ATP, ADP, AMP) in HD mice models (R6/2 and *HdhQ150*) skeletal muscle relative to control animals (WT).

Concentrations of ATP, ADP, AMP in *Extensor digitorum longus* (EDL), *Tibialis anterior* (TA), *Soleus* (S) in R6/2, *HdhQ150* and control mice (WT). Results are presented as mean ± SEM (n = 5), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, statistical analysis was performed using Student's t-test. Based on: Appendix-Work B.

In the mentioned above types of skeletal muscles, the concentration of phosphocreatine and creatine and their ratio were also determined (Table 2, Work B, Table 1). A significant reduction of both parameters was observed in the majority of examined skeletal muscles (these changes were not statistically significant only in *Soleus* from R6/2 mice model). Interestingly, the changes observed in the HD mice models skeletal muscles overlap with the changes observed not only in hearts of these animals but also in skeletal muscle biopsies from HD patients. These patients exhibited a reduced ATP to phosphocreatine ratio as well as ATP / free phosphate (Pi) ratio in the symptomatic and pre-symptomatic stage of the disease.⁵⁰

<i>Extensor digitorum longus</i> (EDL)	Phosphocreatine [nmol/mg tissue]	Phosphocreatine/ Creatine
WT (R6/2)	157.1 ± 31.2	5.7 ± 1.4
R6/2	50.7 ± 5.7***	2.4 ± 0.3**
WT (<i>HdhQ150</i>)	52.1 ± 1.9	2.3 ± 0.1
<i>HdhQ150</i>	29.1 ± 1.3***	2.1 ± 0.2*

<i>Tibialis anterior</i> (TA)	Phosphocreatine [nmol/mg tissue]	Phosphocreatine/ Creatine
WT (R6/2)	219.3 ± 21.2	5.7 ± 0.5
R6/2	79.6 ± 5.1***	2.9 ± 0.5**
WT (<i>HdhQ150</i>)	176.4 ± 28.9	3.3 ± 0.4
<i>HdhQ150</i>	160.9 ± 8.0*	1.9 ± 0.1***

<i>Soleus</i> (S)	Phosphocreatine [nmol/mg tissue]	Phosphocreatine/ Creatine
WT (R6/2)	118.98±11.85	7.05±0.75
R6/2	96.75±12.62	7.07±0.79
WT (<i>HdhQ150</i>)	144.43±18.53	4.72±0.68
<i>HdhQ150</i>	70.31±7.64**	4.34±0.87

Table 2. Decreased phosphocreatine and phosphocreatine/creatinine ratio in HD mice models (R6/2 and *HdhQ150*) skeletal muscle in comparison to control animals (WT).

Phosphocreatine concentration and phosphocreatine/creatinine ratio in *Extensor digitorum longus* (EDL), *Tibialis anterior* (TA), *Soleus* (S) from R6/2, *HdhQ150* and control mice (WT). Results are presented as mean ± SEM (n=5), * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, statistical analysis was performed using Student's t-test. Based on: Appendix-Work B.

To compare the abnormalities in steady-state internal redox status observed in HD mice models hearts to changes revealed in skeletal muscles, the concentrations of NAD⁺, NADH, and NADH /NAD⁺ ratio (Table 3, Work B, Fig. 5 and Table 1) were determined. EDL and TA muscles from R6/2 mice model were characterized by decreased NADH concentration. Moreover, a decreased concentration of NAD⁺ in EDL and TA from both the R6/2 and *HdhQ150* strains were observed. Interestingly, the evaluation of the NADH/NAD⁺ ratio in skeletal muscle showed a reverse tendency compared to the changes observed in the heart. EDL and *Soleus* from R6/2 mice were characterized by an elevated NADH/NAD⁺ ratio. These results, as in the case of those obtained in HD mice models hearts, suggest the presence of disturbances in the steady-state internal redox status.

<i>Extensor digitorum longus</i> (EDL)	NAD ⁺ [nmol/ mg tissue]	NADH [nmol/ mg tissue]	NADH/NAD ⁺
WT (R6/2)	1.0 ± 0.2	0.15 ± 0.05	0.10± 0.02
R6/2	0.34 ± 0.08**	0.09 ± 0.1	0.29 ± 0.01***
WT (<i>HdhQ150</i>)	0.7 ± 0.1	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.02
<i>HdhQ150</i>	0.21 ± 0.05**	0.022± 0.005**	0.14 ± 0.03

