

**„Nowe aspekty patogenezy mukopolisacharydoz – molekularne mechanizmy zmian w przebiegu cyklu komórkowego oraz apoptozy”  
mgr Joanna Brokowska**

Mukopolisacharydozy (ang. *mucopolysaccharidoses* – MPS) należą do grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych (ang. *Lysosomal Storage Diseases* – LSD), których patomechanizm polega na nieprawidłowej akumulacji substratów enzymów lizosomalnych (Tomatsu *et al.*, 2018). W przypadku MPS spichrzeniu ulegają glikozoaminoglikany (GAG). Przyczyną uniemożliwionej degradacji GAG są mutacje w genach kodujących kwaśne hydrolazy znajdujące się w lizosomach, które przez to działają nieefektywnie lub całkowicie brak jest ich aktywności. Skutkuje to zablokowaniem działania lizosomów i zaburzeniem metabolizmu całej komórki, co następnie wiąże się z nieprawidłowym funkcjonowaniem tkanek i narządów (Wraith, 2013). Aktualnie diagnozuje się około 70 lizosomalnych chorób spichrzeniowych, w tym 13 typów i podtypów MPS. Dzielą się one na poszczególne jednostki chorobowe na podstawie rodzaju nieprawidłowego enzymu oraz kumulowanego GAG. Objawy MPS najczęściej dotyczą układu kostnego, pokarmowego, krążenia, tkanki łącznej oraz układu nerwowego (w tym narządów zmysłu) i nasilają się wraz z wiekiem (Tomatsu *et al.*, 2018).

Do niedawna jako główny mechanizm patogenezy MPS uważano fizyczne przepełnienie komórki niezdegradowanymi GAG (Wraith, 2013). Jednak okazuje się, że dotychczasowe próby terapii (m.in. enzymatyczna terapia zastępcza, terapia genowa, przeszczepianie krwiotwórczych komórek macierzystych i terapia redukcji syntezy substratu) nie eliminują wszystkich objawów, nawet jeśli skutkują normalizacją poziomu GAG (Penon-Portmann, Blair and Harmatz, 2023). Dodatkowo, bardzo duże zróżnicowanie objawów pomiędzy różnymi typami również wskazuje, że patomechanizm tej choroby jest bardziej skomplikowany.

Najnowsze badania wskazują, że gromadzenie GAG stanowi jedynie pierwszy etap kaskady zmian, a wtórne zaburzenia znacząco przyczyniają się do progresji choroby (Fecarotta *et al.*, 2020; Leal *et al.*, 2023). Hipotezę tę potwierdzają wyniki badań, które pokazują, że lizosomy są centrami regulacyjnymi w metabolizmie komórki i być może to właśnie niefunkcjonalność przepełnionych lizosomów skutkuje zaburzeniami przebiegu procesów komórkowych, a te mogą być właściwym mechanizmem powstawania objawów MPS (Lamming and Bar-Peled, 2019; Uribe-Carretero *et al.*, 2024). Dotychczasowe informacje na ten temat są jednak fragmentaryczne i dotyczą pojedynczych typów lub podtypów MPS, a przede wszystkim nie pokazują zmian na poziomie molekularnego mechanizmu choroby.

W związku z powyższym, celem mojej rozprawy doktorskiej było zbadanie molekularnego mechanizmu zmian w cyklu komórkowym i apoptozie we wszystkich typach i podtypach MPS, a dokładniej:

- a) zbadanie poziomu ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w cyklu komórkowym oraz apoptozie,
- b) określenie molekularnego mechanizmu zmian przebiegu cyklu komórkowego i apoptozy,
- c) badanie wpływu genisteiny (potencjalnego leku) oraz terapii enzymatycznej na zmiany w przebiegu cyklu komórkowego.

Badania przeprowadziłam na modelu komórkowym fibroblastów pobranych od pacjentów oraz kontrolnej linii HDFa, pochodzącej od zdrowej osoby. W czasie gdy zaczynałam realizować badania w ramach mojej rozprawy doktorskiej znanych było 11 typów i podtypów MPS: I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IVA, IVB, VI, VII i IX, dlatego tych typów i podtypów dotyczą opisane w tej pracy badania.

