

**Oszukać przeznaczenie –
perspektywy w walce z chorobą Huntingtona**

Rafał Marszałek

**ZWIĄZKI BIOLOGICZNIE AKTYWNE
KRAKÓW 2006**

"You get what anyone gets - you get a lifetime"
N. Gaiman

Choroba Huntingtona to przekleństwo rozwijającej się cywilizacji – zapomniana sierotka ewolucji, o której nie dowiedzielibyśmy się, gdyby średnia długość życia nie wzrosła w ciągu ostatnich dwóch wieków o 35 lat. To choroba genetyczna, której objawy w większości przypadków ujawniają się dopiero u ludzi w wieku prawie poprodukcyjnym, co skutecznie uniemożliwia działanie presji selekcyjnej.

Zanim w roku 1967 amerykański pieśniarz Woody Guthrie zmarł na chorobę Huntingtona, wiedziało o niej niewiele osób, nie mówiąc nawet o trafnym zdiagnozowaniu. Najlepszym tego dowodem jest fakt, że – mimo że matka Guthrie także zmarła na płasawicę – początkowo rozpoznano ją (chorobę, a nie matkę) jako alkoholizm, a następnie – schizofrenię. Dzisiaj trudno ocenić, czy Guthrie jest bardziej znany z powodu swoich utworów, czy z powodu stowarzyszenia zajmującego się tą chorobą, które po jego śmierci założyła jego żona.

Należy jednak pamiętać o tym, że choroby Huntingtona nie da się zdiagnozować we wczesnym etapie życia inaczej, jak tylko metodami biologii molekularnej, a rok 1967 był dla tej dziedziny jeszcze średniowieczem. Można natomiast rozpoznać chorobę już po pierwszych, drobnych symptomach – są w tym celu przygotowywane specjalne testy. Im bardziej choroba jest zaawansowana, tym bardziej widoczne są objawy: utrata zdolności kognitywnych, zmiany osobowości i demencja, a ponadto utrata koordynacji i płasawica (choć w niektórych przypadkach objawy są całkiem odwrotne – występuje bradykineza i dystonia) [1,2].

Magiczne trzy litery

Na chromosomie 4 człowieka znajduje się gen *htt* kodujący szczególnie białko – huntingtynę. W obrębie tego genu znajduje się arcyważny kodon CAG, kodujący glutaminę [1]. W normalnym, niezmutowanym genie kodon ten powtarza się około 20 razy. Jeśli liczba powtó-

rzeń zawiera się od około 25 do 40 można mówić o nosicielstwie i chociaż niekoniecznie musi się to skończyć zachorowaniem, to najczęściej u potomstwa występuje już pełnoobjawowa płasawica. Jeśli występuje więcej niż 40 powtórzeń CAG, wówczas także można być pewnym zachorowania [3].

Płasawica ma jeszcze dwie szczególne cechy. Po pierwsze, zauważono, że jeśli dziedziczy się ją po ojcu, to wówczas potomstwo ma więcej powtórzeń CAG niż rodziciel, i to tym więcej, im starszy jest ojciec [3]. Zjawisko to nazywa się antycypacją i da się je dość prosto wytłumaczyć. Im więcej jest powtórzeń tego samego kodonu, tym łatwiej myli się polimeraza DNA przy kopiowaniu i bardzo chętnie *dostania* dodatkowe CAG. Zatem im więcej podziałów komórkowych, tym większa szansa na zwielokrotnienie ilości powtórzeń tego kodonu. A ponieważ ojciec produkuje plemniki na bieżąco i na pęczki, więc tym samym nieświadomie zwiększa szanse na wystąpienie choroby u swoich dzieci.

Po drugie, można z bardzo przyzwrotną dokładnością określić na podstawie ilości powtórzeń, w jakim wieku u pacjenta wystąpią pierwsze objawy [4]. I tak – posiadacz 39 powtórzeń CAG może dożyć nawet 66 lat nie nękany przez płasawicę, jednak gdy jest ich zaledwie o 5 więcej, pierwsze objawy występują już w wieku 42 lat. Chory posiadający 50 powtórzeń nie zdąży nawet nacieszyć się życiem – pierwsze objawy wystąpią u niego już w wieku 27 lat.