<i>Tibialis anterior</i> (TA)	NAD ⁺ [nmol/ mg tissue]	NADH [nmol/ mg tissue]	NADH/NAD ⁺
WT (R6/2)	2.7 ± 0.5	0.30 ± 0.01	0.15 ± 0.02
R6/2	1.1 ± 0.1**	0.16 ± 0.01***	0.14 ± 0.01
WT (<i>Hdh</i> Q150)	2.4 ± 0.5	0.13 ± 0.04	0.06 ± 0.02
<i>Hdh</i> Q150	1.4 ± 0.1***	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01

<i>Soleus</i> (S)	NAD ⁺ [nmol/ mg tissue]	NADH [nmol/ mg tissue]	NADH/NAD ⁺
WT (R6/2)	0.58±0.036	0.11 ± 0.01	0.12±0.02
R6/2	0.38±0.038**	0.29 ± 0.02	0.75±0.01***
WT (<i>Hdh</i> Q150)	1.00±0.14	0.10 ± 0.04	0.09±0.02
<i>Hdh</i> Q150	0.81±0.17	0.031 ± 0.004	0.13±0.01

Table 3. Reduced concentrations of NAD⁺, NADH, and elevated NADH/NAD⁺ ratio in HD mice models (R6/2 and *Hdh*Q150) skeletal muscles compared to control animals (WT).

Concentrations of NAD⁺, NADH, and NADH/NAD⁺ ratio in *Extensor digitorum longus* (EDL), *Tibialis anterior* (TA), *Soleus* (S) R6/2, *Hdh*Q150 and control mice (WT). Results are presented as mean ± SEM (n = 5), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, statistical analysis was performed using Student's t-test. Based on: Appendix-Work B.

We evaluated also ¹³C alanine and ¹³C glutamate enrichment in skeletal muscle to ¹³C glucose in the blood ratios in HD mice models, as well as ¹³C glutamine to ¹³C alanine in skeletal muscle ratio (**Figure 9**, Work B; Fig.5). Reduced glucose oxidation (reduction of ¹³C alanine in skeletal muscle/¹³C glucose in blood ratio), as well as reduced utilization of acetyl-CoA in the Krebs cycle (reduced ¹³C glutamate in skeletal muscle/¹³C glucose in blood ratio), were observed in EDL and *Soleus* from both tested HD mice models. These changes fit in with the changes observed in the hearts of these animals. However, these changes did not differ significantly in the case of TA. There were also no changes in ¹³C glutamate/ ¹³C alanine ratio.