W skład niniejszej rozprawy doktorskiej wchodzi trzy artykuły, opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych, w których jestem pierwszą autorką. Tworzą one spójny cykl prac, poświęconych zaburzeniom przebiegu cyklu komórkowego oraz apoptozy w MPS. Są to następujące artykuły (przedstawione poniżej w porządku chronologicznym względem daty opublikowania, jednak w dalszej części rozprawy ułożone są one tak, aby stanowiły spójny merytorycznie wątek naukowy):

1. Brokowska J, Pierzynowska K, Gaffke L, Rintz E, Węgrzyn G (2021). Expression of genes involved in apoptosis is dysregulated in mucopolysaccharidoses as revealed by pilot transcriptomic analyses. *Cell Biol Int.* 45: 549-557. doi: 10.1002/cbin.11332.
2. Brokowska J, Gaffke L, Pierzynowska K, Cyske Z, Węgrzyn G (2022). Cell cycle disturbances in mucopolysaccharidoses: Transcriptomic and experimental studies on cellular models. *Exp Biol Med.* 247: 1639-1649. doi: 10.1177/15353702221114872.
3. Brokowska J, Gaffke L, Pierzynowska K, Węgrzyn G (2023). Enhanced efficiency of the basal and induced apoptosis process in mucopolysaccharidosis IVA and IVB human fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 24: 14119. doi: 10.3390/ijms241814119.

Analiza transkryptomyczna za pomocą metody RNA-seq wykazała, że ekspresja genów kodujących białka zaangażowane w cykl komórkowy jest zmieniona we wszystkich badanych typach MPS, chociaż najwięcej zmian ujawniła w typach MPS IX (137 transkryptów), MPS IIID (116 transkryptów) i MPS VII (105 transkryptów). Co istotne, zaobserwowałam regułę, że poziom każdego z transkryptów był zaburzony w taki sam sposób (tj. zwiększony albo zmniejszony) we wszystkich lub prawie wszystkich typach MPS. Wyniki te sugerują istnienie wspólnego mechanizmu nieprawidłowej kontroli transkrypcji lub procesów potranskrypcyjnych praktycznie we wszystkich typach MPS. Zakłócenie cyklu komórkowego we wszystkich typach MPS potwierdziły również wyniki badań cytometrycznych, gdzie zaobserwowałam zwiększenie frakcji komórek w fazie G0/G1 w większości linii komórkowych MPS (z wyjątkiem MPS IVB i MPS VII), a jednocześnie zmniejszenie odsetka komórek w fazie G2/M. Interesujące jest także odkrycie, że oceniając poziomy kluczowych cyklin w badanych komórkach stwierdziłam, że cyklina D1, której poziom fizjologicznie rośnie w fazach G1 i G2, jest obecna w większych ilościach w większości typów MPS w porównaniu do komórek kontrolnych. Ponadto, nie tylko poziom, ale także czas pojawiania się nadmiaru tej cykliny był niewłaściwy w komórkach MPS. Co ciekawe, analiza transkryptomyczna nie wykazała istotnych zmian poziomu transkryptów genu *CCND1*, który koduje cyklinę D1, dlatego prawdopodobnie zaburzone są inne etapy procesu ekspresji tego genu.

W moich badaniach postanowiłam też sprawdzić czy obniżenie poziomu GAG może przywrócić prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. W tym celu wykorzystałam rekombinowane enzymy, które są stosowane klinicznie w terapii MPS I ( $\alpha$ -L-iduronidaza) i MPS II (sulfataza iduronianu) oraz genisteinę – naturalny izoflawon, który jest testowany w eksperymentalnej terapii opartej na obniżeniu wydajności syntezy GAG. Zaobserwowałam, że zarówno genisteina, jak i testowane enzymy spowodowały istotną poprawę regulacji cyklu komórkowego praktycznie we wszystkich badanych liniach komórkowych MPS. Warto jednak podkreślić, że pewne aberracje były nadal widoczne, szczególnie w komórkach MPS I traktowanych  $\alpha$ -L-iduronidazą oraz MPS IIIA, IIIB, IIID, VII i IX traktowanych genisteiną.

