

AUTOREFERAT

dr Karolina Pierzynowska

Katedra Biologii Molekularnej

Wydział Biologii

Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 2023

[1] Imię i nazwisko: Karolina Pierzynowska

[2] Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

01.07.2013 tytuł licencjata, kierunek Biologia, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

13.07.2015 tytuł magistra biologii, kierunek Biologia (specjalność: Biologia molekularna), Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

Promotor: dr Aleksandra Hać

Tytuł pracy magisterskiej: *Wpływ kinaz S6K1 oraz S6K2 na efektywność degradacji autofagosomów przez lizosomy na modelu mysich fibroblastów embrionalnych*

31.01.2020 stopień Doktora Nauk Ścisłych i Przyrodniczych w dyscyplinie Nauki biologiczne, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego

Promotor: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

Tytuł pracy doktorskiej: *Indukcja autofagii jako mechanizm działania genisteiny w eksperymentalnej terapii chorób neurodegeneracyjnych*

[3] Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

01.10.2015 – 30.11.2019: doktorantka Studiów Doktoranckich z Biologii, Ekologii i Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

15.02.2017 – 30.04.2020: **asystent**, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

06.11.2017 – 09.01.2018: staż naukowy, Katedra Biochemii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska

15.08.2019 – 14.09.2019: staż naukowy, Laboratorium Neuropatologii Molekularnej, Zakład Biochemii Instytutu Nauk Neurologicznych Blanchette Rockefeller, West Virginia University, Morgantown, USA

01.05.2020 do teraz: **adiunkt**, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

[4] Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

[4a] Tytuł głównego osiągnięcia habilitacyjnego

Wykorzystanie danych transkryptomycznych do identyfikacji nowych celów terapeutycznych dla lizosomalnych chorób spichrzeniowych z grupy mukopolisacharydoz

[4b] Cykl publikacji wchodzący w skład głównego osiągnięcia habilitacyjnego

1. [Pierzynowska K](#), Gaffke L, Podlacha M, Węgrzyn G. (2020) Genetic Base of Behavioral Disorders in Mucopolysaccharidoses: Transcriptomic Studies. *Int J Mol Sci.* 21(3):1156.
IF₂₀₂₀: **5.924**; MEiN: **140**; kwartył: **Q1**
liczba cytowań: **16** (Scopus), **14** (WoS)
2. Rintz E, Gaffke L, Podlacha M, Brokowska J, Cyske Z, Węgrzyn G, [Pierzynowska K*](#) (2020) Transcriptomic Changes Related to Cellular Processes with Particular Emphasis on Cell Activation in Lysosomal Storage Diseases from the Group of Mucopolysaccharidoses. *Int J Mol Sci.* 21(9):3194.
IF₂₀₂₀: **5.924**; MEiN: **140**; kwartył: **Q1**
liczba cytowań: **16** (Scopus), **16** (WoS)
3. [Pierzynowska K](#), Gaffke L, Jankowska E, Rintz E, Witkowska J, Wiczerzak E, Podlacha M, Węgrzyn G. (2020) Proteasome Composition and Activity Changes in Cultured Fibroblasts Derived From Mucopolysaccharidoses Patients and Their Modulation by Genistein. *Front Cell Dev Biol.* 8:540726.
IF₂₀₂₀: **6.684**; MEiN: **70**; kwartył: **Q1**
liczba cytowań: **12** (Scopus), **12** (WoS)
4. Gaffke L, Szczudło Z, Podlacha M, Cyske Z, Rintz E, Mantej J, Krzelowska K, Węgrzyn G, [Pierzynowska K*](#) (2022) Impaired ion homeostasis as a possible associate factor in mucopolysaccharidosis pathogenesis: transcriptomic, cellular and animal studies. *Metab Brain Dis.* 37(2):299-310.
IF₂₀₂₁: **3.655**; MEiN: **70**; kwartył: **Q2**
liczba cytowań: **6** (Scopus), **6** (WoS)

5. [Pierzynowska K](#), Żabińska M, Gaffke L, Cyske Z, Węgrzyn G. (2022) Changes in expression of signal transduction-related genes, and formation of aggregates of GPER1 and OXTR receptors in mucopolysaccharidosis cells. *Eur J Cell Biol.* 101(3):151232.
IF₂₀₂₁: **6.020**; MEiN: **100**; kwartył: **Q2**
liczba cytowań: **3** (Scopus), **3** (WoS)
6. [Pierzynowska K](#), Gaffke L, Żabińska M, Cyske Z, Rintz E, Wiśniewska K, Podlacha M, Węgrzyn G. (2023) Roles of the oxytocin receptor (OXTR) in human diseases. *Int J Mol Sci.* 24(4):3887.
IF₂₀₂₁: **6.208**; MEiN: **140**; kwartył: **Q1**
liczba cytowań: 0 (Scopus), 0 (WoS)
7. Żabińska M, Gaffke L, Bielańska P, Podlacha M, Rintz E, Cyske Z, Węgrzyn G, [Pierzynowska K*](#) (2023) Decreased levels of chaperons in mucopolysaccharidoses and their elevation as a putative auxiliary therapeutic approach. *Pharmaceutics* 15(2):704
IF₂₀₂₁: **6.525**; MEiN: **100**; kwartył: **Q1**
liczba cytowań: 0 (Scopus), 0 (WoS)
8. Wiśniewska K, Gaffke L, Krzelowska K, Węgrzyn G, [Pierzynowska K*](#) (2022) Differences in gene expression patterns, revealed by RNA-seq analysis, between various Sanfilippo and Morquio disease subtypes. *Gene* 812:146090.
IF₂₀₂₁: **3.913**; MEiN: **70**; kwartył: **Q2**
liczba cytowań: **1** (Scopus), **1** (WoS)
9. [Pierzynowska K*](#), Rintz E, Gaffke L, Węgrzyn G. (2021) Ferroptosis and Its Modulation by Autophagy in Light of the Pathogenesis of Lysosomal Storage Diseases. *Cells* 10(2):365.
IF₂₀₂₁: **7.666**; MEiN: **140**; kwartył: **Q2**
liczba cytowań: **18** (Scopus), **17** (WoS)
10. [Pierzynowska K](#), Gaffke L, Cyske Z, Węgrzyn G, Buttari B, Profumo E, Saso L. (2021) Oxidative Stress in Mucopolysaccharidoses: Pharmacological Implications. *Molecules* 26(18):5616.
IF₂₀₂₁: **4.927**; MEiN: **100**; kwartył: **Q2**
liczba cytowań: **5** (Scopus), **4** (WoS)

*Autor korespondujący

Łączna wartość wskaźnika Impact Factor prac wchodzących w skład głównego osiągnięcia habilitacyjnego: **57,446**

[4c] Omówienie głównego osiągnięcia habilitacyjnego

Mukopolisacharydozy (MPS) są rzadkimi chorobami genetycznymi należącymi do lizosomalnych chorób spichrzeniowych. Ich bezpośrednią przyczyną są mutacje w genach kodujących enzymy lizosomalne odpowiedzialne za prawidłową degradację glikozoaminoglikanów (GAG). Mutacje te powodują niedostateczną aktywność lub całkowity brak aktywności wspomnianych enzymów, skutkiem czego jest patologiczna akumulacja GAG w lizosomach, prowadząca do zaburzeń prawidłowego funkcjonowania nie tylko lizosomów ale także komórek, tkanek jak i całego organizmu.

Do niedawna wyróżniało się łącznie 11 typów i podtypów tej choroby w zależności od defektu poszczególnego enzymu oraz rodzaju spichrzanego GAG (**Tabela 1**). Do objawów łączących wszystkie typy/podtypy MPS należą niski wzrost, dysmorfia twarzy, przewlekłe bóle stawowe, organomegalia i problemy z narządami zmysłów. Niektóre z typów MPS (ciężkie przypadki MPS I, MPS II, MPS VII i wszystkie podtypy MPS III) charakteryzują się dodatkowo wystąpieniem zaburzeń neurologicznych. Objawy te występują często i mogą powstawać z dwóch powodów: (i) z bezpośredniego uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) spowodowanego niszczeniem tkanki przez gromadzenie się GAG lub (ii) pośrednio przez wpływ zaburzeń somatycznych jak np. ucisk na rdzeń kręgowy lub wodogłowie, które w efekcie prowadzą do uszkodzeń mózgowia skutkując agresją, problemami ze snem, trudnościami w mowie, utratą słuchu, zmianami osobowości. Nieleczeni pacjenci, których dotknęły objawy ze strony neurologicznej, wraz z upływem czasu tracą nabyte wcześniej umiejętności i zaczynają cofać się w rozwoju przez co wymagają całodobowej opieki. Średni czas przeżycia pacjentów z MPS waha się między 10 i 20 lat w zależności od typu choroby oraz natężenia objawów.