Interludium I: naukowy kalwinizm

Choroba Huntingtona nie daje chorym komfortu niepewności. W tym względzie jest przewidywalna jak występy Polaków na piłkarskich mistrzostwach świata – jeśli u kogoś zostanie zdiagnozowana, to jest 100% pewności, że ta osoba na nią zachoruje. Co więcej, płasawica zadaje dokładny czas normalnego, zdrowego życia. Jeśli powie:

„CAGCAG”

20 razy, to znaczy – możesz jeszcze żyć. Ale jeśli zrobi to 5 razy więcej, to skazuje świadomego tego faktu człowieka na pewną i nieprzyjemną śmierć. To właśnie jest naukowy kalwinizm – przeznaczenie, którego nie da się uniknąć.

Nieznana rola ważnego białka

Huntingtyna – białko niepodobne do większości ludzkich białek – to spora proteina, zbudowana z ponad 3000 aminokwasów, o masie prawie 350 kDa [5]. Jak wiele tak dużych białek, zbudowana jest z powtarzających się domen i motywów, zwłaszcza takich, które posiadają bardzo konkretne funkcje: domeny WW¹ czy też miejsca cięcia kaspaz [6]. Proteina ta ulega ekspresji w cytoplazmie, w większości komórek ludzkiego ciała, w mózgu natomiast przede wszystkim w neuronach [5, 6]. W komórkach htt wiąże się z retikulum, z mikrotubulami oraz organellami takimi, jak mitochondria i pęcherzyki synaptyczne [6].

Huntingtyna wiąże się też do wielu białek, takich jak Hap-1 czy α -adaptyny, a także do białka PSD95, które jest postsynaptycznym białkiem błonowym zaangażowanym w kotwiczenie białek receptorowych (np. receptora NMDA) [6].

Prowadząc badania na myszach wykazano, że huntingtyna jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju. Myszy z wyłączonym genem *htt* były w stanie przeżyć tylko kilka pierwszych dni embriogenezy. U myszy z warunkowo² wyłączonym genem występowały objawy choroby neurodegeneracyjnej [7]. Wykazano też, że huntingtyna chroni komórki przed indukowaną przez mutacje apoptozą [8].

Pewnym zaskoczeniem może być fakt, że rola tego wszechobecnego w komórkach białka nie jest jeszcze znana. Na pewno wiadomo jedynie, że jeśli powstaje w formie patologicznej – może bardzo zaszkodzić.

Proteina z ogonem

Jak już wspomniano, kodon CAG, którego powtórzenia leżą u molekularnej podstawy choroby Huntingtona, koduje glutaminę. Zwiększona ilość glutamin powoduje wydłużanie N-końca huntingtyny, gdzie znajduje się region bogaty w glutaminę. Pojawienie się tego ogona poliQ powoduje, że białko nie może zostać prawidłowo sfaldowane [9].

¹ Domeny WW, to domeny tryptofan-tryptofan zaangażowane w wiązanie bogatych w prolinę motywów białkowych.

² Czyli genem wyłączonym tylko u osobników dojrzalych.

Komórkowe MPO

Pośród wielu funkcji systemu ubikwityno-proteosomowego najistotniejszą dla przetrwania każdego organizmu eukariotycznego jest usuwanie patologicznych lub źle sfaldowanych białek i ochrona komórki przed ich gromadzeniem w postaci nierozpuszczalnych agregatów. Poza tym, uszkodzenie tego systemu może powodować spadek efektywności usuwania kluczowych białek regulacyjnych pewnych szlaków metabolicznych oraz innych źle sfaldowanych białek, których nadmiar może prowadzić do stresu, rozregulowania homeostazy komórkowej oraz w ostateczności – do zaprogramowanej śmierci komórki, czyli apoptozy [10].

W związku z powyższym pojawiła się hipoteza mówiąca, że to właśnie uszkodzenie działania tego systemu jest główną przyczyną choroby Huntingtona.

