

**„Opracowanie modeli *in vitro*, analiza wpływu genisteiny
oraz ocena udziału lizosomu w łuszczycy”
mgr Katarzyna Zima**

Łuszczycyca (łac. *Psoriasis*; Ps) jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną, cechującą się nieprawidłowym procesem keratynizacji, co prowadzi do powstawania charakterystycznych zmian skórnych. Częstość występowania łuszczycy szacuje się na około 0,5-8,5% światowej populacji, z tendencją wzrostową. Opisano kilka typów klinicznych łuszczycy, o różnych cechach histologicznych, wśród nich: łuszczycę plackowatą która reprezentuje najczęstszy typ choroby (stanowiąca około 90% przypadków), kropelkową, odwróconą, krostkową i erytrodermię łuszczycową. W trakcie postępu choroby, nawet u tych samych pacjentów, można zauważyć różnorodne fenotypy kliniczne. Objawy zależą od rodzaju oraz nasilenia postaci łuszczycy i mogą obejmować zaczerwienienie skóry, swędzenie, pieczenie, a także pęknięcia i krwawienia z łusek, prowadzące nawet do inwalidztwa wskutek zmian stawowo-ścięgienistych. Ogólnoustrojowy stan zapalny pacjentów związany jest również z rozwojem chorób współistniejących, takich jak łuszczycowe zapalenie stawów, które występuje u około 20-30% pacjentów, zespół metaboliczny, choroby układu krążenia, cukrzyca, nowotwory i depresja. Łuszczycyca występuje w równym stopniu u mężczyzn i kobiet, a średni wiek zachorowania wynosi 33 lata. Choroba może ujawnić się z bimodalnym początkiem, związanym z dwoma podtypami na podstawie cech genetycznych: wczesnym początkiem, przed 40 rokiem życia (75% przypadków) i późnym początkiem, po 40 roku życia. Patogeneza łuszczycy jest złożona i opiera się na interakcjach między czynnikami genetycznymi, immunologicznymi i środowiskowymi. W ramach badań asocjacyjnych całego genomu (ang. *Genome-Wide Association Studies* – GWAS), zidentyfikowano ponad 60 loci odpowiedzialnych za zwiększoną podatność na rozwój łuszczycy. Potencjalne geny, korelowane z patogenezą łuszczycy, obejmują czynniki zaangażowane w prezentację antygenów (*HLA-C* i *ERAP1*), sygnalizację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B – NF-κB (*TNIP1*), szlak interferonów typu 1 (*RNF113* i *IFIH1*), oś interleukiny (IL)-23/limfocytów T pomocniczych (Th) 17 (*IL23R*, *IL12B* i *TYK2*) oraz funkcję bariery skórnej (*LCE3*). Sugeruje to istnienie kompleksowej interakcji między komórkami układu odporności (zarówno wrodzonej, jak i nabytej), takimi jak komórki dendrytyczne i limfocyty T, a także keratynocytami. Rola tych komórek ulega zmianom w różnych fazach choroby. Ważnym czynnikiem aktywującym odpowiedź immunologiczną jest oś IL-23/Th17, która prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego, nadmiernego namnażania komórek naskórka i uszkodzenia bariery skórnej. Otyłość, stres, uraz fizyczny, infekcje i niektóre leki, w tym niesteroidowe leki przeciwzapalne, beta-blokery i sole litu to najczęstsze środowiskowe czynniki wywołujące i/albo zaostrzające przebieg łuszczycy.

W ciągu ostatnich dwóch dekad osiągnięto ogromny postęp w zrozumieniu patogenezы łuszczycy, który następnie z powodzeniem przełożył się na wysoce skuteczne terapie w leczeniu tej dermatozy, czego najlepszym przykładem jest rozwój ukierunkowanych leków biologicznych skierowanych przeciw IL-17, IL-23, czy czynnikowi martwicy nowotworów α (TNF- α). Jednak skutki

uboczne, utrata skuteczności i nawroty zmian skórnych po zaprzestaniu leczenia, zachęcają badaczy do odkrywania nowych strategii terapeutycznych. Aktualne badania sugerują, że komórki naskórka – keratynocyty, mogą stanowić kluczowy czynnik etiologiczny w rozwoju łuszczycy, co podkreśla ich znaczenie jako istotnego elementu w leczeniu choroby.