W ostatnim czasie opisano dwa nowe typy MPS (MPS X i MPS-PS), które również zostały ujęte w przedstawionej Tabeli 1. MPS X powodowana jest przez mutację w genie *ARSK*, kodującym arylsulfatazę K, skutkującą spichrzeniem siarczanu dermatanu. Dotychczas zdiagnozowani pacjenci dożyli wieku nastoletniego. Ciekawym typem MPS jest syndrom MPS-PS, w którym obserwuje się podwyższony poziom GAG jednak bez defektu żadnego ze znanych enzymów lizosomalnych. Dokładny patomechanizm tego schorzenia nie jest znany mimo zidentyfikowania mutacji w genie *VPS33A*, którego produkt białkowy bierze udział w szlakach endocytarnych i autofagicznych. Wydajność endocytozy i autofagii pozostaje jednak na prawidłowym poziomie. Pacjenci MPS-PS umierają najczęściej przed ukończeniem 2 roku życia. Dostęp do komórek pacjentów cierpiących na te dwa niedawno opisane typy MPS jest

jednak ograniczony z powodu bardzo małej liczby pacjentów (nie przekraczającej 30 na całym świecie) oraz z uwagi na fakt, że większość z nich pochodzi z objętej konfliktem zbrojnym Rosji. Pobór materiału od takich pacjentów jest więc w obecnym czasie niemożliwy.

Tabela 1. Charakterystyka poszczególnych typów/podtypów MPS.

typ/podtyp MPS	spichrzany GAG*	Gen	defektywny enzym
MPS I	HS, DS	<i>IDUA</i>	α -L-Iduronidaza
MPS II	HS, DS	<i>IDS</i>	Sulfataza iduronianu
MPS IIIA	HS	<i>SGSH</i>	Sulfohydrolaza <i>N</i> -sulfoglukozaaminy
MPS IIIB	HS	<i>NAGLU</i>	<i>N</i> -Acetyloglukozaminidaza
MPS IIIC	HS	<i>HGSNAT</i>	<i>N</i> -Acetylotransferaza α -Glukozaminidu
MPS IIID	HS	<i>GNS</i>	Sulfataza <i>N</i> -acetyloglukozaminy
MPS IVA	KS, CS	<i>GALNS</i>	Sulfataza <i>N</i> -acetylogalaktozaminy
MPS IVB	KS	<i>GLB1</i>	β -Galaktozydaza
MPS VI	DS.	<i>ARSB</i>	Arylosulfataza B
MPS VII	HS, DS, CS	<i>GUSB</i>	β -Glukuronidaza
MPS IX	H	<i>HYAL1</i>	Hialuronidaza
MPS X	DS.	<i>ARSK</i>	Arylosulfataza K
MPS-PS	HS, DS	<i>VPS33A</i>	VPS33A

Oznaczenia: HS – siarczan heparanu, DS – siarczan dermatanu, KS – siarczan keratanu, CS – siarczan chondroityny, H - hialuronian

Do niedawna uważano, że magazynowane GAG są główną, jeśli nie jedyłą, przyczyną MPS. Okazuje się jednak, że enzymatyczna terapia zastępcza (ERT, *ang. enzyme replacement therapy*) (stosowana w praktyce klinicznej w MPS I, MPS II, MPS IVA, MPS VI i MPS VII), przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych (stosowany najczęściej u najmłodszych pacjentów z MPS I i II), terapia genowa lub terapia redukcji syntezy substratu (SRT, *ang. substrate reduction therapy*) (testowane w badaniach przedklinicznych i badaniach klinicznych) nie prowadzą do całkowitej korekty objawów u pacjentów, nawet jeśli osiągnięto normalizację poziomu GAG. Co więcej, wyraźnym i mocnym argumentem przeciwko tak prostemu patomechanizmowi jak spichrzanie GAG jest fakt, że ich akumulacja skutkuje znaczącymi różnicami pomiędzy objawami różnych typów MPS, przy czym MPS III (charakteryzujący się neurodegeneracją i ciężkimi objawami neuropsychiatrycznymi oraz

stosunkowo łagodną prezentacją somatyczną) oraz MPS IV (z prawidłowym rozwojem ośrodkowego układu nerwowego i ciężkimi schorzeniami kości i stawów) są skrajnymi przykładami zmienności choroby. Jako inny przykład warto podać MPS I i MPS II jako schorzenia, w których gromadzą się te same rodzaje GAG (DS i HS), ale zarówno szczegóły biochemiczne, jak i objawy znacznie się różnią. MPS I jest spowodowany niedoborem α -L-iduronidazy (produktu genu *IDUA*), podczas gdy w MPS II występuje dysfunkcja sulfatazy iduronianu (produktu genu *IDS*). Pomimo nagromadzenia DS i HS w obu tych chorobach zmętnienie rogówki występuje u pacjentów z MPS I, ale nie z MPS II. Za to zmiany naskórkowe są obecne w MPS II, podczas gdy są one nieobecne w MPS I. Także nadpobudliwość i agresywne zachowanie są charakterystyczne dla pacjentów z neuronopatycznym typem MPS II, ale nie dla tych z MPS I. Warto dodać, że różni się także sam sposób dziedziczenia opisywanych schorzeń. MPS I jest dziedziczony w sposób autosomalny recesywny, natomiast MPS II jest chorobą związaną z chromosomem X.

Sugerowałoby to istnienie dodatkowej przyczyny/dodatkowych przyczyn powstawania objawów u pacjentów. Nasuwa się więc pytanie o inne niż magazynowanie GAG aspekty patogenezy MPS na poziomie molekularnym.

Zmienność w występowaniu i nasileniu objawów może być duża we wszystkich typach MPS, a głównymi czynnikami wpływającymi na nie są różne aktywności resztkowe (lub nawet całkowity brak aktywności) deficytowych enzymów oraz wydajność syntezy GAG. Jednakże, inne czynniki mogą także w istotny sposób modulować przebieg choroby jak np. indywidualna podatność pacjentów na reakcje zapalne, równowaga redoks i inne. Takie czynniki mogą działać niezależnie od magazynowania GAG (choć mogą pojawiać się jako wtórne efekty pierwotnej akumulacji GAG). Alternatywnie, niektóre zaburzenia mogą być niemożliwe do odwrócenia, gdy raz powstały, nawet jeśli usuwanie zmagazynowanych GAG jest skuteczne w późniejszym okresie.

Postawiłam hipotezę, że na przebieg choroby i nasilenie objawów mogą wpływać także czynniki genetyczne na co mogą składać się zmiany w ekspresji innych genów, pozornie nie związanych z przebiegiem choroby (czyli nie związanych z metabolizmem GAG), a jednak mogących mieć duży wpływ na nasilenie/złagodzenie objawów.

Badania wysokoprzepustowe mogą być niezwykle pomocnym narzędziem ułatwiającym identyfikację nieznaną jeszcze czynników genetycznych modulujących przebieg chorób człowieka, zwłaszcza w przypadku rzadkich schorzeń, których dokładny patomechanizm nie został jeszcze zbadany. Należące do grupy technik wysokoprzepustowych badania transkryptomyczne są jednymi z najpowszechniej stosowanych analiz (obok badań

proteomicznych i metabolomicznych) w poszukiwaniu zmian wydajności pracy komórek i tkanek (na skutek mutacji, infekcji, działania/braku działania danego czynnika zewnętrznego lub podania/pozbawienia określonej substancji). Techniki te, służące do określenia zmian w poziomach ekspresji konkretnych genów lub całych grup genów, mogą wskazać na zaburzenia funkcjonowania poszczególnych procesów komórkowych lub szlaków przekazywania sygnałów, podczas poszukiwania patomechanizmów chorób takich jak MPS. Identyfikacja takich zaburzeń na poziomie molekularnym może zarówno wskazać na ich konkretną rolę w rozwoju objawów jak i wytyczyć nowe cele dla opracowywanych przyszłych terapii.