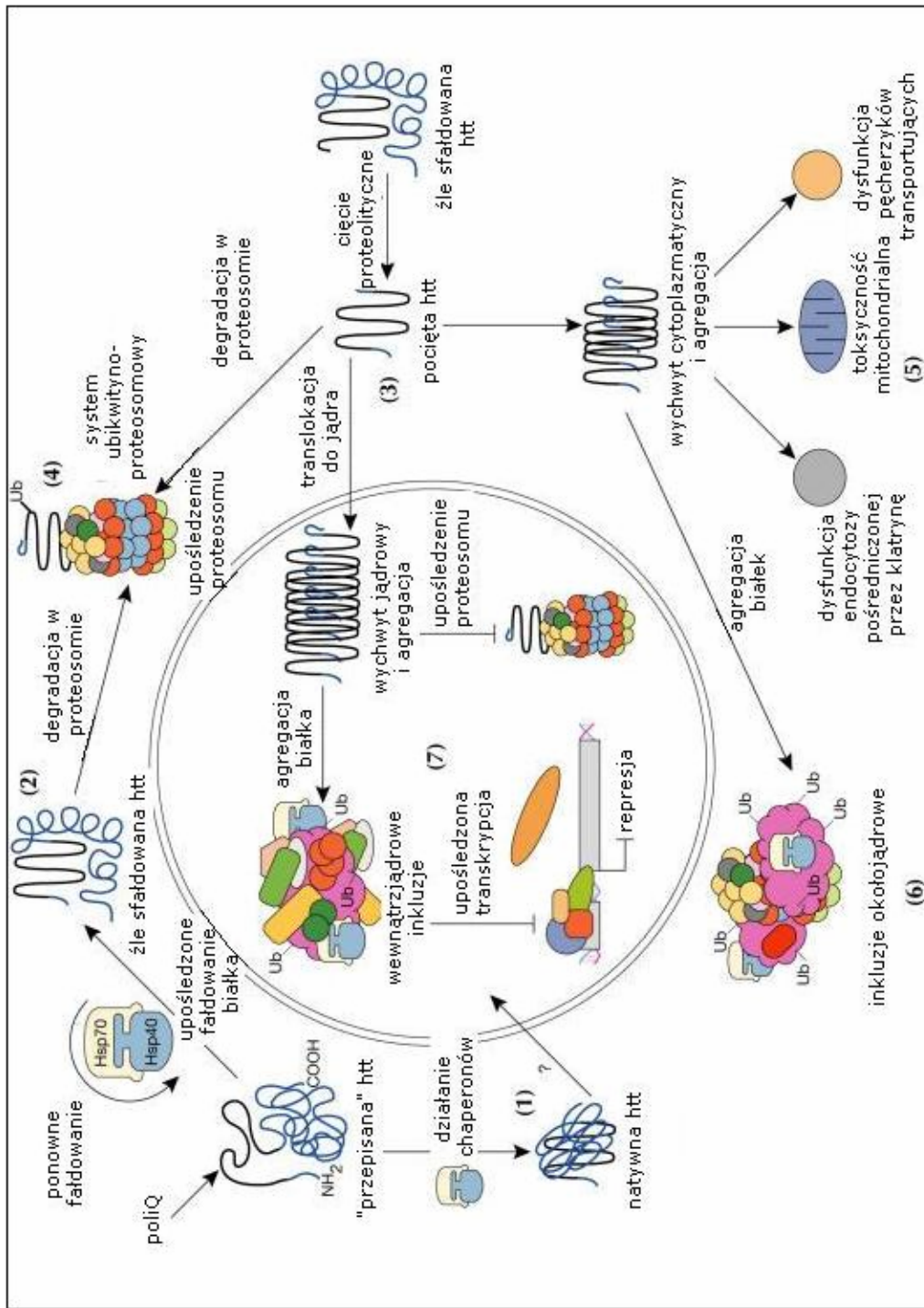
System ubikwityno-proteosomowy działa w ten sposób, że znakuje białka przeznaczone do usunięcia z komórki za pomocą ubikwityny. Białka posiadające taki poliubikwitynowy łańcuch trafiają do proteosomu, gdzie są trawione. Szkodliwe działanie zmutowanej huntingtyny sprowadza się prawdopodobnie przede wszystkim do wysycenia tego układu – albo poprzez dostarczenie nadmiaru substratów lub też przez bezpośrednie hamowanie działania proteosomu. Zmutowana huntingtyna, zamiast zostać zdegradowana, gromadzi się wewnątrz komórki tworząc nierozpuszczalne agregaty [2](Rys.1.).

