

**„Zmiany w procesach komórkowych jako nowy aspekt patogenezy
mukopolisacharydoz: badania transkryptomiczne”
mgr Lidia Gaffke**

Obecnie na świecie znanych jest kilkanaście tysięcy chorób o podłożu genetycznym, z których około 7 tysięcy to choroby spowodowane defektami w pojedynczych genach (tzw. choroby jednogenowe). Szacuje się, że wśród nich około 70% powoduje poważne zaburzenia funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Pomimo faktu, iż częstość występowania każdej z tych chorób jest niewielka (od 1:2 000 do 1:200 000), to jeśli rozpatrywać je wszystkie jednocześnie, można oszacować, że cierpi na nie w przybliżeniu 60 milionów ludzi [1]. Osoby chore borykają się z brakiem perspektyw na skuteczną terapię (wynikających z ograniczonej dostępności leczenia przyczynowego), a sama choroba generuje ogromne koszty ekonomiczne i społeczne. Dochodzi do wykluczenia zarówno samych pacjentów, jak i ich rodziców lub opiekunów z normalnego życia. Rodzina często zmuszona jest do porzucenia normalnego funkcjonowania w społeczeństwie na rzecz codziennej opieki nad chorymi.

Mukopolisacharydozy (MPS) to zespół chorób genetycznych z grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych, które stanowią znakomite odzwierciedlenie wyżej opisanej sytuacji. Spowodowane są one defektami genetycznymi skutkującymi brakiem lub znacznym niedoborem aktywności jednej z lizosomalnych hydrolaz, które są zaangażowane w proces rozkładu glikozoaminoglikanów (GAG). Częściowo zdegradowane cząsteczki GAG ulegają spichrzeniu w lizosomach, prowadząc do nieprawidłowego funkcjonowania komórek, tkanek i narządów. Wyróżnia się 11 typów i podtypów MPS (klasyfikowanych na podstawie rodzaju/ów spichrzanego/yh GAG oraz brakującego enzymu), występujących z łączną częstością wynoszącą około 1 na 40 000 - 50 000 żywych urodzeń [2]. MPS to choroby prowadzące najczęściej do przedwczesnych zgonów (zwłaszcza neuronopatyczne formy choroby), ze średnią przewidywaną długością życia od jednej do dwóch dekad, chociaż pacjenci z łagodniejszymi postaciami mogą osiągać wiek dojrzały [3]. Należą one do chorób postępujących, ze względu na ciągłą akumulację GAG. Stan pacjentów ulega ciągłemu pogorszeniu, co skorelowane jest ze stopniową utratą zdolności poznawczych i zmianami zachowania w przypadku pacjentów cierpiących na postacię neuronopatyczne. Krótki opis jednego z typów MPS, choroby Sanfilippo (MPS typu III), wraz z przedstawieniem aktualnie dostępnych opcji terapeutycznych (obejmujących – w odróżnieniu od większości pozostałych typów MPS - jedynie leczenie objawowe) oraz

prognozą rozwoju potencjalnych terapii na przyszłość, został przeze mnie zawarty w pracy przeglądowej opublikowanej w *Metabolic Brain Disease* [4].

Przyczyną braku skutecznych terapii dla MPS jest z jednej strony problem występowania mutacji we wszystkich komórkach chorego, a z drugiej, niezwykle skomplikowana patogeneza chorób o podłożu genetycznym. Do niedawna akumulację GAG uważano nie tylko za kluczową, ale i jedyną przyczynę MPS [3]. Stąd też wynikało zaskoczenie niepełnym powodzeniem enzymatycznej terapii zastępczej, w wyniku której po dożylnym podaniu rekombinowanego enzymu ludzkiego, objawy choroby są tylko częściowo korygowane, pomimo znacznego obniżenia poziomu GAG [5]. Z drugiej strony należy zauważyć, że wiedza dotycząca mechanizmów prowadzących do zmian patologicznych w obrębie komórek, tkanek czy całego organizmu jest w przypadku MPS jedynie fragmentaryczna. Nawet bowiem w chorobach monogenowych, w wyniku mutacji w jednym genie i braku funkcjonalności jednego białka (potencjalnie odpowiedzialnego za pojedynczą reakcję biochemiczną), dochodzi do powstania szeregu efektów wtórnych. Fakt ten wynika z istnienia niezwykle skomplikowanej sieci zależności w obrębie wszystkich procesów komórkowych. Doniesienia opublikowane w ostatnim czasie wskazują, że u pacjentów z MPS występuje znacznie szersze spektrum defektów komórkowych niż przypuszczano wcześniej. Zmiany te mogą być nawet istotniejsze dla patogenezy choroby niż samo spichrzanie niezdegradowanych GAG w lizosomach. Podsumowanie opisanych do tej pory tego typu zmian, wraz z podziałem na poszczególne procesy komórkowe oraz propozycją iż ich zaburzenia stanowią bardzo istotny – choć do niedawna niedoceniany – aspekt MPS, zostało przedstawione przeze mnie w pracy opublikowanej w *Cell Biology International* [6]. Poznanie molekularnych mechanizmów chorób o podłożu genetycznym jest zatem niezbędne dla zrozumienia procesów patogenezy danej jednostki chorobowej oraz stanowi punkt wyjściowy dla ewentualnego efektywnego projektowania metod terapeutycznych w przyszłości.