Badania transkryptomiczne przeprowadziłam na liniach fibroblastów pobranych od pacjentów ze wszystkimi znanymi do 2020 roku typami i podtypami MPS (MPS I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IVA, IVB, VI, VII, IX) (**Tabela 2**). Dzięki przeprowadzonej analizie udało się zidentyfikować ponad 800 genów które ulegały zaburzeniom pod względem poziomu ekspresji. Szczególnie dużo takich genów okazało się brać udział w procesach związanych z: (i) zachowaniem (**Publikacja nr 1**), (ii) aktywacją komórek (**Publikacja nr 2**), (iii) aktywnością proteasomu (**Publikacja nr 3**), (iv) homeostazą jonową (**Publikacja nr 4**), (v) sygnalizacją komórkową zależną od receptorów (**Publikacje nr 5 i 6**), (vi) fałdowaniem białek (**Publikacja nr 7**) oraz (vii) aktywnością rybosomów (**Publikacja nr 8**). Zaproponowałam także inne niż wykryte w badaniach transkryptomicznych aspekty funkcjonowania komórek, które mogą mieć znaczenie przy rozwoju objawów MPS: stres oksydacyjny oraz zaburzenia szlaków prowadzących do ferroptozy (**Publikacje nr 9 i 10**).

Już na etapie analizy danych transkryptomicznych w komórkach MPS zauważyłam wiele transkryptów, których poziom ekspresji znacząco różni się od ich poziomu w komórkach kontrolnych, a których produkty białkowe zaangażowane są w zachowanie (term: behavior; GO:0007610; wg bazy danych Ensembl). Przeprowadzenie szczegółowej analizy tych danych pozwoliło mi zaproponować związek specyficznych zmian poziomu transkryptów w poszczególnych typach/podtypach MPS z określonymi zaburzeniami zachowania obserwowanymi u pacjentów. Z ogólnych obserwacji wynikało, że najwięcej transkryptów o zmienionej ekspresji należało do podprocesu uczenia się i pamięci (childterm: learning or memory; GO:0007611; wg bazy danych Ensembl). Dobrze koreluje to z objawami występującymi w neuronopatycznych typach MPS (MPS I, MPS II, wszystkie podtypy MPS III oraz MPS VII), w których problemy z uczeniem się i deficyty pamięci należą do najbardziej charakterystycznych cech. We wspomnianych typach/podtypach drugą grupą genów, dla których liczba transkryptów o istotnie zmienionym poziomie była szczególnie wysoka, były geny opisane jako zachowania lokomotoryczne (childterm: locomotory behavior; GO:0007626;

wg bazy danych Ensembl). To również dobrze koreluje z objawami obserwowanymi u pacjentów, gdyż w przypadku MPS opisywano różne problemy behawioralne związane z lokomocją, w tym nadpobudliwość, bezcelowe poruszanie się i nie zwracanie uwagi na przeszkody na drodze.

Tabela 2. Charakterystyka linii komórkowych pobranych od pacjentów z MPS, które wykorzystane zostały w pracach wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

typ/podtyp MPS	spichrzany GAG	zmutowany gen (nie działający enzym)	mutacja albo mutacje
I	DS, HS	<i>IDUA</i> (α -L-Iduronidaza)	p.Trp402X/p.Trp402X
II	DS, HS	<i>IDS</i> (Sulfataza iduronianu)	p.His70ProfsX29/-
IIIA	HS	<i>SGSH</i> (Sulfohydrolaza N-sulfoglukozaaminy)	p.Glu447Lys/p.Arg245His
IIIB	HS	<i>NAGLU</i> (N-Acetyloglukozaminidaza)	p.Arg626Ter/p.Arg626Ter
IIIC	HS	<i>HGSNAT</i> (N-Acetylotransferaza α -Glukozaminidu)	p.Gly262Arg/p.Arg509Asp
IIID	HS	<i>GNS</i> (Sulfataza N-acetyloglukozaminy)	p.Arg355Ter/p.Arg355Ter
IVA	CS, KS	<i>GALNS</i> (Sulfataza N-acetylogalaktozaminy)	p.Arg386Cys/p.Phe285Ter
IVB	KS	<i>GLB1</i> (β -Galactozydaza)	p.Trp273Leu/p.Trp509Cys
VI	DS	<i>ARSB</i> (Arylosulfataza B)	Nie określono
VII	CS, DS, HS	<i>GUSB</i> (β -Glukuronidaza)	p.Trp627Cys/p.Arg356X
IX	H	<i>HYALI</i> (Hialuronidaza)	Nie określono

Oznaczenia: CS: siarczan chondroityny; DS: siarczan dermatanu; H: hialuronian; HS: siarczan heparanu; KS: siarczan keratanu

Podczas wykonywanej analizy udało mi się zidentyfikować 6 genów, które w najbardziej istotny sposób mogą przyczyniać się do rozwoju obrazu klinicznego choroby. Gen *OXTR*, kodujący receptor dla oksytocyny, zwrócił moją szczególną uwagę. Nie tylko występował najczęściej wśród wszystkich genów o zmienionej ekspresji w różnych typach/podtypach MPS, ale także charakteryzował się bardzo wysokimi wartościami krotności

zmiany, szczególnie w MPS III (między 4 a 60 razy większy poziom ekspresji w porównaniu do komórek kontrolnych; $\log_2FC > 6$). Dane literaturowe wskazują, że nieprawidłowości w sygnalizacji komórkowej opartej na oksytocynie są związane z zaburzeniami społecznymi, w tym z zaburzeniami ze spektrum autyzmu i niezdolnością do rozpoznawania twarzy. Takie problemy behawioralne rzeczywiście są powszechne w neuronopatycznych typach MPS, szczególnie w MPS III. W rzeczywistości, choroba Sanfilippo (MPS III) jest często błędnie diagnozowana jako zaburzenie ze spektrum autyzmu, zwłaszcza na stosunkowo wczesnych etapach choroby. Podobnie, powiązania z zaburzeniami ze spektrum autyzmu doszukuje się dla genu *HRH1* kodującego receptor histaminowy H1. Oprócz powiązania tego receptora z alergicznym nieżytem nosa, powodującym szumy uszne, chrapanie i katar, ostatnie badania wskazują na podwyższoną ekspresję *HRH1* właśnie u pacjentów z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Zwiększona ekspresja tego genu została stwierdzona przez przeprowadzone przeze mnie analizy transkryptomyczne w kilku typach MPS, w tym neuronopatycznych typach I, II, III i VII. W rzeczywistości u pacjentów cierpiących na MPS oprócz pojawienia się objawów przypominających zaburzenia ze spektrum autyzmu często występuje także chrapanie i katar.

Przyczyn upośledzenia umysłowego pacjentów z MPS, szczególnie w zakresie deficytów uczenia się i pamięci można doszukiwać się także w modulacji poziomu ekspresji genu *EIF4A3* kodującego czynnik eIF4A3 (będący częścią kompleksu złącza eksonowego). Niedobór tego czynnika skutkuje różnymi zaburzeniami neurorozwojowymi, w tym mikrocefalią. Ponadto, eIF4A3 został włączony w kontrolę plastyczności synaptycznej oraz rozwój funkcji kognitywnych. Sugeruje się, że prawidłowe dozowanie składników kompleksu złącza eksonowego jest wymagane dla prawidłowego rozwoju i funkcji neuronów.

Przykładami pozostałych genów, których modulację ekspresji wykazałam w analizach transkryptomicznych i które mogą znacząco przyczyniać się do powstawania objawów związanych z zachowaniem się pacjentów są (i) *ID2*, kodujący inhibitor wiązania DNA 2, będący czynnikiem transkrypcyjnym zdolnym do hamowania oligodendrogenyzy i różnicowania komórek prekursorowych oligodendrocytów; (ii) *Homer2*, którego produkt białkowy należy do rodziny homerów białek dendrytycznych; (iii) *INSR* kodujący receptor insulinowy. Polimorfizmy lub zaburzenia poziomu ekspresji tych genów zauważono także w przypadku (i) mięsaka Ewinga (*ID2*), który objawia się gorączką i zaburzeniami widzenia, (ii) głuchoty oraz ataków lękowych (*Homer2*), a także (iii) cukrzycy (*INSR*). Wszystkie te objawy w różnym stopniu występują także w różnych typach/podtypach MPS. Przedstawione tu pokrótce wyniki analiz transkryptomicznych i ich korelacje z zaburzeniami zachowania zostały szczegółowo opisane w pracy [Pierzynowska K et al. \(2020\) Genetic Base of Behavioral](#)

(Publikacja nr 1).