Lizosomy to organella komórkowe, które pełnią ważną rolę w regulacji homeostazy komórkowej poprzez degradację białek, lipidów i innych makrocząsteczek w procesie autolizy. Ostatnie badania sugerują, że lizosomy, podobnie jak wiele innych organelli komórkowych, są poddawane globalnej regulacji transkrypcji i potrafią dostosować się do sygnałów pochodzących z otoczenia. Odkrycia te sugerują, że lizosomy nie tylko pełnią funkcję degradacyjną, ale także działają jako centrum sygnalizacyjne, regulujące homeostazę komórkową poprzez komunikację z innymi organellami i strukturami komórkowymi. Nieprawidłowe działanie lizosomów w naskórku może przyczynić się do patogenezy łuszczycy poprzez wpływ na procesy proliferacji i różnicowania keratynocytów oraz aktywację reakcji zapalnej.

Głównym celem niniejszej pracy badawczej było scharakteryzowanie procesów związanych z działaniem lizosomów w naskórku oraz w skórze o fenotypie normalnym i łuszczycowym, a także identyfikacja potencjalnych zastosowań uzyskanej wiedzy w opracowaniu innowacyjnych strategii terapeutycznych, które mogą służyć jako podstawa do rozwoju bardziej efektywnych metod terapii chorób skórnych.

Pierwszym etapem prac, było opracowanie dwuwymiarowego (2D) modelu keratynocytów *in vitro*, mającego na celu precyzyjne odzwierciedlenie fenotypu komórek łuszczycowych. W tym celu oceniono, odpowiednio: monokulturę linii komórkowej HaCaT (ang. *Human Adult low Calcium Temperature keratinocytes*) i monokulturę keratynocytów pierwotnych (ang. *primary Keratinocytes*, pKC), stymulowanych mieszaniną cytokin (5MIX, tj. IL-1 α , IL-17A, IL -22, onkostatyną M (OSM) i TNF- α), w obecności niskiego albo wysokiego stężenia jonów wapnia (tj. odpowiednio, Ca²⁺ \leq 0,1 mM albo 2 mM); monokulturę HaCaT lub pKC stymulowanych imikwimodem (IMQ); monokulturę linii komórkowej HaCaT stymulowanej surowicą (w stężeniach 1, 5 albo 10%) izolowaną od pacjentów z łuszczycą lub osób zdrowych jako kontroli; oraz współhodowlę HaCaT z ludzką linią komórek monocytarnych ostrej białaczki (THP-1), traktowanych 12-mirystynianem 13-octanu forbolu (PMA), lipopolisacharydem (LPS) i interferonem γ (IFN- γ). Indukcję fenotypu Ps określano analizując ekspresję ściśle wyselekcjonowanych genów markerowych choroby, w postaci 10 markerów proliferacji i różnicowania keratynocytów (tj. geny *IVL*, *FLG*, *KRT1*, *KRT5*, *KRT6*, *KRT10*, *KRT14*, *KRT16*, *LOR* i *MKI67*), 4 peptydów przeciwdrobnoustrojowych (tj. geny *DEFB4*, *PI3*, *S100A7* i *S100A9*) oraz 4 chemokin (tj. geny *CCL20*, *CXCL1*, *CXCL2* i *CXCL8*), metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*; *real time qRT-PCR*). W celu oceny adekwatności modeli *in vitro* do badania molekularnych mechanizmów łuszczycy, ekspresję wybranych genów markerowych porównano ze zbiorami bazy danych Gene Expression Omnibus (GEO) pozyskanymi z 6 profili dla hodowli komórkowej łuszczycowych keratynocytów *in*

in vitro i 7 profili danych dla biopłatów skórnych pobranych od pacjentów dotkniętych łuszczycą. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że hodowle *in vitro* 2D pKC z dodatkiem 5MIX (niezależnie od stężenia jonów wapnia), względem komórek nieaktywowanych zapalnie, hodowanych w obecności 2 mM jonów wapnia (warunki odpowiadające środowisku normalnych, zróżnicowanych keratynocytów), wykazały synergię profilu ekspresji większości testowanych genów z profilami genów keratynocytów łuszczycowych dostępnymi w bazie danych GEO (średnio 84% analizowanych transkryptów, tj. 78 i 89% dla, odpowiednio pKC hodowanych w obecności 5MIX i niskiego poziomu jonów wapnia, oraz pKC hodowanych w obecności 5MIX i wysokiego poziomu jonów wapnia). Ponadto, wykazano, że wzór ekspresji wybranych genów markerowych w profilach GEO pacjentów, tj. w odniesieniu do 7 zestawów danych dla biopsji skóry (GDS2518, GDS3539, GDS4600, GDS4602, GDS4606, GDS5392 i GDS5420), był zgodny z danymi literaturowymi i uzyskanymi wynikami ekspresji genów charakterystycznych dla fenotypu Ps.