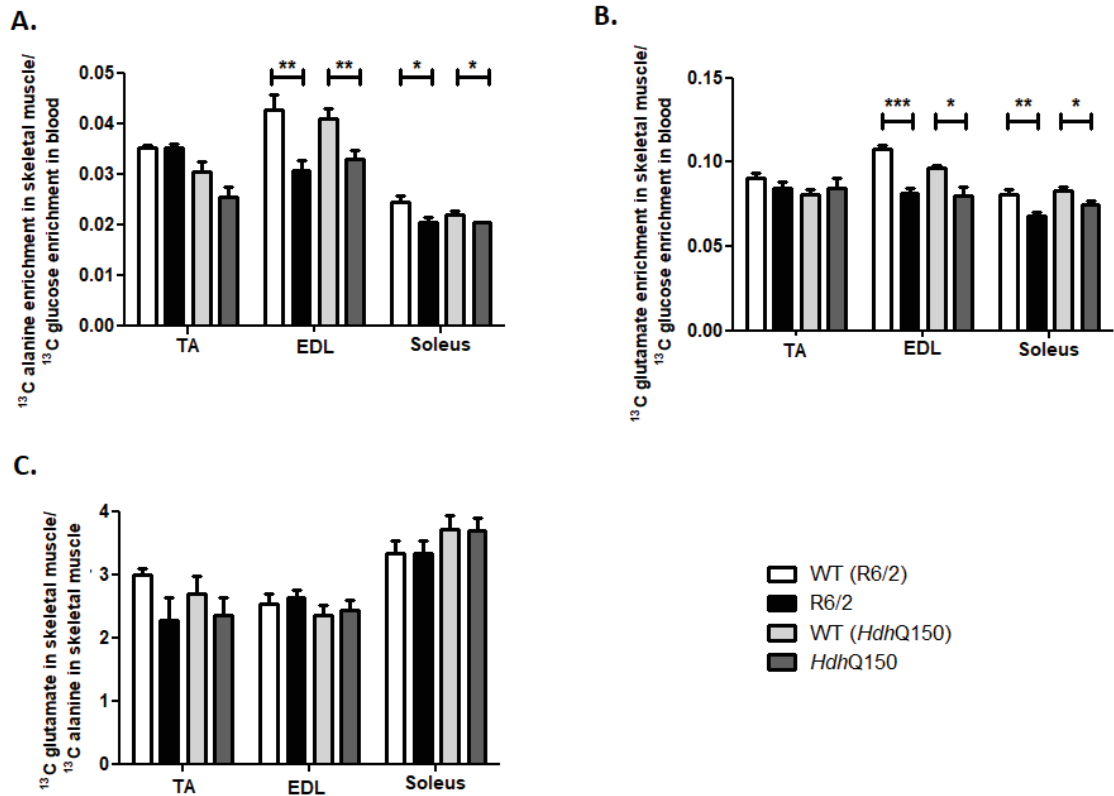


Figure 9. Reduced glucose oxidation in HD mice models (R6/2 and *HdhQ150*) skeletal muscles compared to control animals (WT).

A) ^{13}C alanine enrichment in skeletal muscle/ ^{13}C glucose enrichment in blood ratio,
 B) ^{13}C glutamate enrichment in skeletal muscle/ ^{13}C glucose enrichment in blood ratio,
 C) ^{13}C glutamate enrichment in skeletal muscle/ ^{13}C alanine enrichment in skeletal muscle ratio in *Tibialis anterior* (TA), *Extensor digitorum longus* (EDL) and *Soleus* (S) from R6/2, *HdhQ150* and control mice (WT). Results are presented as mean \pm SEM (n=5), * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, statistical analysis was performed using Student's t-test. Based on: Appendix-Work B.

14.3. Analysis of nucleotide metabolites concentration in experimental models of Huntington's disease serum and Huntington's disease patients plasma.

Disturbed cardiac and skeletal muscle energy metabolism may cause changes in the profile of nucleotide metabolites in the serum. Despite the lack of significant differences in ATP, ADP, and NAD⁺ concentrations in mouse serum (R6/2 and *Hdh*Q150 strain), increases in adenine nucleotide catabolites concentration, i.e. inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, were observed compared to control animals (**Figure 10A**; Work A; Fig. 3). In addition, there was an approximately 2-fold increase in the serum uridine concentration (**Figure 10B**, Work A, Fig. 3), which is a marker of cell energy imbalance.⁵¹ It may be caused by their intensive release by dysfunctional skeletal muscle and heart.

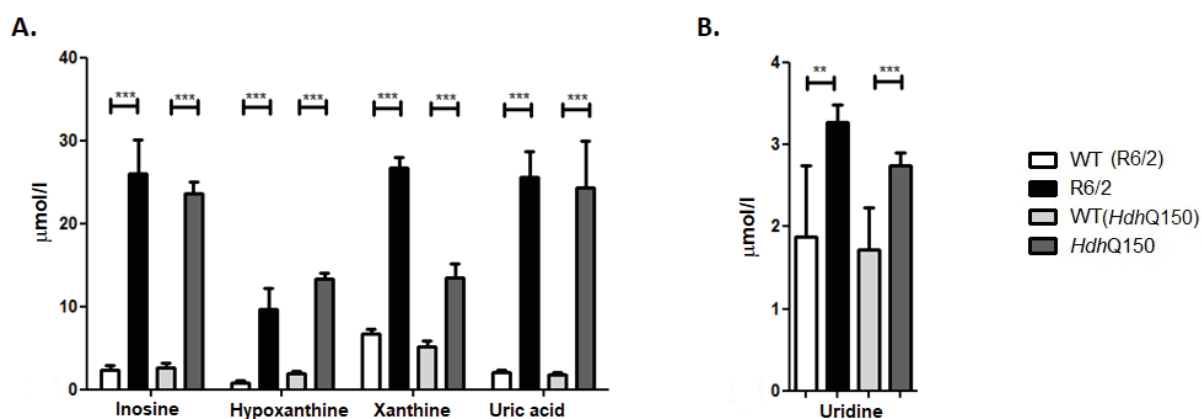


Figure 10. Elevated concentration of inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid, as well as an increase in uridine in HD mice serum (R6/2 and *Hdh*Q150) compared to control animals (WT).

A) Concentrations of inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, B) Uridine concentration in R6/2, *Hdh*Q150 and control mice (WT) serum.

Results are presented as mean \pm SEM (n=5), ** p < 0.01, *** p < 0.001, statistical analysis was performed using Student's t-test. Based on: Appendix-Work A.