Znaczną liczbę transkryptów o zaburzonej ekspresji w komórkach MPS zaobserwowałam także dla procesów aktywacji komórek (term: cell activation; GO:0001775; wg bazy danych Ensembl), wzrostu komórek (term: cell growth; GO:0016049; wg bazy danych Ensembl), podziałów komórek (term: cell division; GO:0051301; wg bazy danych Ensembl) oraz rozpoznawania komórek (term: cell recognition; GO:0008037; wg bazy danych Ensembl). Analiza genów zaangażowanych w wymienione wyżej procesy, których ekspresja ulegała zmianom w komórkach MPS w stosunku do komórek kontrolnych wskazała na 10 genów, które ulegały takim zmianom w wielu typach/podtypach jednocześnie. Należą do nich przykładowo geny receptorów, nieswoistego kanału kationowego, który jest częścią rodziny kanałów TRP (*TRPV2*) i receptora estrogenowego (*GPER1*), a także gen pleksyny A1 (*PLXNA1*) lub gen arylosulfatazy A (*ARSA*). Modułacja poziomu mRNA wszystkich wymienionych powyżej genów, podobnie jak w przypadku genów związanych z behawiorem, może być związana z określonymi objawami. Przykładowo, udowodniono, że zaburzenia ekspresji (i) genu *TRPV2* prowadzą do cukrzycy, zaburzeń kostnych i objawów sercowo-naczyniowych; (ii) genu *GPER1* powodują dysfunkcje neuronów, nietolerancję glukozy, podwyższone ciśnienie krwi, zmienioną gęstość mineralną kości i chorobę zwyrodnieniową stawów; (iii) genu *PLXNA1* mogą powodować nieprawidłowy rozwój różnych tkanek i narządów, w tym układu nerwowego i tkanki łącznej oraz (iv) genu *ARSA* skutkują zaburzonym metabolizmem cerebrozydu, co wpływa na funkcje neuronów. Wszystkie te objawy są również powszechne w poszczególnych typach MPS, szczególnie MPS III.

Ciekawe wydają się także wyniki dotyczące wzrostu poziomu ekspresji genu *MFGE8* oraz obniżenia poziomu ekspresji genu *MME*. Zaburzona regulacja genu *MFGE8*, kodującego laktadherynę, została powiązana z procesami neurodegeneracyjnymi zależnymi od akumulacji amyloidu. Także zjawisko obniżenia poziomu ekspresji genu *MME* kodującego neprylizynę zaobserwowano u pacjentów oraz w modelach zwierzęcych choroby Alzheimera. Okazuje się, że jednym z substratów dla neprylizyn (obok glukagonu, insuliny, substancji P i wielu innych) jest właśnie amyloid. Rzeczywiście poziomy rozpuszczalnego β -amyloidu (1-40) w mózgach pacjentów MPS w porównaniu z mózganami kontrolnymi są około 3-krotnie wyższe co może znacząco wpływać na patogenezę choroby. Tak więc obniżenie poziomu neprylizyn wraz ze wzrostem poziomu laktadheryny może sprzyjać tworzeniu się złogów amyloidu i powstawaniu blaszek amyloidowych w MPS co z dużym prawdopodobieństwem prowadzi do zaburzeń kognitywnych.

Szczególnie jednak zainteresował mnie gen *CLU*, ulegający zwiększonej ekspresji w MPS, a kodujący białko klasterynę (jeden z zewnątrzkomórkowych chaperonów molekularnych), które reguluje tworzenie i toksyczność włókien β -amyloidu oraz ułatwia jego transport przez barierę krew-mózg. Co więcej, gen *CLU* pojawiał się często na listach transkryptów, których ekspresja ulegała szczególnie wysokim zmianom w komórkach MPS (sięgając nawet 2000-razy zwiększonej ekspresji w przypadku niektórych typów/podtypów MPS; $\log_2FC > 11$). Przypatrując się bliżej temu zagadnieniu zbadalam ostateczny poziom klasteryny w komórkach. Przeprowadzone doświadczenia jednoznacznie wskazały na jej zwiększony poziom w przypadku aż 8 typów/podtypów MPS. Podwyższone poziomy klasteryny wykazywano już w literaturze w różnych chorobach neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona lub Huntingtona.

Zaproponowałam przyjrzenie się bliżej produktom wymienionych powyżej genów jako potencjalnych celów terapeutycznych mogących złagodzić lub znieść niektóre objawy choroby. Podejście takie zostało już wykorzystane dla aktywacji receptora estrogenowego (poprzez podawanie estrogeny) lub zahamowania aktywności pleksyn (poprzez zastosowanie specyficznych przeciwciał) w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, chorób układu krążenia lub nowotworów.

Jak już wcześniej wspomniałam, w przypadku MPS stwierdzano złogi amyloidu, do czego przyczyniać się może wskazany w wykonanych przeze mnie analizach wzrost ekspresji genów *CLU*, *MFGE8* oraz obniżona ekspresja genu *MME* kodujących odpowiednio klasterynę, laktadherynę oraz neprylizynę. Obecnie zwiększenie aktywności neprylizyny jest rozważane jako próba wsparcia leczenia choroby Alzheimera. Dostarczenie aktywnego białka do organizmu wymaga jednak zastosowania wektorów, czemu towarzyszą te same wyzwania, co obecnym pracom nad terapią genową (stymulacja odpowiedzi immunologicznej, wtórna toksyczność i niska efektywność). Mimo to podejmowane są próby wprowadzania aktywnej formy neprylizyny do mózgu, dootrzewnowo oraz domięśniowo i wszystkie te próby wydają się być skuteczne w zakresie redukcji złogów amyloidu. Również w przypadku tej samej choroby, jako jedno z podejść terapeutycznych rozważa się normalizację poziomu klasteryny, gdyż zaburzenie odpowiedniego stosunku klasteryny do peptydów β -amyloidu przyczynia się do jego odkładania w tkankach. Być może strategie te będą również warte rozważenia w przypadku opracowania terapii skojarzonej dla MPS, głównie dla typów dotyczących funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego. Opisane powyżej wyniki oraz hipotezy do dalszych badań przedstawione zostały w pracy [Rintz E et al. \(2020\) Transcriptomic Changes Related to Cellular Processes with Particular Emphasis on Cell Activation in Lysosomal](#)

Storage Diseases from the Group of Mucopolysaccharidoses. *Int J Mol Sci.* 21(9):3194
(Publikacja nr 2).

Proteoliza za pośrednictwem proteasomów jest obok autofagii jednym z głównym procesów degradacji polipeptydów w komórkach. Układ ubikwityna-proteasom jest złożoną (składającą się z ponad tysiąca elementów) maszyną komórkową odpowiedzialną za degradację zbędnych białek cytoplazmatycznych. Ze względu na globalny wpływ na metabolizm komórkowy, modulacja aktywności proteasomu została uznana za podejście terapeutyczne w wielu różnych chorobach (neurodegeneracyjnych, nowotworowych, kardiomiopatiach, chorobach o podłożu immunologicznym). W mojej kolejnej pracy zadałam więc pytanie, czy skład i funkcja proteasomu ulegają zmianom w komórkach MPS. Do tej pory stosunkowo niewiele doniesień dotyczyło problemu aktywności proteasomów w kontekście tej choroby.