Huntingtynowa pułapka

Należy zaznaczyć, że zmutowana huntingtyna nie tylko wysyci system ubikwityno-proteosomowy, ale też uszkadza go bezpośrednio poprzez wiązanie ubikwityny wewnątrz agregatów. Poza ubikwityną w tej agregatowej pułapce wiązane są też takie białka jak dynamina i endofilina zaangażowane w neuroprzekąźnictwie, α -synukleina – ważne białko synaptyczne, które ma swój niechlubny udział w chorobie Parkinsona, a także białka szoku cieplnego (Hsp) [2, 9].

Dwa słowa o patofizjologii

To, co na poziomie genów jest zwielokrotnieniem kodonu CAG, na poziomie molekularnym wydłużeniem ogonu poliQ, zaś na poziomie komórkowym – powstawaniem białkowych agregatów, to na poziomie tkanki – w szczególności zaś tkanki nerwowej – objawia się degene-



Fys.1 Komórkowy model patogeny choroby Huntingtona. Chaperony Hsp70 i Hsp40 pomagają faldowanie nowo syntetyzowanej huntingtyny do jej formy natywnej. Długa htt występuje głównie w cytoplazmie i jest zaangażowana w transportie pęcherzyków, korczeniu cytoskieletu, pośredniczonej przez klatrynę endocytozie i sygnalizacji postsygnalizacyjnej(1). Chaperony mogą układać rozpoznawane nienormalnych białek i wspomagać ich ponowne sfaldowanie albo ubikwitynację, a następnie degradację w proteosomie 26S. Mutacja w genie htt powoduje źle faldowanie białka, które - jeśli nie zostanie wychwycone przez chaperony - akumuluje się w cytoplazmie(2). Zmutowana htt może też być translokowana proteolitycznie, dając w rezultacie N-końcowe fragmenty formujące beta-hairpin(3). W końcu, toksyczność może być spowodowana zarówno zmutowaną htt, jak i N-końcowymi fragmentami, które tworzą rozpuszczalne monomery, oligomery lub duże nierozpuszczalne agregaty. W cytoplazmie zmutowane formy htt upośledzają system ubikwityno-proteosomowy, prowadząc w ten sposób do coraz większej kumulacji źle sfaldowanych białek(4). Te toksyczne białka mogą też upośledzać transport pęcherzyków i endocytozę. Ponadto, obecność zmutowanych białek może poprzez uszkodzenie bezpośrodkowo lub pośrednio białka proapoptyczne(5). W celu ochrony samej siebie, komórka gromadzi toksyczne fragmenty w formie ubikwitynowanych okołojądrowych agregatów(6). W dodatku zmutowana htt może być translokowana do jądra, gdzie tworzy inkluzyje wewnątrzjądrowe, które mogą hamować transkrypcję systemu ubikwityno-proteosomowego. Za: Lantles, Bates, EMBO Rep., 2004; 5(10): 958-63

racją ciała prądkowanego. Występuje ponadto utrata neuronów oraz astrocytoza. Obumieranie tej tkanki prowadzi do wspomnianych we wstępie objawów chorobowych [2].