W świetle powyższych faktów, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie zmian w ekspresji genów zaangażowanych w poszczególne procesy komórkowe w komórkach pochodzących od pacjentów z MPS. Kompleksowe ujęcie tego zagadnienia (polegające na analizie ekspresji wszystkich genów we wszystkich typach MPS) oraz wskazanie na specyfikę wykrytych zmian (czyli określenie które z nich są charakterystyczne dla wszystkich typów MPS, a które są specyficzne dla jednego lub kilku typów lub podtypów)

stanowiło nieopisane wcześniej w literaturze podejście do wskazanego problemu badawczego.

Przeprowadzone w ramach mojej rozprawy doktorskiej analizy transkryptomiczne wskazały na znaczące zmiany w efektywności ekspresji wielu genów dla każdego typu MPS, w stosunku do komórek pochodzących od osoby zdrowej - w zakresie od 289 do 893 transkryptów o istotnie zmienionym poziomie, w zależności od typu MPS. Wyniki te świadczą o ogromnym zróżnicowaniu pomiędzy poszczególnymi typami choroby. Z drugiej strony, analizując transkrypty o istotnie zmienionym poziomie w większości typów MPS, mogłam zidentyfikować procesy o największej liczbie nieprawidłowo regulowanych genów. Wśród nich znajdują się geny kodujące białka zaangażowane między innymi w homeostazę, podziały komórkowe czy transport pęcherzykowy. Co ważne, ekspresja niektórych genów była szczególnie mocno zmieniona w komórkach MPS, co sugeruje możliwość użycia tych genów lub ich produktów jako potencjalnych celi terapeutycznych w dalszych badaniach nad poszukiwaniem nowych terapii. Wyniki tych badań opublikowałam w artykule, który ukazał się w *International Journal of Molecular Sciences* [7].

Kolejne przeprowadzone przeze mnie analizy potwierdziły istotne zmiany dotyczące ekspresji genów kodujących różne regulatory procesów komórkowych. Rezultaty te, zamieszczone w pracy opublikowanej w *Metabolic Brain Disease* [8], prowadzą do wniosku, że wynikające ze zmienionej ekspresji genów zaburzenia kontroli procesów zachodzących w komórkach mogą w znaczący sposób przyczynić się do rozwoju ich dysfunkcji, a w konsekwencji do pojawienia się specyficznych objawów MPS. Dalsze badania wskazały, że dotyczy to także neurodegeneracji i zmian behawioralnych [9].

Istnieją pewne ograniczenia zastosowanego w mojej rozprawie doktorskiej modelu eksperymentalnego. Są to przede wszystkim: (1) użycie jednej linii komórkowej dla każdego typu MPS (należy wziąć pod uwagę zmienność genetyczną pacjentów w obrębie danego typu), (2) zastosowanie modelu komórkowego, który może nie odzwierciedlać zmian na poziomie całego organizmu (dla uzyskania wiarygodnych wyników konieczne były cztery powtórzenia biologiczne każdego doświadczenia i odpowiednio dobrane metody analizy statystycznej); (3) użycie jednego rodzaju komórek - fibroblastów (stanowiących wygodny model badania patomechanizmu choroby w warunkach *in vitro*). Niemniej jednak, przeprowadzone badania transkryptomiczne pozwoliły na wykrycie istnienia kompleksowych zmian w ekspresji genów w komórkach pochodzących od pacjentów cierpiących na wszystkie

typy MPS i stanowią podstawę dla dalszych doświadczeń zmierzających do poznania szczegółowych molekularnych mechanizmów zaburzeń występujących w tych chorobach.

W związku z trwającym stanem zagrożenia epidemiologicznego, postanowiłam przeanalizować uzyskane dane transkryptomiczne pod kątem potencjalnie zwiększonego ryzyka pacjentów MPS na zakażenie wirusem SARS-CoV-2. Chociaż zwężenie dróg oddechowych i występowanie gęstego śluzu, charakterystyczne dla choroby, wskazywałyby na dodatkowy czynnik sprzyjający rozwinięciu COVID-19, przeprowadzone analizy transkryptomiczne, podbudowane rezultatami badań eksperymentalnych, sugerują, że pacjenci z różnymi typami MPS mogą być mniej podatni na zakażenie tym wirusem. Badania te zostały opisane w artykule opublikowanym w *FEBS Letters* [10].