W pracy [Pierzynowska et al. \(2020\) Proteasome Composition and Activity Changes in Cultured Fibroblasts Derived From Mucopolysaccharidoses Patients and Their Modulation by Genistein. *Front Cell Dev Biol.* 8:540726 \(Publikacja nr 3\)](#) wraz z zespołem zbadalam czy skład i funkcja proteasomu są zmienione w komórkach pochodzących od pacjentów cierpiących na MPS w stosunku do komórek kontrolnych. Ponadto przeprowadziłam eksperymenty mające na celu zweryfikowanie, czy obniżenie poziomu GAG (przy pomocy genisteiny, jednej z substancji testowanej w ramach terapii redukcji syntezy substratu) może modulować aktywność proteasomu w tych komórkach. W ramach przeprowadzonych badań transkryptomicznych wykryłam znaczące zmiany w ekspresji różnych genów związanych z proteasomem w zdecydowanej większości typów MPS (terms: proteasome complex; GO:0000502 oraz proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic proces; GO:0043161; wg bazy danych Ensembl). Dzięki tej analizie wskazałam na dwa geny charakteryzujące się wysokimi wartościami krotności zmiany poziomu ekspresji: (i) *PSMD11* kodujący jedno z białek podjednostki regulatorowej proteasomu (obniżona ekspresja) oraz (ii) *ADRM1* kodujący białko proteasomalne działające jako receptor ubikwityny (podwyższona ekspresja). Wskazałam także na zwiększoną aktywność proteolityczną proteasomów 26S. Jednak GAG nie były w stanie stymulować proteasomu 26S *in vitro*, co sugeruje, że obserwowana aktywacja w komórkach jest raczej pośrednia niż wynikająca z bezpośrednich interakcji GAG-proteasom. Mimo to, obniżenie poziomu GAG w komórkach przy pomocy genisteiny znacznie zmniejszyło aktywność proteasomów w fibroblastach pochodzących od pacjentów. Sam wpływ genisteiny na aktywność proteasomu 26S *in vitro* był jednak znikomy co oznaczałoby, że genisteina sama w sobie nie posiada właściwości regulacji jego aktywności poprzez bezpośrednie

oddziaływanie. Kolejny cykl doświadczeń pozwolił mi wskazać, że w obecności genisteiny zarówno poziom samej ubikwityny jak i ilość ubikwitynowanych białek uległy zdecydowanemu obniżeniu.

Na podstawie wyżej opisanych badań przedstawiłam hipotezę, że zmniejszenie aktywności proteasomów (w tej pracy pod wpływem działania genisteiny) może mieć korzystny wpływ na komórki pacjentów z MPS ze względu na potencjalne zwiększenie aktywności resztkowej wadliwych enzymów lizosomalnych, które w przeciwnym razie uległyby wydajnej ubikwitynacji i degradacji proteasomalnej, jako nieprawidłowo sfałdowane białka. Wyniki te w pierwszej kolejności wskazują na dodatkową aktywność genisteiny (oprócz wykazanego wcześniej zmniejszenia wydajności syntezy GAG, stymulacji biogenezy lizosomalnej i aktywacji procesu autofagii), która może być korzystna dla zwiększenia aktywności defektywnych enzymów lizosomalnych. W drugiej kolejności badania te wskazują na inhibitory aktywności proteasomu w kontekście ich zastosowania w leczeniu MPS.

Podjęcie takie (obniżenia aktywności proteasomu) zostało już zastosowane przede wszystkim w wielu nowotworach. Dobrym przykładem jest rak wątrobowokomórkowy, w przypadku którego także (podobnie jak w przypadku przeprowadzonych przeze mnie analiz dla MPS) obserwuje się podniesione poziomy ekspresji genu *ADRM1*. Gen ten stał się więc obiecującym celem terapii tego typu nowotworu, a inhibitory *ADRM1*, takie jak RA190 (bis-benzylidynopiperydon; specyficzny inhibitor *ADRM1* skutkujący tłumieniem funkcji całego proteasomu 26S), mają potencjał do zastosowania klinicznego w jego leczeniu. Uzyskane przeze mnie wyniki opisane w tej pracy ukazują, że inhibitory tego typu mogłyby potencjalnie znaleźć zastosowanie także w przypadku terapii MPS.

Jony metali pełnią ważne role w organizmie człowieka jako wtórni posłańcy lub miejsca aktywne metaloenzymów, biorą udział w stabilizacji konfiguracji białek i kwasów nukleinowych. Zjawisko zaburzenia poziomu metali poprzez wpływ na zmiany proteostazy towarzyszy również śmierci komórek nerwowych. Udowodniono również ich udział w transmisji synaptycznej, gdzie jony Zn^{2+} , uwalniane wraz z glutaminianem z pęcherzyków glutamatergicznych, mogą odgrywać ważną rolę w zachowaniu pamięci. Dlatego zaburzenia równowagi jonowej mogą być główną lub dodatkową przyczyną wielu chorób człowieka.

Niespodziewanie dużą liczbę genów, których ekspresja ulega zmianom w komórkach MPS w stosunku do komórek kontrolnych, zaobserwowałam w przypadku procesów odpowiadających za utrzymanie równowagi jonowej. W analizie tej wskazałam na transkrypty zaangażowane w wiązanie jonów (term: ion binding; GO:0043167; wg bazy danych Ensembl), transport jonów (term: ion transport; GO:0006811; wg bazy danych Ensembl) oraz homeostazę

jonów (term: ion homeostasis; GO:0006873; wg bazy danych Ensembl). Liczba tych transkryptów szczególnie dla procesów wiązania jonów wynosiła ponad 200 dla niektórych typów/podtypów MPS (MPS IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IVB, VII, IX), co wskazuje na rangę tego zjawiska. Wyselekcjonowanie transkryptów związanych z utrzymaniem równowagi jonowej, których zmiana poziomu ekspresji w przypadku MPS w porównaniu do komórek kontrolnych jest bardzo wysoka [co najmniej 12 razy ($\log_2FC > 3,5$)] oraz pojawiających się w wielu typach/podtypach MPS doprowadziła do identyfikacji ponad 50 takich transkryptów, wśród których wymienić można geny kodujące syntazę prostaglandynową (*PTGDS*) i metaloproteinazę macierzy 12 (*MMP12*) (charakteryzujące się obniżoną ekspresją) oraz periostynę (*POSTN*) i białko przyłączające się do aktyny (*CAPG*) (charakteryzujące się podwyższoną ekspresją).

Ponieważ aktywności, poziomy lub funkcje białek kodowanych przez te transkrypty są związane z utrzymaniem odpowiednich poziomów jonów metali, głównie Ca^{2+} , Zn^{2+} oraz Fe^{2+} , w następnym etapie postanowiłam zbadać stężenia tych trzech jonów metali w komórkach pobranych od pacjentów oraz u zwierząt stanowiących model MPS typu I. Wyniki tych doświadczeń wykazały obniżone stężenia badanych jonów metali w komórkach MPS w stosunku do komórek kontrolnych oraz w wątrobie i śledzionie myszy.

Zaburzenia poziomu jonów metali obserwuje się już w wielu chorobach, z których większość związana jest z dysfunkcją kanałów jonowych, czyli kanałopatiach. Należą do nich choroby niemal wszystkich układów organizmu, tj. układu nerwowego (np. padaczka uogólniona z drgawkami gorączkowymi plus i ataksja epizodyczna), układu sercowo-naczyniowego (np. zespół QT), układu oddechowego (np. mukowiscydoza), układu endokrynnego (np. rodzinna hiperinsulinemia), układu moczowego (np. zespół Barttera) oraz układu immunologicznego (np. miastenia rzekomoporaźna, zapalenie rdzenia i nerwów wzrokowych). Istotne role jonów metali zaobserwowano również w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, gdzie wpływały one na efektywność agregacji białek takich jak β -amyloid i hiperfosforylowane białko tau czy modulację poziomu reaktywnych form tlenu. Ostatnie doniesienia wykazały także zmiany w ekspresji genów kodujących kanały jonowe w raku piersi, chłoniaku oraz różnych guzach litych.

Obniżone poziomy jonów metali nie są jednak często obserwowane w odniesieniu do chorób człowieka. Badania nad wieloma z nich wykazały raczej wzrost stężenia jonów metali korelujący z niektórymi cechami biochemicznymi chorób. Dotychczas obserwacje obniżonego poziomu jonów metali odnotowano w przypadku przewlekłej choroby nerek, w której spadek stężenia Zn^{2+} jest skorelowany z zaburzeniami wzrostu, uszkodzeniem smaku, anoreksją i

utrata apetytu, zapaleniem skóry, opóźnionym gojeniem się ran oraz infekcjami. Ponadto obniżony poziom Ca^{2+} koreluje z zaburzeniami układu kostnego i sercowo-naczyniowego, bólami mięśni, nadciśnieniem tętniczym, chorobami przyzębia czy cukrzycą. Wszystkie te objawy obserwowane są również u niektórych pacjentów z MPS jako efekty wtórne lub trzeciorzędowe. Bardzo możliwe, że zaobserwowane przeze mnie zmiany w równowadze jonowej w komórkach/tkankach MPS przyczyniają się do wymienionych powyżej objawów.

Pytaniem pozostaje czy terapie oparte na normalizacji zaburzeń gospodarki jonowej mogłyby być efektywne. Można by zaproponować włączenie suplementacji Ca, Fe lub Zn, ewentualnie związków, które zwiększałyby ich stężenie w organizmie, dodatkowo do stosowanej ERT. Takie podejścia do terapii kombinowanych były już proponowane dla MPS, głównie w aspekcie łączenia ERT ze związkami ukierunkowanymi na zaburzenia chrząstki i kości w MPS IV. Zatem stworzenie terapii skojarzonej opartej na suplementacji celowanej w zaburzenia stężeń jonów wraz z ERT/SRT mogłoby podobnie pozytywnie wpłynąć na przebieg MPS.