Przy zastosowaniu opracowanego modelu *in vitro* 2D keratynocytów, w kolejnych etapach badawczych scharakteryzowano status i rolę lizosomu w HaCaT i pKC o fenotypie łuszczycowym. W celu analizy ilości i lokalizacji kwaśnych organelli w komórce wykorzystano barwniki, takie jak oranż akrydyny i LysoTracker Red DND-99, oraz marker lizosomów – białko LAMP1 (ang. *Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein 1*). Za pomocą techniki mikroskopii immunofluorescencyjnej (IF) wykazano, że w komórkach o fenotypie łuszczycowym wzrasta liczba struktur pozytywnych dla LAMP1, przy jednoczesnym zmniejszeniu puli całkowitej ilości kwaśnych organelli, co potwierdza analiza statystyczna średniej intensywności fluorescencji w porównaniu z warunkami kontrolnymi. W procesach wewnątrzkomórkowych, takich jak endocytoza i autofagia, kolokalizacja markerów wczesnych endosomów EEA1 (ang. *Early Endosome Antigen 1*), lizosomów LAMP1 i autofagosomów LC3B (ang. *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*) jest kluczowym wskaźnikiem, który pozwala na analizę interakcji między poszczególnymi organellami i monitorowanie ww. procesów. W modelu *in vitro* 2D linii HaCaT, jak i pKC, ilość markera autofagii, LC3B, była najniższa w komórkach o fenotypie łuszczycowym. Dodatkowo, w komórkach stymulowanych cytokinami, współczynnik korelacji Pearsona wskazywał na niższą kolokalizację między markerami LAMP1 i LC3B w porównaniu do komórek kontrolnych, co sugeruje potencjalną blokadę tworzenia autofagolizosomu. W efekcie, pomimo zwiększonej ilości LAMP1 w keratynocytach łuszczycowych, proces autofagii może zachodzić nieprawidłowo. Następnie, w modelu *in vitro* 2D pKC oceniano za pomocą IF translokację jądrową czynnika transkrypcyjnego EB (ang. *Transcription Factor EB, TFEB*). Czynniki TFEB stymuluje ekspresję genów kodujących białka lizosomalne, co prowadzi do wzrostu liczby lizosomów w komórce i zwiększenia aktywności degradacyjnej wewnątrzkomórkowej. Uzyskane wyniki wykazały, że w komórkach aktywowanych cytokinami, bez względu na poziom jonów wapnia w pożywce, obserwowano podobnie wysoki procent dojądrowej translokacji TFEB w porównaniu do komórek nieaktywowanych, poprzez obliczenie stosunku intensywności fluorescencji jądra komórkowego do cytoplazmy.