Wcześniejsze opisy badań dotyczących cyklu komórkowego obejmują jedynie kilka publikacji, które dotyczą pojedynczych typów MPS (I, II i VII) (Moskot *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2020; Węsierska *et al.*, 2022). Dlatego moje badania pierwszy raz pokazują przekrojowo zaburzenia cyklu komórkowego w MPS, zarówno na poziomie ekspresji genów, jak i molekularnych zmian w przebiegu tego procesu. Wykazałam również, że gromadzenie GAG wywołuje zaburzenia w cyklu

komórkowym, ale ten mechanizm wydaje się być odwracalny, ponieważ zmiany te ulegają skorygowaniu pod wpływem traktowania enzymami lub genisteiną.

W przypadku apoptozy badanie ekspresji genów wykazało, że w komórkach wszystkich typów MPS zmienia się ekspresja wielu genów kodujących białka związane z procesem programowanej śmierci komórki. W zależności od typu MPS, liczba tych genów wahała się między 19 (MPS VI), a 73 (MPS IVB). Poziomy większości transkryptów są podobnie zakłócone w większości rodzajów MPS, co sugeruje, że istnieją wspólne mechanizmy zaburzające proces apoptozy w tej chorobie. Jednak na szczególną uwagę zasługuje znaczna różnica w liczbie zmienionych pod względem poziomu transkryptów między podtypami MPS IV: w MPS IVA - 23, a w IVB - 73. Właśnie na tych dwóch liniach komórkowych wykonałam dokładniejsze badania, w których proces apoptozy analizowałam po stymulacji za pomocą staurosporyny. Związek ten skutecznie indukował apoptozę zarówno w komórkach kontrolnych, jak i w komórkach pochodzących od pacjentów chorych na chorobę Morquio (MPS IV), na co wskazywały podwyższone poziomy specyficznie ciętych kaspaz i białka PARP. Co ciekawe, poziomy kaspazy-9 (ciętej w miejscu Asp330) były wyższe w komórkach kontrolnych niż w fibroblastach Morquio, natomiast poziomy kaspazy-9 (ciętej w miejscu Asp315) utrzymywały się na podobnym poziomie we wszystkich zbadanych liniach komórkowych traktowanych staurosporyną. W wyniku indukcji apoptozy, poziomy kaspazy-3 (ciętej w miejscu Asp175), kaspazy-6 (ciętej w miejscu Asp162), kaspazy-7 (ciętej w miejscu Asp198) i PAPR (ciętej w miejscu Asp214) były wyższe w przypadku MPS IVA i MPS IVB niż w HDFa. Istotne jest, że w nieindukowanych komórkach poziomy kaspazy-3 (ciętej w miejscu Asp175) i PAPR (ciętej w miejscu Asp214) były zwiększone w przypadku MPS IVA, ale nie w MPS IVB, w porównaniu do komórek kontrolnych.

Moje wyniki potwierdzają, że apoptoza jest wzmożona w MPS IV. Sugerują one ponadto, że etap wykonawczy stanowi kluczowy moment tego procesu, charakteryzując się większą skutecznością w komórkach MPS IVA i IVB niż w komórkach kontrolnych. Ta aktywacja miała miejsce zarówno w standardowych warunkach laboratoryjnych (przy podstawowym poziomie apoptozy), jak i po indukcji staurosporyną. Wnioskuje zatem, że wzmożenie apoptozy w chorobie Morquio występuje najprawdopodobniej na etapie wykonawczym kaspaz i PARP, których poziomy są zwiększone. To zjawisko może przyczyniać się do patomechanizmu choroby, zwłaszcza podczas formowania się kości, chrząstki i tkanki łącznej.