Przedstawione wyniki i ich interpretacja zawarte zostały w pracy [Gaffke et al. \(2022\) Impaired ion homeostasis as a possible associate factor in mucopolysaccharidosis pathogenesis: transcriptomic, cellular and animal studies. *Metab Brain Dis.* 37\(2\):299-310 \(Publikacja nr 4\).](#)

Kolejnym procesem dla którego zidentyfikowałam dużą liczbę genów o zmienionej ekspresji jest transdukcja sygnału (term: Signal transduction; GO:0007165; wg bazy danych Ensembl). Ścieżki przekazywania sygnałów to kaskady następujących po sobie reakcji będące odpowiedzią na zmiany środowiska wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowego, co prowadzi do adaptacji komórki do zmieniających się warunków. Odbiór sygnałów ze środowiska zewnątrzkomórkowego odbywa się najczęściej za pośrednictwem receptorów znajdujących się w błonie komórkowej. Oceniając geny zaangażowane w procesy transdukcji sygnału, stwierdziłam, że liczba takich genów o zaburzonej ekspresji w komórkach MPS w stosunku do komórek kontrolnych sięga prawie 300 w niektórych typach/podtypach badanej choroby. Wśród wspomnianych 300 genów zidentyfikowałam 16 takich, których ekspresja charakteryzowała się szczególnie wysokimi zmianami tzn. ponad 16-krotnymi ($\log_2FC > 4$). Ponadto, wykonałam analizę genów, których ekspresja ulega zmianom w wielu typach/podtypach MPS jednocześnie (co najmniej 7). Na podstawie uzyskanych danych zidentyfikowałam dwa geny, które wzbudziły moją szczególną ciekawość. Jednym z tych genów, o którym uprzednio już wspominałam przy okazji analizy genów związanych z zachowaniem człowieka, był gen *OXTR*, kodujący receptor dla oksytocyny, charakteryzujący się wzrostem ekspresji. Drugim z tych genów był gen *GPER1*, kodujący jeden z receptorów

estrogenowych (błonowy receptor estrogenowy 1), charakteryzujący się spadkiem poziomu ekspresji. Oba te geny kodują ważne receptory hormonów, które mogą znacząco wpływać na fizjologię pacjentów w przypadku ich zaburzonej regulacji. Celem moich dalszych badań było (i) określenie poziomu produktów białkowych tych dwóch genów w komórkach MPS oraz (ii) zbadanie wpływu obniżenia poziomu GAG (przy pomocy ERT lub SRT) na poziom tych receptorów. Te ostatnie badania przeprowadziłam na modelach komórek MPS I i II inkubowanych w obecności rekombinowanych ludzkich enzymów, odpowiednio α -L-iduronidazy (Aldurazym) i sulfatazy iduronianu (Elapraxe), używanych w leczeniu opartym na ERT, oraz w obecności genisteiny (stosowanej w eksperymentalnym leczeniu opartym na SRT).

Stosując techniki immunodetekcji białek, zbadałam poziom GPER1 i OXTR w komórkach MPS I i MPS II. Dzięki analizie Western blot stwierdziłam, że poziom GPER1 był obniżony w komórkach MPS w stosunku do fibroblastów kontrolnych. Wyniki te są zgodne z analizami transkryptomycznymi, które ujawniły obniżenie poziomu ekspresji genu tego receptora. Leczenie α -L-iduronidazą lub genisteiną i idący za tym spadek poziomu GAG powodował wzrost stężenia GPER1 w fibroblastach MPS I, jednak nie udało się osiągnąć poziomu obserwowanego w komórkach kontrolnych. Analogiczne traktowanie fibroblastów MPS II odpowiednim enzymem (sulfataza iduronianu) lub genisteiną nie spowodowało żadnego istotnego wzrostu poziomu GPER1. Badając poziom OXTR tą samą metodą, stwierdziłam istotnie podwyższone stężenia tego białka w fibroblastach MPS I, ale nie w komórkach MPS II. Częściowo odzwierciedlają to również poziomy transkryptów *OXTR* w tych dwóch typach. Co ciekawe, leczenie komórek MPS I enzymem (α -L-iduronidazą) lub genisteiną prowadziło do normalizacji poziomu *OXTR*.

Co może być zaskakujące, podczas analiz techniką mikroskopii fluorescencyjnej zaobserwowałam pojawienie się agregatów, zarówno *OXTR* jak i *GPER1* w komórkach MPS. Koncentrując się na receptorze estrogenowym, jego agregaty wykazałam w komórkach MPS I, ale nie MPS II. Jednakże poziom transkryptów *GPER1* w fibroblastach MPS I był obniżony, a więc tworzenie agregatów nie może być tłumaczone nadprodukcją białka *GPER1*. Kiedy fibroblasty MPS I były inkubowane w obecności α -L-iduronidazy (Aldurazyme), prowadząc do spadku poziomu GAG, agregaty znikaly, wskazując, że akumulacja GAG może być odpowiedzialna za tworzenie agregatów przez to białko. Jednakże, leczenie genisteiną nie wpłynęło na tworzenie agregatów, sugerując, że obniżenie syntezy GAG jest albo nieefektywne w tym systemie, albo wymaga dłuższego czasu, aby zmniejszyć ilość GAG do takiego poziomu, który jest nieskuteczny w pośredniczeniu w agregacji *GPER1*.

Kiedy te same metody zastosowałam do monitorowania receptora oksytocyny (OXTR), agregaty obserwowałam zarówno w fibroblastach MPS I jak i MPS II w przeciwieństwie do komórek kontrolnych. Co ciekawe, w przypadku OXTR, liczba agregatów zmniejszyła się znacząco po leczeniu zarówno odpowiednim enzymem, jak i genisteiną, przy czym efekty działania enzymów były wyraźniejsze. Jeśli hipoteza o tworzeniu się agregatów w wyniku interakcji białko-GAG jest prawdziwa, wyniki te mogą sugerować, że oddziaływania OXTR-GAG są słabsze niż GPER1-GAG, a mniej efektywne lub wolniejsze działanie negatywnego regulatora syntezy GAG, genisteiny, może być wystarczająco skuteczne, aby spowodować zanik agregatów OXTR, ale nie agregatów GPER1 w komórkach MPS.

Pomimo potencjalnej możliwości wyjaśnienia powstawania agregatów OXTR w komórkach MPS I przez znacznie podwyższone poziomy tego białka, obecność takich agregatów w MPS II, podobnie jak obecność agregatów GPER1 w MPS I, nie mogła być przypisana zmianom w stężeniach tych białek (z uwagi na ich obniżone poziomy lub brak zmian w ekspresji na etapie badań transkryptomicznych). Dlatego, sprawdziłam hipotezę o bezpośrednich interakcjach pomiędzy GPER1 albo OXTR z GAG. Ponieważ DS i HS to GAG, które gromadzą się zarówno w MPS I i MPS II, postanowiłam określić, czy mogą one tworzyć kompleksy z badanymi białkami obecnymi w komórkach. Lizaty fibroblastów (linia komórkowa HDFa) mieszano z oczyszczonymi DS lub HS i po inkubacji wytrącono GAG błękitem 1,9-dimetylometylenowym. Po odwirowaniu, zarówno osad jak i supernatant badałam pod kątem obecności GPER1 lub OXTR, wykrywanych metodą Western blotting. Wraz z zespołem postawiliśmy hipotezę, że znaczące interakcje tych białek z GAG powinny skutkować ich współwytrącaniem z DS albo HS oraz pojawieniem się ich zwiększonej ilości w osadzie, a zmniejszonej w supernatantach.

Wyniki tych eksperymentów wskazują, że GPER może oddziaływać z DS, ale nie z HS. Ponadto, znaczące interakcje zaobserwowałam również pomiędzy OXTR a oboma badanymi GAG. Co ważne, wszystkie te interakcje były wykrywane tylko przy wyższych stężeniach GAG (100-200 μ M). Sugeruje to, że w prawidłowych komórkach, gdzie GAG występują w niewielkich ilościach, ich oddziaływania z GPER i OXTR mogą być znikome, jeśli w ogóle występują. Jednakże, przy znacznie podwyższonym poziomie DS i HS, jak w komórkach MPS I i MPS II, białka te mogą tworzyć kompleksy z GAG, co prowadzi do powstawania ich agregatów, wykrywalnych w mikroskopie fluorescencyjnym.