Czynnik TFEB i kinaza mTOR (ang. *Mammalian Target Of Rapamycin Kinase*) są istotnymi czynnikami regulującymi metabolizm komórkowy, w tym autofagię, endocytozę i degradację lizosomalną. Białko mTOR pełni kluczową rolę w kontrolowaniu proliferacji, różnicowania oraz homeostazy keratynocytów, a także w modulacji odpowiedzi immunologicznej. Ponadto, istnieją badania wskazujące, że aktywność kompleksu 1 kinazy mTOR (mTORC1) jest zwiększona w łuszczycy, co wskazuje na jej potencjalną rolę w procesie patogenezy choroby. Co więcej, mTORC1 blokuje aktywność TFEB, co prowadzi do zahamowania autofagii i degradacji lizosomalnej. Natomiast kalcyneuryna, działając jako antagonistyczny czynnik, może przeciwdziałać tym efektom poprzez defosforylację i odłączenie TFEB z kompleksu z białkiem 14-3-3, umożliwiając aktywację i translokację TFEB do jądra komórkowego. Kalcyneuryna, jest fosfatazą serynowo-treoninową, której aktywność zależna jest od jonów wapnia. Wzrost stężenia wapnia powoduje wiązanie kalmoduliny z kalcyneuryną, co prowadzi do jej aktywacji i regulacji wielu procesów komórkowych. W przeciwnym razie, przy niskim stężeniu wapnia, kalcyneuryna pozostaje nieaktywna. W naskórku łuszczycowym stwierdza się zmniejszenie gradientu stężeń jonów wapnia, co wpływa na zaburzenie procesu keratynizacji, a tym samym prawidłowego dojrzewania keratynocytów. Analiza ekspresji 93 genów związanych z lizosomem w modelu *in vitro* 2D pKC wykazała, że cytokiny prozapalne były czynnikami, które miały najsilniejszy wpływ na liczbę regulowanych genów. Wyniki badań wykazały, że dodanie 5MIX obniżało ekspresję genów *PPP3CA* i *PPP3CB* kodujących podjednostki kalcyneuryny (odpowiednio dla 50 i 100% hodowli *in vitro* keratynocytów pozyskanych od 4 niezależnych dawców), przy jednoczesnym podwyższeniu ekspresji *MTOR* w 75% tych hodowli w porównaniu do komórek nieaktywowanych, hodowanych w obecności 2 mM Ca^{2+} . Dla zrozumienia roli szlaków komórkowych związanych z biogenezą lizosomu w patogenezie łuszczycy, zastosowano technikę interferencji RNA (RNAi) w celu wyciszenia ekspresji genów kodujących: czynnik TFEB (*TFEB*) oraz jego inhibitor – kompleks mTORC1 (*MTOR*), jak i jego aktywator – kalcyneurynę (*PPP3CA*), w linii HaCaT i pKC. Następnie, przeprowadzono charakterystykę tych komórek pod kątem fenotypu łuszczycowego poprzez analizę ekspresji 23 wybranych genów markerowych. Uzyskane wyniki wskazują, że wyciszenie genu *MTOR* prowadzi do normalizacji ekspresji wybranych markerów charakterystycznych dla fenotypu łuszczycowego. Natomiast wyciszenie antagonisty mTOR, *PPP3CA*, nasila fenotyp łuszczycowy komórek HaCaT i pKC, co wskazuje na jego istotną rolę w potencjalnej modulacji sygnalizacji zachodzącej w komórkach naskórka.

Kolejny etap badań rozszerzono o model *in vitro* 3D tkanki skórnej z uwzględnieniem warstwy fibroblastów (prawidłowych, NN – ang. *Non-psoriatic Normal*) lub zmienionych łuszczycowo, PP – ang. *Psoriatic Plaque*) oraz warstwy keratynocytów (prawidłowych, NN – ang. *Non-psoriatic Normal*). Geny *LAMP1* i *TFEB* były nadeksprimowane w tkankach PP, co potwierdza wyniki uzyskane z IF z *in vitro* 2D hodowli keratynocytów. Dalsze badania obejmowały analizę ekspresji genów po zastosowaniu wybranych modulatorów układu lizosomalnego: chlorochiny (CQ), rapamycyny (RAP) i wortmaniny (WORT), odpowiednio w tkankach 3D NN, jak i tkankach 3D PP.

Zastosowanie CQ skutkowało podwyższeniem poziomu genów markerowych łuszczycy (*DEFB4*, *KI67* i *PI3*) w tkance 3D PP. Dodatkowo, w przypadku tkanki 3D PP zaobserwowano zmniejszoną ekspresję genu *LAMP1* oraz zwiększoną ekspresję *TFEB*, niezależnie od rodzaju zastosowanego modulatora w odniesieniu do tkanki PP niestymulowanej modulatorami.