Podsumowując, w mojej pracy dowiodłam, że w fibroblastach pochodzących od chorych na wszystkie typy MPS istnieją istotne zmiany w poziomach transkryptów pochodzących z wielu genów, których produkty są zaangażowane w różne procesy komórkowe. Wnioskuje zatem, że za zaburzenia procesów komórkowych obserwowane w MPS odpowiedzialne są nie tylko dysfunkcje organelli spowodowane fizycznym spichrzaniem GAG w lizosomach, ale też efekty nieprawidłowej kontroli ekspresji różnych genów. Co prawda występowanie wtórnych, drugo- i trzecio-rzędowych, zmian komórkowych było postulowane wcześniej, jak podsumowałam w jednej z prac przeglądowych [6], jednakże nie były one wiązane z globalnymi zmianami w ekspresji genów, a wszystkie typy MPS nie były wcześniej badane w tym aspekcie. Co więcej, uzyskane przeze mnie wyniki mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych, wskazując potencjalne cele dla nowych leków w postaci genów o szczególnie mocno zaburzonej regulacji ekspresji lub produktów tych genów. Możliwe, że tylko terapie skojarzone, które powinny obejmować działanie leków korygujących określone procesy komórkowe, przy jednoczesnym ograniczeniu spichrzania GAG, mogą prowadzić do skutecznego leczenia MPS, którego efektem będzie niedopuszczenie do pojawienia się objawów choroby w przypadku rozpoczęcia terapii na wczesnym jej etapie lub przywrócenie prawidłowych funkcji organizmu jeśli objawy pojawiły się wcześniej. Na koniec warto zauważyć, że - jak zaproponowałam w jednej z moich publikacji [7] - choroby uważane za jednogenowe, takie jak MPS, mogą w rzeczywistości obejmować zaburzenia regulacji ekspresji bardzo wielu genów, będąc w ten sposób w rzeczywistości niejako chorobami „wielogenowymi”.

Literatura (artykuły wchodzące w skład tej rozprawy zaznaczone są pogrubiałą czcionką)

1. WHO. Genes and Human Diseases. Dostępne online:
<https://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html>
2. Muenzer J. (2011) Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 50 (Suppl. 5): v4-12.
3. Wraith J.E. (2013) Mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *Handb Clin Neurol.* 113: 1723-1729.
4. **Gaffke L[#], Pierzynowska K[#], Piotrowska E, Węgrzyn G. (2018) How close are we to therapies for Sanfilippo disease? *Metab Brain Dis.* 33: 1–10.**
5. Gabig-Cimińska M, Jakobkiewicz-Banecka J, Malinowska M, Kloska A, Piotrowska E, Chmielarz I, Moskot M, Węgrzyn A, Węgrzyn G. (2015) Combined therapies for lysosomal storage diseases. *Curr Mol Med.* 15: 746-771.
6. **Gaffke L, Pierzynowska K, Podlacha M, Brokowska J, Węgrzyn G. (2019) Changes in cellular processes occurring in mucopolysaccharidoses as underestimated pathomechanisms of these diseases. *Cell Biol Int.* doi: 10.1002/cbin.11275.**
7. **Gaffke L, Pierzynowska K, Podlacha M, Hoinkis D, Rintz E, Brokowska J, Cyske Z, Węgrzyn G. (2020) Underestimated aspect of mucopolysaccharidosis pathogenesis: global changes in cellular processes revealed by transcriptomic studies. *Int J Mol Sci.* 21: 1204.**
8. **Gaffke L, Pierzynowska K, Krzelowska K, Piotrowska E, Węgrzyn G. (2020) Changes in expressions of genes involved in the regulation of cellular processes in mucopolysaccharidoses as assessed by fibroblast culture-based transcriptomic analyses. *Metab Brain Dis.* doi: 10.1007/s11011-020-00614-2.**
9. Pierzynowska K, Gaffke L, Podlacha M, Węgrzyn G. (2020) Genetic base of behavioral disorders in mucopolysaccharidoses: transcriptomic studies. *Int J Mol Sci.* 21:1156.

10. Pierzynowska K[#], Gaffke L[#], Węgrzyn G. (2020) Transcriptomic analyses suggest that mucopolysaccharidosis patients may be less susceptible to COVID-19. *FEBS Lett.* doi: 10.1002/1873-3468.13908.

([#]) równorzędni współautorzy