The next stage of the Ph.D. thesis was an analysis of nucleotide metabolites concentration in HD patients and healthy control plasma. In HD patients, besides no changes in plasma uric acid concentration compared to healthy subjects, elevated concentrations of hypoxanthine and uridine were observed (**Figure 11**, Work A, Fig. 4). The same tendency we observed also in HD mice models. These results indicate that patients with advanced HD may also suffer for energy deficits in peripheral tissues, resulting in an increase in nucleotide metabolites in plasma. In addition, increased hypoxanthine and uridine observed in both, experimental models and HD patients, suggests a significant value of these parameters as new HD biomarkers associated with cellular energy metabolism.

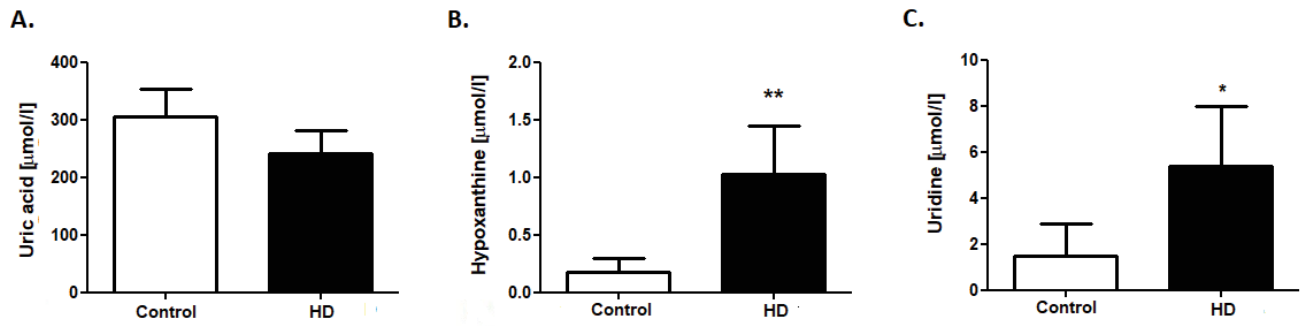


Figure 11. An increased concentration of hypoxanthine and uridine in HD patients plasma compared to healthy controls.

A) Uric acid concentration, B) Hypoxanthine concentration, C) Uridine concentration in HD patients with advanced Huntington's disease and control subjects (healthy individuals) plasma. Results are presented as mean \pm SEM ($n=5$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistical analysis was performed using the Student's t-test. Based on: Appendix-Work A.

14.4. Analysis of energy and nucleotide metabolism in the cellular model of Huntington's disease.

To determine the role of the mutant HTT (mHTT) in energy and adenine nucleotide metabolism deterioration, *in vitro* experiments using the HEK 293T cell line transfected with the pEGFP-Q74 plasmid containing 74 CAG repeats within the *Htt* gene were performed. The control group consisted of cells transfected with the pEGFP-Q23 plasmid containing 23 repeats of CAG. Analysis of cell energy metabolism (ATP and NAD⁺ concentrations) and analysis of activities of enzymes involved in extracellular adenine nucleotide pathway (eNTPD, e5NT, eADA) as well as intracellular adenine nucleotide pathway (ADA, PNP, AMPD) were performed three days after transfection, when the transfection efficiency was 90% and the level of cellular confluence was about 80-100%. There was a statistically significant decrease in ATP concentration in cells characterized by a higher number of CAG repeats within the *Htt* gene relative to the control group. However, there was no difference in NAD⁺ concentration between the study groups (**Figure 12**, Work D, Figure 1). These results suggest that the presence of mHTT in the cell leads to the reduction of ATP levels and, as a consequence, leads to disturbances in cellular energy metabolism.

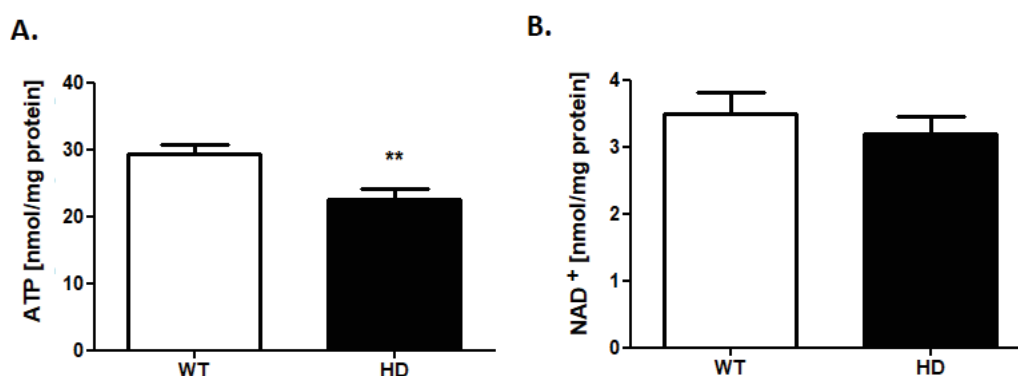


Figure 12. Reduced ATP concentration and no changes in NAD⁺ concentration in a cellular model of Huntington's disease (HD) in comparison to control cells (WT).