W kolejnych krokach scharakteryzowano status i rolę lizosomu w bioptatach skórnych pobranych od pacjentów z łuszczycą (z miejsc zmienionych chorobowo: PP – ang. *Psoriatic Plaque* i niezmiennych PN – ang. *Psoriatic Normal*) oraz osób zdrowych jako kontroli (NN – ang. *Non-psoriatic Normal*). Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wynikami wskaźników PASI (ang. *Psoriasis Area and Severity Index*), BSA (ang. *Body Surface Area*) i DLQI (ang. *Dermatology Life Quality Index*) a ilością białka LAMP1. W ramach badań transkryptomycznych, zanalizowano ekspresję 93 genów związanych z lizosomem w tkankach PP, PN i NN. Analiza statystyczna wykazała, że 23 z 93 deregulowanych genów wykazywały znaczące zmiany między zmiennymi ciągłymi PP > PN > NN. W przeprowadzonych analizach wykazano istotne statystycznie różnice w aktywności genów, których funkcje są związane z kodowaniem: enzymów lizosomalnych (*ASP5*, *CTSS*, *GBA*, *GLA*, *GLB1*, *GM2A*, *HPSE*, *IFI30*, *NEU1* i *PPT2*), czynników biogenezy lizosomów (*BLOC1S2* i *TFEC*), markerów kwaśnych organelli (*EEA1*, *LAMP3*, *MAP1LC3B*, *RAB5A*, *RAB7A* i *RAB34*) oraz kanałów kationowych (*MCOLN2* i *MCOLN3*). Ponadto stwierdzono, że wzorzec regulacji genów był porównywalny w tkance PP i PN pobranej od pacjentów w porównaniu do NN, co może wskazywać na to, że zmiany te występują przed pojawieniem się charakterystycznego fenotypu choroby. W toku tych badań odnotowano ponadto wzrost ekspresji *PPP3CA*, i towarzyszącą mu obniżoną ekspresję *PPP3CB* w tkankach pobranych z miejsc PP, co może wynikać z obecności komórek immunologicznych w bioptatach skórnych. W komórkach immunologicznych, kalcyneuryna jest kluczowym enzymem aktywującym czynniki transkrypcyjne z rodziny NFAT (ang. *Nuclear Factor Of Activated T Cells*), regulujących ekspresję genów związanych z odpowiedzią zapalną. Inhibitory kalcyneuryny, takie jak takrolimus (FK506) lub cyklosporyna, są stosowane w leczeniu wielu chorób autoimmunologicznych, w tym łuszczycy, ze względu na swoje zdolności do hamowania aktywacji komórek T, poprzez blokadę szlaku NFAT. Badania wykazały, że stosowanie inhibitorów kalcyneuryny prowadzi do redukcji liczby komórek T w skórze oraz zmniejszenia aktywności cytokin prozapalnych, takich jak IL-17 i IFN- γ . Warto zwrócić uwagę, że terapia inhibitorami kalcyneuryny w leczeniu łuszczycy nie zawsze jest skuteczna i w części przypadków prowadzi do wystąpienia niepożądanych efektów ubocznych. Może to wynikać z faktu, że kalcyneuryna jest również niezbędna do aktywacji czynnika transkrypcyjnego TFEB w większości typów komórek, który jak wspomniano wyżej, odpowiada za ekspresję genów zaangażowanych w autofagię, proces konieczny do utworzenia właściwej bariery skórnej. W ramach niniejszej pracy w badaniach z użyciem z kolei hodowli *in vitro* 2D, wykazano, że traktowanie komórek HaCaT i pKC o fenotypie łuszczycowym takrolimusem, obniża poziom ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne rodziny MiT (głównie *TFE3*, *TFEB* i *TFEC*) co może wskazywać na hamowanie biogenezy lizosomów. Ponadto, obserwowano

silne hamowanie aktywności genów związanych z procesem autofagii (*ATG7*, *MAP1LC3A* i *LAMP1*) w komórkach HaCaT po stymulacji takrolimusem.