Interludium II: zostać rainmakerem, czyli krótka dygresja o wielkim biznesie

Zastanawiającym fenomenem rynku farmaceutycznego jest fakt, że do tej pory nikt nie wymyślił w pełni skutecznego lekarstwa na przypadłość, na którą cierpiał kiedyś każdy człowiek na tej planecie. Nikt mianowicie nie wymyślił do

tej pory uniwersalnego środka na katar. Osoba, która tego dokona (i jednocześnie nie da sobie ukraść swojego pomysłu), stanie się w krótkim czasie miliardern większym od Billa Gatesa i George'a Sorosa razem wziętych. Póki co jednak – na szczęście dla wszystkich chorych na tak egzotyczne (kiedyś i dzisiaj) choroby, jak AIDS, SARS, choroba Creutzfelda-Jakoba, a także Huntingtona – ludzkość dużo większą uwagę przywiązuje do szukania leków na schorzenia może nie tak powszechne jak katar, za to znacznie bardziej uciążliwe.

Jak leczyć nieuleczalne...

Jak zauważono w *Interludium I*, choroba Huntingtona nie daje chorym komfortu niepewności. Do tej pory nie mieli oni szans usłyszeć słów: „ma pan 50% szans na wyzdrowienie” lub „daję panu co najmniej 10 lat życia, ale są już bardzo obiecujące nowe leki”. Jedyne, co lekarze mogli do tej pory zaoferować chorym na Huntingtona, to leki antydepresyjne, sedatywne czy uspokajające, aby załagodzić objawy emocjonalne, czy też terapie mowy, aby ułatwić mówienie i polykanie. To się jednak zaczyna powoli zmieniać.

Wyciszanie genów

Spośród przyszłościowych, potencjalnych terapii jedną z niewątpliwie najbardziej obiecujących jest technika tzw. wyciszania genów. Odkrycie zjawiska interferencji RNA pozwoliło na prowadzenie badań nad wyciszaniem genów w komórkach za pomocą tzw. małego interferującego RNA (siRNA). Wyłączenie genu w tej metodzie jest skutkiem wprowadzenia do komórki dwuniciowego RNA homologicznego do tego genu.

Do tej pory prowadzono już badania na gryzoniach, w których uzyskano wyłączenie zmutowanego genu w ponad połowie przypadków [11].

W chwili obecnej metoda wyciszania genów nie jest jednak jeszcze osiągalna dla leczenia ludzi. Potrzebne są dalsze badania nad ulepszeniem metod wprowadzania obcego RNA do organizmu, lepszą identyfikacją właściwego miejsca w targetowym RNA, minimalizacją działań ubocznych (np. oddziaływań z RNA nietargetowym), a także zwiększeniem stabilności i wydajności transportu siRNA [12].

Półśrodki I - restrykcja kalorii

Ponieważ jedną z dróg działania restrykcji kalorii jest hamowanie apoptozy komórki [13], podczas gdy zmutowana huntingtyna może apoptozę indukować, wydaje się logicznym, że restrykcja kalorii może w pewnym stopniu hamować chorobę Huntingtona. Rzeczywiście, przeprowadzono badania, które potwierdzają tę tezę [14]. Jednak w tym przypadku można tylko mówić o spowolnieniu procesu, a nie o całkowitym wyleczeniu, co wynika zapewne z tego, że zmutowana huntingtyna uszkadza komórki na wiele sposobów.

Półśrodki II - Omega-III

Przeprowadzono badania, które wykazały, że spożywanie wysokonienasyconych kwasów tłuszczowych może pomagać w leczeniu płasawicy Huntingtona [15] – spowalniając ją, a być może także cofając objawy choroby. W tym celu wykorzystuje się kwas omega-III, czyli kwas eikozapentaenowy. W chwili obecnej jest on testowany w formie leku o nazwie Miraxion© (LAX-101). Prawdopodobnie działa on poprzez hamowanie szkodliwych fosfolipaz oraz stabilizowanie fosfolipidów błon komórkowych i mitochondrialnych. Ma też działanie przeciwzapalne.

Półśrodki III - inne leki

W obecnej chwili bada się ogromną liczbę substancji, które być może pozwolą na złagodzenie przebiegu choroby, a być może na jej zahamowanie. Zalicza się do nich np. Tetrabenzazine – bloker receptorów dopaminowych stosowany do łagodzenia objawów płasawicy [16], kreatyna, która podawana jako suplement diety spowalnia neurodegenerację [17], podobnie jak koenzym Q10 oraz nikotynamid [18]. Badano też antybiotyk należący do grupy tetracyklin – minocyklinę, która wykazuje właściwości neuroregeneracyjne i neuroprotektoryjne w modelach wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym w chorobie Huntingtona. Rozważane są opcje połączenia leczenia minocykliną z terapią komórkową lub molekularną [19].