Podsumowując, biorąc pod uwagę wyniki analiz transkryptomicznych, zbadalam szczególnie poziom dwóch receptorów hormonalnych, błonowego receptora estrogenowego 1 (GPER1) i receptora oksytocyny (OXTR), w komórkach MPS. Zarówno GPER1 jak i OXTR

odgrywają znaczącą rolę w regulacji procesów komórkowych poprzez kaskady transdukcji sygnałów, a ich dysfunkcje mogą wpływać na funkcje komórki. Stwierdziłam, że oba te receptory tworzą agregaty w badanych komórkach. Obecność tych agregatów nie w każdym przypadku koreluje z poziomami mRNA oraz poziomami produktów tych genów, natomiast kompleksy białkowe znikają po obniżeniu poziomu GAG, głównie poprzez podanie rekombinowanych ludzkich enzymów, które są deficytowe w komórkach MPS. Wyniki te sugerują, że agregaty mogą powstawać w wyniku interakcji GPER1 i OXTR z GAG, a nie z powodu zmienionych poziomów tych białek w komórkach. Hipoteza ta została potwierdzona w niniejszej pracy poprzez wykazanie, że GPER1 i OXTR mogą efektywnie oddziaływać z GAG (GPER1 z DS, natomiast OXTR zarówno z DS, jak i HS) kiedy GAG znajdują się w komórkach w wysokich stężeniach. Odkrycie tworzenia agregatów GPER1 i OXTR oraz stwierdzenie, że interakcje te pojawiają się dopiero przy określonych stężeniach GAG wskazują na nowo zidentyfikowany potencjalny patomechanizm komórkowy MPS. Artykuł [Pierzynowska et al. \(2022\) Changes in expression of signal transduction-related genes, and formation of aggregates of GPER1 and OXTR receptors in mucopolysaccharidosis cells. *Eur J Cell Biol.* 101\(3\):151232 \(Publikacja nr 5\)](#) po raz pierwszy opisuje to zjawisko.

Zaburzenia receptora oksytocyny w kontekście patogenezy MPS zainteresowały mnie do tego stopnia, że postanowiłam przyjrzeć się bliżej roli tego receptora w różnych stanach chorobowych. W artykule przeglądowym [Pierzynowska et al. \(2023\) Roles of the oxytocin receptor \(OXTR\) in human diseases. *Int J Mol Sci.* 24\(4\):3887 \(Publikacja nr 6\)](#) wraz ze współautorami, podsumowałam zmiany związane z receptorem oksytocyny (OXTR), które wpływają na przebieg różnych chorób, począwszy od chorób układu rozrodczego, poprzez zaburzenia psychiczne, mukopolisacharydozy, choroby nowotworowe i sercowo-naczyniowe, a skończywszy na innych schorzeniach, takich jak osteoporoza i otyłość. Niemniej mechanizmy molekularne, za pomocą których OXTR wpływa na te choroby, są w większości nieznanne. Nasza wiedza w tym zakresie opiera się głównie na powiązaniach różnych polimorfizmów genu *OXTR*, wydajności metylacji tego genu lub zmian poziomu mRNA *OXTR* z występowaniem wybranych objawów lub zdiagnozowanych zaburzeń.

Obraz ten jest jeszcze bardziej skomplikowany, ponieważ w wielu publikacjach wskazywane jest, że dokładnie te same polimorfizmy genetyczne *OXTR* wpływają na różne choroby. Niemniej fakt ten skłonił mnie do wysunięcia hipotezy, że efekty OXTR nie są specyficzne dla poszczególnych chorób, ale raczej mogą wpływać na wspólne procesy, które z kolei mogą modulować przebieg konkretnych objawów. Co ciekawe, istnieje wiele przykładów sprzecznych wyników opublikowanych przez różnych autorów, które wykazały albo znaczące

powiązania określonych polimorfizmów *OXTR* z poszczególnymi chorobami, albo całkowity brak korelacji w badaniach nad tymi samymi polimorfizmami w tych samych chorobach. Takie niejednoznaczne wyniki różnych badań dotyczyły również metylacji *OXTR*. Ponadto, odnotowano znaczne różnice między płciami i między różnymi tkankami. Proponuję jednak, że pozorny paradoks sprzecznych wyników uzyskiwanych przez różne grupy badawcze można wyjaśnić w taki sposób, że podobne zmienności efektów polimorfizmów *OXTR* czy metylacji DNA mogą występować zarówno u pacjentów cierpiących na różne choroby (zwłaszcza psychiczne), jak i u osób zdrowych. Natomiast efekty określonych wariantów genetycznych lub poziomów metylacji mogą być znacznie bardziej wyraźne u osób dotkniętych chorobą ze względu na ich wpływ na toczące się procesy patologiczne i nasilenie objawów. Te same zaburzenia w procesach regulacyjnych, w których pośredniczy receptor oksytocynowy, mogą być bowiem maskowane u osób zdrowych dzięki w pełni funkcjonującym innym procesom kontrolnym. Może to być szczególnie widoczne w skutecznym panowaniu nad emocjami i zachowaniem, które jest zaburzone u osób z chorobami psychicznymi. W związku z tym, w zależności od składu badanej populacji (należy zauważyć, że badane grupy składały się ze względnie niewielkiej liczby osób, zwykle kilkudziesięciu, a najwyżej kilkuset), skutki niekiedy subtelnych różnic w objawach związanych z funkcjami *OXTR* mogą być bardziej lub mniej wyraźne (czyli maskowanie zaburzeń psychicznych może być mniej lub bardziej skuteczne) i istotnie wpływają na wyniki analiz statystycznych efektów *OXTR* na badane zaburzenia.

Podkreślić należy również, że raczej efektywność ekspresji genu *OXTR*, a nie obecność jego specyficznego wariantu polimorficznego, może istotnie wpływać na proces przekazywania sygnałów w komórkach, w którym pośredniczy *OXTR*. W związku z tym, ekspresja genu *OXTR* wpływa na aktywność wszystkich genów kontrolowanych przez tę sygnalizację molekularną. Taka hipoteza jest zgodna z wynikami badań nad molekularnymi mechanizmami działania *OXTR*, których niestety wciąż jest stosunkowo niewiele. Jak wskazałam wraz ze współautorami omawianej pracy przeglądowej, jeden z nielicznych molekularnych mechanizmów skutków nieprawidłowego działania *OXTR* w chorobach człowieka został przedstawiony w moich badaniach nad mukopolisacharydozami. W tym przypadku podwyższony poziom tego receptora, wynikający ze wzmożonej transkrypcji genu *OXTR*, nie koreluje z jego wyższą aktywnością, ze względu na bezpośrednie interakcje z nagromadzonymi GAG, które powodują powstawanie agregatów, prowadząc do inaktywacji receptora i upośledzenia procesu przekazywania sygnału.

Wartym zauważenia jest, że zrozumienie molekularnych mechanizmów zmian zależnych od receptora oksytocyny w innych chorobach jest niezbędne do pełnej oceny zachodzących procesów i umożliwienia przewidywania wpływu różnych zmian w genie *OXTR* na rozwój specyficznych objawów różnych chorób. Dopiero wtedy możliwy będzie rozwój skutecznych terapii ukierunkowanych na *OXTR*.

W mojej kolejnej pracy [Żabińska et al. \(2023\) Decreased levels of chaperons in mucopolysaccharidoses and their elevation as a putative auxiliary therapeutic approach. *Pharmaceutics* 15\(2\):704](#) (Publikacja nr 7) postanowiłam zająć się zagadnieniem białek chaperonowych w MPS.

Wiele z zaproponowanych dotychczas terapii dla MPS wymaga udziału białek chaperonowych, niezależnie od tego, czy są to terapie będące w powszechnym użyciu (ERT), czy pozostające w fazie eksperymentalnej (terapia genowa, terapia „*STOP-codon-read-through*”). Chaperony, do których należą białka szoku cieplnego, odpowiadają za prawidłowe fałdowanie innych białek do najbardziej korzystnej energetycznie konformacji. Bez ich odpowiedniego poziomu i aktywności prawidłowe fałdowanie enzymu lizosomalnego (wprowadzonego do komórki podczas ERT lub zsyntetyzowanego w komórce po terapii genowej lub terapii „*STOP-codon-read-through*”) może nie być możliwe, a tym samym aktywność takiego enzymu będzie niewystarczająca do wyeliminowania objawów choroby. Gdyby więc poziom lub aktywność chaperonów u pacjentów z MPS okazały się zbyt niskie, można by zaobserwować brak skuteczności takiej terapii.