A) ATP concentration, B) NAD⁺ concentration in HEK 293T cell line transfected with the pEGFP-Q23 (WT) and pEGFP-Q74 (HD) plasmids. Results were presented as mean \pm SEM (n=20), ** p < 0.01, statistical analysis was performed using Student's t-test. Based on: Appendix-Work D.

The intracellular ATP and other adenine nucleotides pool are controlled by intra- and extra-cellular enzymes of the adenine nucleotide catabolism. Increased intracellular ADA activity was observed in the HD cell model, which may result in a reduced pool of intracellular adenosine (**Figure 13**, Work D, Fig.2). Thus, the decreased adenosine concentration may lead to worsening of energy metabolism deterioration in the cell. However, there were no significant differences in AMPD and PNP activity between the study groups.

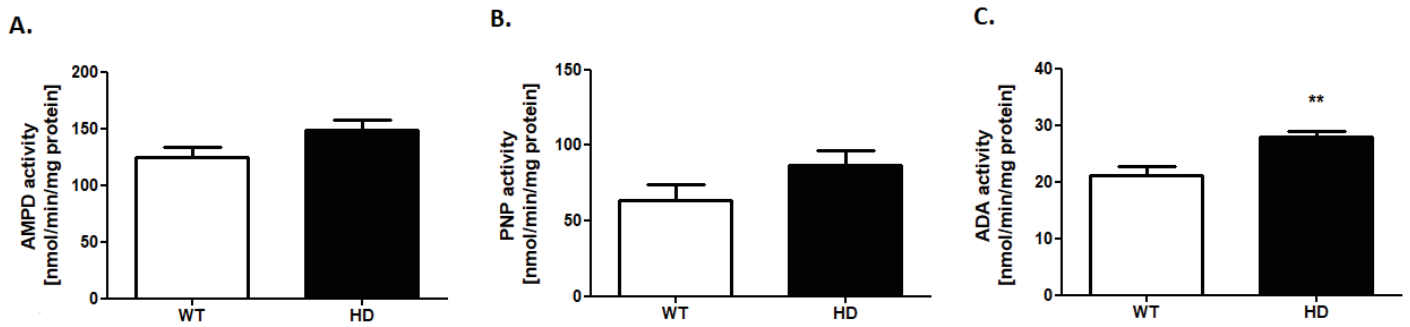


Figure 13. Increased ADA activity and no changes in AMPD and PNP activity in HD cellular model (HD) relative to control cells (WT).

A) AMP deaminase activity (AMPD), B) Purine nucleoside phosphorylase (PNP) activity, C) Adenosine deaminase (ADA) activity in HEK 293T cell line transfected with the pEGFP-Q23 (WT) and pEGFP-Q74 (HD) plasmids. Results were presented as mean \pm SEM (n= 20), ** p <0.01, statistical analysis was performed using Student's t-test. Based on: Appendix-Work D.

The mutant form of the huntingtin may interact with proteins involved in gene transcription, signaling or intracellular transport. The results described in this Ph.D. thesis also suggest that cells characterized by an excessive number of CAG repeats within the huntingtin gene exhibited the presence of extracellular signaling disorders. This is revealed by reduced activity of all investigated extracellular enzymes, such as ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (eNTPD) - converting ATP to ADP and AMP; ecto-5'-nucleotidase (e5NT) - responsible for the hydrolysis of AMP to adenosine; ecto- adenosine deaminase (eADA) - enzyme responsible for adenosine to inosine degradation (**Figure 14**; Work D; Fig. 3).