W naskórku łuszczykowym, poza upośledzonym mechanizmem autofagii, dochodzi do zmian ilościowych ceramidów (CER) i sfingolipidów (SL), których metabolizm częściowo regulowany jest w lizosomach. Sfingolipidy pełnią istotną funkcję w utrzymaniu integralności bariery skórnej poprzez regulację proliferacji, różnicowania i apoptozy keratynocytów, syntezę i utrzymanie lipidowej macierzy międzykomórkowej, kontrolę stanu zapalnego oraz odporność na czynniki zewnętrzne. W celu charakterystyki szlaków metabolizmu sfingolipidów i ceramidów w keratynocytach, przeprowadzono analizę poziomów enzymów lizosomalnych, takich jak kwaśna ceramidaza (ASAH1), kwaśna sfingomielinaza (ASM/SMPD1), beta-glukocerebrozydaza (GBA) oraz kinaza sfingozyny 1 (SPHK1), metodą ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) przy zastosowaniu opracowanego uprzednio modelu *in vitro* 2D linii HaCaT i pKC. Redukcja poziomu ASM w keratynocytach o fenotypie łuszczykowym (zarówno HaCaT, jak i pKC), wskazuje, że proces przekształcania sfingomieliny w ceramid może być w tych warunkach niewydajny. Niedobory ceramidów w naskórku zmienionym chorobowo mogą zatem wynikać z upośledzonej syntezy CER w tzw. szlaku odzysku w lizosomach. Podobna tendencja widoczna była dla ASAH1 w przypadku linii HaCaT, co może wpływać na zaburzenie procesu przekształcania ceramidu w sfingomielinę. GBA hydrolizuje glukozylceramidy do ceramidów. W przypadku pKC poziom GBA wzrastał po aktywacji cytokinami prozapalnymi, niezależnie od poziomu jonów wapnia w środowisku. Zgodnie z danymi literaturowymi, zmiany w transepidermalnej utracie wody w naskórku łuszczykowym mogą działać jako bodziec dla enzymu GBA, co umożliwia syntezę ceramidów. SPHK1 jest enzymem kluczowym w przemianie sfingozyny w sfingozyno-1-fosforan (S1P), który jest bioaktywnym lipidem pełniącym funkcje regulatorowe w wielu procesach biologicznych, w tym w reakcjach zapalnych. Wzrost ilości SPHK1 w pKC o fenotypie łuszczykowym może skutkować intensyfikacją przemiany sfingozyny w S1P, co w konsekwencji prowadzi do nasilenia procesów zapalnych w skórze. W komórkach HaCaT poziom enzymu SPHK1 regulowany był podobnie jak GBA, choć te różnice były mniej istotne statystycznie.

W celu dokładnej charakterystyki szlaków molekularnych w łuszczykowym modelu *in vitro* 2D keratynocytów linii HaCaT i pKC, przeprowadzono analizę mutipleksową z użyciem technologii Luminex xMAP®. Badanie obejmowało ocenę poziomu białek zaangażowanych w szlak Akt/mTOR oraz stopnia ich fosforylacji. Mechanizm aktywacji szlaku Akt/mTOR w łuszczycy nie jest w pełni poznany, ale wiele badań sugeruje, że różne bodźce, takie jak czynniki wzrostu, cytokiny, stres oksydacyjny, mogą wpływać na jego aktywację w keratynocytach, co w rezultacie prowadzi do ich przyspieszonej proliferacji i oporności na apoptozę. W przypadku HaCaT statystycznie istotny wzrost poziomu fosforylacji odnotowano w hodowlach o fenotypie łuszczykowym dla białka GSK3 β , co wiąże się ze zmniejszeniem jego aktywności w komórkach o fenotypie łuszczykowym. Dla pKC, zaobserwowano istotnie statystycznie zmniejszenie aktywności białek Akt i IGF1R (poprzez obniżenie