Bieżąca prasówka

Zaledwie miesiąc temu grupa badaczy z University of British Columbia w Kanadzie doniosła, że byli w stanie wyleczyć mysz laboratoryjną z choroby Huntingtona po tym, jak doszli do wniosku, że chorobę wywołuje kaspaza-6.

Jak wspomniano na początku huntingtyna posiada miejsca cięcia kaspaz. Ulega w nich proteolitycznemu cięciu, a występowanie powstałych po takim trawieniu fragmentów jest ściśle związane z pojawieniem się wczesnych zmian patologicznych w mózgu. Badacze z Kanady nie dostrzegają jednak związku pomiędzy tą proteolizą a patogenezą choroby Huntingtona. Hipotetyczny związek przedstawiono już jednak na Rys.1.

Chcąc określić, jak ważne w przebiegu płasawicy jest cięcie huntingtyny kaspazami, badacze skonstruowali (i wprowadzili do myszy za pomocą sztucznych chromosomów drożdżowych)

huntingtyną odporną na kaspazę-6 oraz kaspazę-3. Okazało się, że myszy, u których ekspresji ulegała huntingtyna odporna na kaspazę-6 (ale nie na kaspazę-3) nie następowała neurodegeneracja. Co więcej – myszy te odporne były także na inne neurotoksyny takie jak NMDA, kwas chinolinowy i staurosporyna [20].

Cudowna synteza – oszukać przeznaczenie

Jeśli teraz połączyć to, co powiedziano o terapii genowej (tu – o wyciszaniu genów), z tym, co donoszą badacze z Kanady, okazuje się, że lekarstwo na chorobę Huntingtona może być już w zasięgu ręki.

Być może nie za kilka, ale już za kilkanaście lat nie tylko będzie można zdiagnozować płasawicę jeszcze przed narodzeniem dziecka, ale i wyleczyć je z niej. Wówczas zamiast – wątpliwego w takiej sytuacji – komfortu niepewności, będą mieć mali pacjenci komfort o wiele większy – komfort nieświadomości, że ich życie mogła determinować ilość powtórzeń jednego kodonu.

Literatura

- [1] Landles, Bates, *EMBO Rep.*, 2004; 5(10): 958-63
- [2] Smith et al., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 1901-12
- [3] Myers, *NeuroRx*, 2004; 1: 255-62
- [4] Brinkman et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 1997; 60(5): 1202-10
- [5] Davies, Ramsden, *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, 2001; 54:409-13
- [6] Young, *J. Clin. Invest.*, 2003; 111:299-302
- [7] Dragatsis et al., *Nat. Genet.*, 2000; 26: 300-6
- [8] Leavitt et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 2001; 68: 313-24
- [9] Orr, *Genes Dev.*, 2001; 15: 925-32
- [10] Valera et al., *Neuroscientist*, 2005; 11(6): 583-94
- [11] <http://www.sirna.com/wt/page/neurology>
- [12] Dallas, Vlassov, *Med. Sci. Monit.*, 2006; 12(4): RA67-74
- [13] Marszalek, *Miniproj. Chem. UJ*, 2006
- [14] Mattson et al., *NeuroRx.*, 2004; 1(1): 111-6
- [15] Vaddadi, Das, *Nutrition.*, 2004; 20(10): 942-7
- [16] Ondo et al., *Clin. Neuropharmacol.*, 2002; 25(6): 300-2
- [17] Bender et al., *J. Neurol.*, 2005;252(1) :36-41
- [18] Beal, *Curr. Opin. Neurol.*, 1994; 7(6) :542-7
- [19] Blum et al., *Neurobiol. Dis.*, 2004; 17(3) :359-66
- [20] Hayden et al., *Cell*, 2006; 125(6): 1179-91