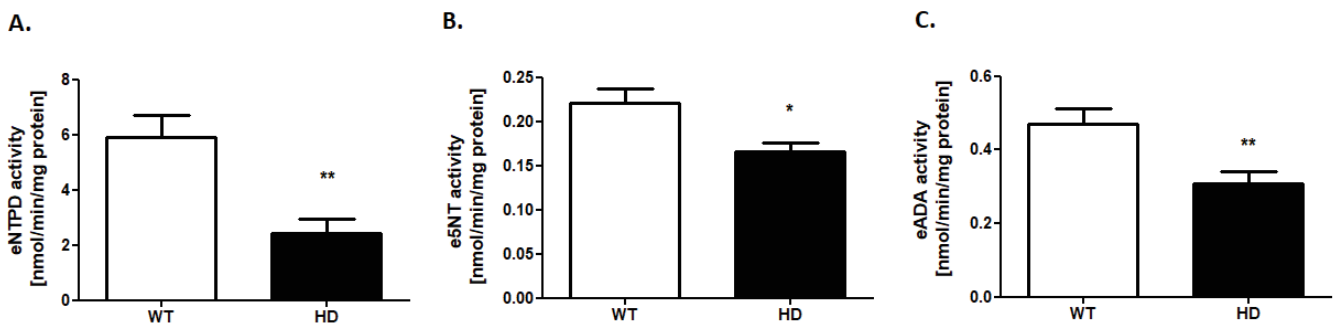


Figure 14. Reduced activity of enzymes involved in extracellular adenine nucleotides catabolism (eNTPD, e5NT, eADA) in a cellular model of Huntington's disease (HD) in comparison to control cells (WT).

A) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (eNTPD) activity, B) Ecto-5'-nucleotidase (e5NT) activity, C) Ecto- adenosine deaminase (eADA) activity in HEK 293T cell line transfected with pEGFP-Q23 (WT) plasmids and pEGFP- Q74 (HD). Results are presented as mean \pm SEM (n=20), * p <0.05, ** p <0.01, statistical analysis was performed using the Student's t-test. Based on: Appendix-Work D.

15. CONCLUSIONS

Research conducted within this Ph.D. thesis unequivocally confirmed the fundamental role of energy and nucleotide metabolism in the pathology of Huntington's disease related cardiomyopathy.

Detailed conclusions are as follows:

1. Huntington's disease experimental models hearts are characterized by disturbed energy metabolism, change in cardiac substrate preference (reduced glucose use in energy metabolism) and changes in activities of enzymes involved in adenine nucleotide metabolism.
2. Changes in energy metabolism and substrate preference in Huntington's disease experimental models skeletal muscle have a similar character to changes observed in the heart.
3. The increase in hypoxanthine and uridine concentration was observed in Huntington's disease experimental models serum and plasma of Huntington's disease patients in the advanced stage of the disease.
4. HD cellular model was characterized by altered energy metabolism (decreased ATP concentration), intracellular adenine nucleotide catabolism (increased ADA activity) and decreased ecto-enzymes activities (eNTPD, e5NT, and eADA). These observations are consistent with the changes observed *in vivo*.

16. PERSPECTIVES

Disorders of nucleotide and energy metabolism are observed in many pathological conditions in the cardiovascular system. The results obtained in this Ph.D. thesis suggest that these disorders may be important in skeletal muscle and the heart of patients affected by HD. Therefore, therapies leading to improvement of energy metabolism of organs affected by HD may have positive clinical implications.

Compounds that directly improve cellular energy metabolism, eg. coenzyme Q10 may be useful as therapy. Other candidates include compounds providing substrates for the Krebs cycle, e.g. branched-chain amino acids. Interestingly, BCAA blood concentrations are significantly reduced in HD patients.⁵² An alternative might be PPAR agonists which are already widely used in preclinical studies. In 2016, one of the PPAR delta receptor agonists - KD3010 was tested in a one of HD mice model- N171-82Q. Researchers revealed improving motor function, reducing the progression of the neurodegenerative process and longer survival in treated animals.⁵³ However, skeletal muscle and heart function, as well as metabolism in the above therapies, have not yet been studied.

Therapeutic strategies may also include pharmaceuticals designed to directly improve the disrupted nucleotide metabolism in HD. Studies performed in our team have shown that simultaneous administration of adenosine metabolism inhibitors and substrates for the adenine nucleotide synthesis, lead to improvement of the mechanical function of the heart, energy metabolism and the adenine nucleotide pool.^{54,55}

An interesting therapeutic solution also seems to be NAD⁺ precursors, eg. nicotinamide riboside, which would regenerate depleted NAD⁺ pool, improve mitochondrial function, and thus energy metabolism of the cells. It is known that the treatment of induced pluripotent stem cells (iPSC) isolated from patients with Parkinson's disease with nicotinamide riboside significantly reduced mitochondrial defects and improved the function of neuronal cells.⁵⁶

Huntington's disease is difficult to diagnose. It is most often diagnosed during the manifestation of the first symptoms of the disease. To date, the only reliable diagnosis of HD is genetic testing showing an excessive number of CAG repeats within the *HTT* gene. Despite many clinical trials, there is no compound that has a clear link with HD for early diagnosis. Nevertheless, the metabolites associated with motor dysfunction, i.e. the light chain of neurofilament, are promising.⁵⁷ Mentioned in the Ph.D. thesis, increased hypoxanthine and uridine concentration in HD patients plasma correlating with disease progression parameters (the number of CAG repeats) might be new biomarkers of HD related to energy metabolism deterioration. However, we used a small number of patients in this study, thus, this hypothesis requires further verification.