fosforylacji) w hodowlach o fenotypie łuszczycowym. Obniżenie aktywności tych białek może mieć wpływ na procesy regulujące wzrost, różnicowanie i przeżycie komórek. Istotnie statystycznie zmniejszony poziom fosforylacji GSK3 α (zwiększona aktywność), p70S6K (zmniejszona aktywność), PTEN (zwiększona aktywność) i TSC2 (zwiększona aktywność) obserwowano tylko w hodowlach pKC o fenotypie łuszczycowym, co może mieć wpływ na homeostazę komórek oraz ich interakcje z otoczeniem. Zwiększona aktywność GSK3 α może wpływać na wiele aspektów biologicznych, takich jak regulacja metabolizmu, proliferacja komórek, różnicowanie, czy apoptoza, podczas gdy zmniejszona aktywność p70S6K wiąże się z hamowaniem procesów wzrostowych. Zwiększona aktywność PTEN reguluje cykl komórkowy oraz indukuje apoptozę, natomiast zwiększona aktywność TSC2 kontroluje proliferację komórek, wzrost i różnicowanie. Kolejny etap prac stanowiło przeprowadzenie powyższej multupleksowej analizy z użyciem modelu *in vitro* 3D tkanki skórnej, gdzie w pierwszym kroku oceniono stopień fosforylacji białek szlaku Akt/mTOR w tkance PP w porównaniu z kontrolą NN. Zaobserwowano statystycznie istotne zwiększenie aktywności (wzrost fosforylacji) białka IGF1R w PP w porównaniu z NN. Białko IGF1, syntetyzowane głównie w fibroblastach, jest kluczowym czynnikiem stymulującym procesy proliferacji keratynocytów. Z drugiej jednak strony zaobserwowano spadek aktywności (a tym samym fosforylacji) IRS1 (stanowiącego substrat IGF1R) w PP vs. NN. Następnie, zbadano aktywność szlaku Akt/mTOR po zastosowaniu modulatorów autofagii (CQ, RAP lub WORT) w obu tkankach NN i PP. Dla tkanki NN traktowanej CQ, RAP lub WORT w porównaniu z tkanką nietraktowaną NN, wyniki aktywności badanych białek były w większości niezmienione, z wyjątkiem wzrostu poziomów fosforylacji białek IGF1R, IRS1 i PTEN po zastosowaniu CQ. Efekt zastosowania modulatorów wobec tkanki PP w stosunku do nietraktowanej kontroli PP zaobserwowano tylko dla aktywności białka IRS1. Jego aktywność (poziom fosforylacji) była podwyższona dla tkanki PP po dodaniu CQ, RAP lub WORT w porównaniu do nietraktowanej modulatorami PP.

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano wzrost biogenezy i zwiększenie ilości lizosomów zarówno w modelach *in vitro* 2D keratynocytów, tkankach *in vitro* 3D łuszczycowych oraz bioptatach skórnych pobranych od pacjentów *in situ*. Warto zaznaczyć, że mimo zwiększonej liczby lizosomów, ich działanie może ulec przesunięciu z procesów autofagii na procesy immunologiczne, takie jak prezentacja antygenów, produkcja cytokin oraz cząsteczek prozapalnych, takich jak S1P. Taka zmiana aktywności lizosomów może mieć znaczący wpływ na patogenezę łuszczycy i wskazywać na istotną rolę lizosomów w rozwoju choroby.

Dodatkowym krokiem badawczym była więc ocena możliwości terapeutycznych genisteiny w kontekście łuszczycy, jako modulatora TFEB, regulującego biogenezę i prawidłowy metabolizm lizosomów. W celu określenia mechanizmu molekularnego działania genisteiny, keratynocyty linii HaCaT i pKC hodowli *in vitro* aktywowane cytokinami IL-17, TNF- α lub ich kombinacją, IL-17A/TNF- α przez 24 godziny, poddano analizie cytometrycznej aktywności szlaku MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*), poprzez sprawdzenie stopnia fosforylacji ERK1/2 (ang.

Extracellular Signal-Regulated Kinases). Analiza statystyczna wykazała istotne różnice fosforylacji ERK1/2 w komórkach HaCaT poddanych stymulacji IL-17A. Co więcej, zaobserwowano istotnie niższy poziom fosforylacji tego enzymu w hodowlach HaCaT, które zostały wcześniej preinkubowane przez godzinę z genisteiną, a następnie poddane aktywacji IL-17A. Kolejno, przeprowadzono analizę aktywności PI3K (ang. *Phosphoinositide 3-Kinases*) w keratynocytach linii HaCaT oraz pKC hodowli *in vitro*, wcześniej poddanych działaniu genisteiny przez godzinę i stymulowanych IL-17A, TNF- α , IL-17A/TNF- α . Wykazano znaczący wzrost aktywności PI3K po aktywacji IL-17A oraz IL-17A/TNF- α w pKC, przy czym odnotowano spadek poziomu fosforylacji PI3K w komórkach preinkubowanych z dodatkiem genisteiny, co może wskazywać na potencjalne właściwości przeciwzapalne badanego izoflawonu. Dodatkowo, po jednogodzinnej preinkubacji z genisteiną, zaobserwowano obniżenie ekspresji genów *CAMP*, *CCL20*, *DEFB4*, *S100A7* i *S100A9*, biorących udział w odpowiedzi zapalnej w łuszczycy, w komórkach HaCaT i pKC, niezależnie od rodzaju stymulacji (IL-17A, TNF- α lub IL-17A/TNF- α), w porównaniu z grupą kontrolną.