Podsumowując, wyniki powstałe podczas realizacji mojej pracy doktorskiej pokazują zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego i apoptozy jako nowo odkryty mechanizm patogenezy we wszystkich typach i podtypach MPS. Określenie mechanizmów zaburzeń przebiegu procesów komórkowych wskazuje na potencjalne cele terapeutyczne i może przyczynić się do rozwoju prac nad terapiami, które uwzględnią nie tylko pierwotną przyczynę choroby, ale także zmiany wtórne. W związku z tym, rozważane może być zastosowanie terapii skojarzonej, obejmującej zarówno zmniejszenie akumulacji GAG, jak i negatywną regulację cykliny D1 czy obniżenie poziomu kaspaz. Warto zauważyć, że różne inhibitory cykliny D1 są wykorzystywane jako potencjalne leki przeciwnowotworowe (González-Ruiz *et al.*, 2020), co może być istotne podczas opracowywania nowych strategii terapeutycznych dla MPS.

Spośród wszystkich chorób genetycznych, te wywołane mutacją w pojedynczym genie wydają się mieć prosty mechanizm patogenezy. Jednak okazuje się, że mutacja w jednym genie i zaburzenia funkcjonowania albo brak jednego białka skutkuje nie tylko zahamowaniem pojedynczej reakcji biochemicznej, ale pośrednio bardzo skomplikowanymi zmianami wynikającymi z sieci

zależności pomiędzy poszczególnymi procesami komórkowymi. Dlatego badania nad molekularnymi mechanizmami chorób o podłożu genetycznym są z jednej strony niezbędne do zrozumienia procesów patogenezы danej choroby, a z drugiej są bezwzględnie konieczne dla efektywnego projektowania metod terapeutycznych w przyszłości.

#### Literatura:

Fecarotta, S. *et al.* (2020) 'Pathogenesis of Mucopolysaccharidoses, an Update', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), p. E2515. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21072515>.

González-Ruiz, L. *et al.* (2020) 'An update on the implications of cyclin D1 in melanomas', *Pigment Cell & Melanoma Research*, 33(6), pp. 788–805. Available at: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12874>.

Jiang, Z. *et al.* (2020) 'Cell cycle progression is disrupted in murine MPS VII growth plate leading to reduced chondrocyte proliferation and transition to hypertrophy', *Bone*, 132, p. 115195. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115195>.

Lamming, D.W. and Bar-Peled, L. (2019) 'Lysosome: The metabolic signaling hub', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 20(1), pp. 27–38. Available at: <https://doi.org/10.1111/tra.12617>.

Leal, A.F. *et al.* (2023) 'Mucopolysaccharidoses: Cellular Consequences of Glycosaminoglycans Accumulation and Potential Targets', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), p. 477. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24010477>.

Moskot, M. *et al.* (2016) 'Cell cycle is disturbed in mucopolysaccharidosis type II fibroblasts, and can be improved by genistein', *Gene*, 585(1), pp. 100–103. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.029>.

Penon-Portmann, M., Blair, D.R. and Harmatz, P. (2023) 'Current and new therapies for mucopolysaccharidoses', *Pediatrics & Neonatology*, 64, pp. S10–S17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2022.10.001>.

Tomatsu, S. *et al.* (2018) *Mucopolysaccharidoses Update (2 Volume Set)*. New York, USA: Nova Science Publishers.

Uribe-Carretero, E. *et al.* (2024) 'Lysosomal Dysfunction: Connecting the Dots in the Landscape of Human Diseases', *Biology*, 13(1), p. 34. Available at: <https://doi.org/10.3390/biology13010034>.

Węsierska, M. *et al.* (2022) 'Cellular and Gene Expression Response to the Combination of Genistein and Kaempferol in the Treatment of Mucopolysaccharidosis Type I', *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), p. 1058. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23031058>.

Wraith, J.E. (2013) 'Mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses', *Handbook of Clinical Neurology*, 113, pp. 1723–1729. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00042-3>.