17. PIŚMIENNICTWO/ REFERENCES

1. Walker, F. O. Huntington's disease. *Lancet*, 369, 218–228 (2007).
2. Sturrock, A. *et al.* The clinical and genetic features of Huntington disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 23, 4, 243-259. (2010).
3. McColgan, P. *et al.* Huntington's disease: a clinical review. *European Journal of Neurology*, 25, 1, :24-34. (2018).
4. Epping, E. A. *et al.* Depression in the early stages of Huntington disease. *Neurodegener. Dis. Manag.*, 1, 5, 407-414. (2011).
5. Li, S. H. *et al.* Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, 11, 985–993 (1993).
6. Li, S. H. *et al.* Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet*, 20, 146–154 (2004).
7. Davies, S. W. *et al.* Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 90, 537–548 (1997).
8. Moffitt, H. *et al.* Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*, 1, 5, 407-414 (2009).
9. Hoffner, G. *et al.* Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *J Cell Sci*, 115, 941–948 (2002).
10. Godin, J. D. *et al.* Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron*, 67, 392–406 (2010).
11. Velier, J. *et al.* Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp Neurol*, 152, 34–40 (1998).
12. Harjes, P. *et al.* The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci*, 28, 425–433 (2003).
13. Schulte, J. *et al.* The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Curr. Trends Neurol.* 1, 5, 65-78 (2011).
14. Brustovetsky, N. *et al.* Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's Disease. *J Neurochem*, 93, 1361–1370 (2005).
15. Damiano, M. *et al.* Mitochondria in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (2010). doi:10.1016/j.bbadis.2009.07.012
16. Kim, J. *et al.* Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* (2010). doi:10.1093/hmg/ddq306
17. Busse, M. E. *et al.* Use of hand-held dynamometry in the evaluation of lower limb muscle strength in people with Huntington's disease. *J Neurol*, 255, 1534–1540 (2008).
18. Saft, C. *et al.* Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Mov Disord*, 20, 674–679 (2005).
19. Kojer, K. *et al.* Huntingtin Aggregates and Mitochondrial Pathology in Skeletal Muscle but not Heart of Late-Stage R6/2 Mice. *J. Huntingtons. Dis.* (2019). doi:10.3233/JHD-180324
20. Tsang, T. M. *et al.* Metabolic characterization of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease by high-resolution MAS 1H NMR spectroscopy. *J Proteome Res*, 5, 483–492 (2006).

21. Ciammola, A. *et al.* Increased apoptosis, Huntingtin inclusions and altered differentiation in muscle cell cultures from Huntington's disease subjects. in *Cell Death Differ* 13, 2068–2078 (2006).
22. Chaturvedi, R. K. *et al.* Impaired PGC-1 α function in muscle in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* (2009). doi:10.1093/hmg/ddp243
23. Johri, A. *et al.* Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* (2012). doi:10.1093/hmg/ddr541
24. Lanska, D. J. *et al.* Huntington's disease mortality in the United States. *Neurology*, 38, 769–772 (1988).
25. Chiu, E. *et al.* Causes of death in Huntington's disease. *Med J Aust*, 1, 153 (1982).
26. Andrich, J. *et al.* Autonomic nervous system function in Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72, 726–731 (2002).
27. Hasselbalch, S. G. *et al.* Reduced regional cerebral blood flow in Huntington's disease studied by SPECT. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55, 1018–1023 (1992).
28. Melik, Z. *et al.* Microcirculation response to local cooling in patients with Huntington's disease. *J Neurol*, 259, 921–928 (2012).
29. Sharma, K. R. *et al.* Sympathetic skin response and heart rate variability in patients with Huntington disease. *Arch Neurol*, 56, 1248–1252 (1999).
30. Mielcarek, M. *et al.* Dysfunction of the CNS-heart axis in mouse models of Huntington's disease. *PLoS Genet*, 10, e1004550 (2014).
31. Wood, N. I. *et al.* Direct evidence of progressive cardiac dysfunction in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Huntingtons Dis*, 1, (2012).
32. Kiriazis, H. *et al.* Neurocardiac dysregulation and neurogenic arrhythmias in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Physiol*, 590, 5845–5860 (2012).
33. Mielcarek, M. *et al.* The Huntington's disease-related cardiomyopathy prevents a hypertrophic response in the R6/2 mouse model. *PLoS One*, 9, e108961 (2014).
34. Wu, B. T. *et al.* Cardiac Fas-Dependent and Mitochondria-Dependent Apoptotic Pathways in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *Cardiovasc Toxicol*, 16, 2, 111–112 (2015).
35. Joviano-Santos, J. V. *et al.* Increased oxidative stress and CaMKII activity contribute to electro-mechanical defects in cardiomyocytes from a murine model of Huntington's disease. *FEBS J.* 286, 1, 110–123.(2019).
36. Mihm, M. J. *et al.* Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 25, 297–308 (2007).
37. Child, D. D. *et al.* Cardiac mTORC1 Dysregulation Impacts Stress Adaptation and Survival in Huntington's Disease. *Cell Rep.* 23, 4, 1020–1033. (2018).
38. Ventura-Clapier, R. *et al.* Energy metabolism in heart failure. *J Physiol*, 555, 1–13 (2004).
39. Jaswal, J. S. *et al.* Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 1333–1350 (2011).
40. Masoud, W. G. *et al.* Failing mouse hearts utilize energy inefficiently and benefit from improved coupling of glycolysis and glucose oxidation. *Cardiovasc Res*, 101, 1, 30–38 (2013).
41. Kolwicz S. C. *et al.* Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res*, 113, 603–616 (2013).

42. Woodman, B. *et al.* The Hdh(Q150/Q150) knock-in mouse model of HD and the R6/2 exon 1 model develop comparable and widespread molecular phenotypes. *Brain Res Bull*, 72, 83–97 (2007).
43. Pierzynowska, K. *et al.* Correction of Huntington's Disease Phenotype by Genistein-Induced Autophagy in the Cellular Model. *NeuroMolecular Med*, 20, 1, 112-123. (2018).
44. Starling, R. C. *et al.* Human myocardial ATP content and in vivo contractile function. *Mol Cell Biochem*, 180, 171–177 (1998).
45. McLeish, M. J. *et al.* Relating structure to mechanism in creatine kinase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 40, 1–20 (2005).
46. Nascimben, L. *et al.* Enalapril treatment increases cardiac performance and energy reserve via the creatine kinase reaction in myocardium of Syrian myopathic hamsters with advanced heart failure. *Circulation*, 91, 1824–1833 (1995).
47. Spindler, M. *et al.* Diastolic dysfunction and altered energetics in the alphaMHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 101, 1775–1783 (1998).
48. Sanders, M. J. *et al.* Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem. J*, 403, 1, 139-48. (2007).
49. Suter, M. *et al.* Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 281, 32207–32216 (2006).
50. Lodi, R. *et al.* Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy. *Ann. Neurol*, 48, 1, 72-76. (2000).
51. Burakowski, S. *et al.* Exercise stress test and comparison of ST change with cardiac nucleotide catabolite production in patients with coronary artery disease. *Cardiol. J*, 14, 6, 573-579 (2007).
52. Duan, W. *et al.* Metabolism in HD: still a relevant mechanism? *Mov Disord*, 29, 1366–1374 (2014).
53. Dickey, A. S. *et al.* PPAR- δ is repressed in Huntington's disease, is required for normal neuronal function and can be targeted therapeutically. *Nat. Med*, 22, 1, 37-45 (2016).
54. Smolenski, R. T. *et al.* Protection from reperfusion injury after cardiac transplantation by inhibition of adenosine metabolism and nucleotide precursor supply. *Circulation*, 104, 1246-52 (2001).
55. Smolenski, R. T. *et al.* Adenine/Ribose supply increases adenosine production and protects ATP pool in adenosine kinase-inhibited cardiac cells. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 30, 3, 673-83. (1998).
56. Schöndorf, D. C. *et al.* The NAD⁺ Precursor Nicotinamide Riboside Rescues Mitochondrial Defects and Neuronal Loss in iPSC and Fly Models of Parkinson's Disease. *Cell Rep*, 23, 10, 2976-2988 (2018).
57. Byrne, L. M. *et al.* Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Neurol*, 6, 8, 601-609 (2017).

18. ZAŁĄCZNIKI/ APPENDICES:

- PRACA A/ PAPER A :

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443916302162?via%3Dihub>

- PRACA B/ PAPER B :

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4352047/>

- PRACA C/ PAPER C :

<https://spiral.imperial.ac.uk:8443/handle/10044/1/32243>

- PRACA D/ PAPER D :

https://www.researchgate.net/publication/329948683_Characterization_of_adenine_nucleotide_metabolism_in_the_cellular_model_of_Huntington's_disease