Istnieje wiele doniesień na temat terapii opartych na dostarczaniu farmakologicznych chaperonów (związków niskocząsteczkowych) w MPS, które miałyby brać udział w prawidłowym zwijaniu enzymów lizosomalnych. Natomiast nasza obecna wiedza na temat wyjściowych poziomów lub aktywności nie-farmakologicznych chaperonów u pacjentów z MPS jest jednak bardzo skąpa. Poziomy wyjściowe popularnych, niespecyficznych białek chaperonowych, należących do rodziny Hsp i biorących udział w fałdowaniu różnych enzymów, w tym lizosomalnych, nigdy nie były badane w przypadku MPS. Dlatego celem wymienionej wyżej pracy było zbadanie poziomów głównych niespecyficznych białek chaperonowych w komórkach pochodzących od pacjentów z MPS.

Przeprowadzone przeze mnie badania na fibroblastach pobranych od pacjentów z MPS typu I i II wskazały na drastyczne obniżenie poziomu białek chaperonowych z rodziny Hsp (Hsp70 i Hsp40) osiągając poziom około 15% poziomu tych białek w komórkach kontrolnych. Badania na modelu zwierzęcym MPS I (*IDUA*^{-/-}) potwierdziły wyniki uzyskane na modelach komórkowych w przypadku mózgowia. W odróżnieniu od mózgu, wątroba charakteryzowała

się odwrotnym efektem, tj. wzrostem poziomu Hsp70 i brakiem istotnych zmian w poziomie Hsp40.

W następnym etapie pracy zbadalam, czy obniżenie poziomu GAG w komórkach MPS za pomocą Aldurazymu (MPS I), Elaprase (MPS II) (leczenie oparte na ERT) lub genisteiny (leczenie oparte na SRT) może korygować obserwowane obniżone poziomy badanych białek Hsp. Stwierdziłam, że zmniejszenie poziomu GAG przez wymienione związki spowodowało tylko częściowy wzrost poziomu białka Hsp40 bez wpływu na poziom białka Hsp70.

Zarówno poziom, jak i aktywność chaperonów są niezwykle istotne w kontekście obecnie stosowanych terapii dla MPS. Dostarczenie rekombinowanego enzymu do organizmu pacjenta (ERT) oraz synteza enzymów po terapii genowej lub terapii „STOP-codon-read-through” wymagają obecności chaperonów, aby cząsteczka enzymu lizosomalnego mogła osiągnąć funkcjonalną strukturę. Opierając się na znanych funkcjach białek Hsp można przypuszczać, że stosowanie wymienionych terapii przy zbyt niskim poziomie chaperonów u pacjentów skutkuje obecnością enzymu, ale jego nieprawidłową strukturą, z powodu niewydolnego systemu kontroli jakości białka. Może to stanowić częściowe wyjaśnienie niepowodzeń tych terapii w korygowaniu wszystkich objawów choroby.

Badania poziomów podstawowych białek z rodziny Hsp dopełniłam analizami transkryptomycznymi. Badania te doprowadziły do identyfikacji genów, których produkty związane są z procesami składania białek i które wykazywały zmienioną ekspresję w komórkach MPS (terms: protein folding; GO:0006457; response to endoplasmic reticulum stress; GO:0034976; response to unfolded protein; GO:0006986; wg bazy Ensembl). Należą do nich nie tylko same białka szoku cieplnego, ale także inne białka zaangażowane w fałdowanie innych białek. Jednym z nich jest gen *CLU*, kodujący klasterynę, który opisywałam już w kontekście patogenezy MPS. Wysoki poziom ekspresji tego genu potwierdziły również inne zespoły badawcze, proponując go jako marker diagnostyczny dla choroby tętnic związanej z mukopolisacharydozą w MPS I lub zaburzeń metabolizmu kości i chrząstek w MPS IV.

Podsumowując, obniżony poziom białek chaperonowych Hsp70 i Hsp40 może być dodatkową przyczyną niskiej aktywności lub braku aktywności deficytowych enzymów w chorobach MPS. Ponadto, może to wskazywać na przyczyny niepowodzenia leczenia, gdzie prawidłowa struktura enzymu dostarczanego do komórek lub syntetyzowanego w nich jest kluczowa dla obniżenia poziomu GAG. Proponuję zatem rozważenie, czy (wraz z ERT, terapią genową, czy terapią „STOP-codon-read-through”) nie należałoby zastosować rozwiązania mającego na celu zwiększenie poziomu białek chaperonowych. Takie rozwiązania stosowane są m.in. w przypadku komórek nowotworowych, gdzie podanie inhibitorów Hsp90 prowadzi

do wzrostu poziomu Hsp70 lub w przypadku uszkodzenia mózgu, gdzie podanie geranyloacetonu również prowadzi do wzrostu poziomu Hsp70. Możliwe jest także zastosowanie związków wpływających na wzrost efektywności ekspresji genów kodujących białka szoku cieplnego w połączeniu z innymi stosowanymi terapiami w MPS. Uważam, że rozwiązania tego typu mogłyby potencjalnie korzystnie wpłynąć na aktywność enzymów lizosomalnych w MPS, co ma kluczowe znaczenie dla poprawy stanu pacjentów, gdyż nawet niewielki wzrost aktywności deficytowego enzymu może prowadzić do znacznego złagodzenia objawów choroby.

Podczas moich badań zainteresowałam się także zagadnieniem możliwego wpływu czynników genetycznych na zróżnicowanie przebiegu choroby w różnych podtypach tych samych typów MPS. Spośród wszystkich typów MPS, dwa dzielą się na podtypy - MPS III (podtypy A, B, C i D) oraz IV (podtypy A i B). Podział ten nastąpił na podstawie rodzajów defektywnych enzymów co jednak prowadzi do magazynowania tego samego GAG (HS w MPS III i KS w MPS IV).

Najczęstsze objawy choroby Sanfilippo (MPS III) są podobne i obejmują opóźnienie językowe, nieprawidłowe zachowanie, zaburzenia ze spektrum autyzmu, padaczkę i pogrubiałe rysy twarzy. Jednak pomimo tego, że nieprawidłowości poznawcze i behawioralne dominują u wszystkich pacjentów z chorobą Sanfilippo, osoby z różnymi podtypami MPS III różnią się znacząco. Przykładowo zaburzenia ze spektrum autyzmu są obecne u prawie 30% pacjentów z MPS IIIA i tylko 8% pacjentów z MPS IIIC. Padaczka występuje u 17% pacjentów z MPS IIIA i 8% z MPS IIIC. Podobnie objawy, które są charakterystyczne dla większości typów MPS, tj. pogrubione rysy twarzy i hepatomegalia, występują u 94% i 56% pacjentów z MPS IIIB oraz u 85% i 39% pacjentów z MPS IIIC (odpowiednio), co utrudnia rozpoznanie choroby w odpowiednim czasie. Diagnoza może być również utrudniona ze względu na różny czas pojawiania się poszczególnych objawów w różnych podtypach MPS III. Na przykład, średni wiek rozpoznania MPS IIIB wynosi od 2,5 do 5 lat, a MPS IIIC od 4,5 do 19 lat. Długość życia chorych także wykazuje znaczne zróżnicowanie i wynosi ona 15-18 lat dla MPS IIIA, 17-19 lat dla MPS IIIB, 19-34 lat dla MPS IIIC (brak danych dla MPS IIID).

Pacjenci cierpiący na chorobę Morquio zwykle nie mają zaburzeń poznawczych ani behawioralnych, ale manifestacje szkieletowe i łącznotkankowe są szczególnie ciężkie. Należą do nich: niskorosłość, *dysostosis multiplex*, deformacja kręgosłupa i nieprawidłowości zębowe. W przeciwieństwie do podtypów MPS III, w MPS IV zmienność pomiędzy typowym przebiegiem dwóch podtypów choroby jest znacznie mniejsza, choć istnieją też pewne różnice. MPS IVB jest na ogół łagodniejszy niż IVA, co wyraża się zwłaszcza mniejszym nasileniem

deformacji szkieletu i zwiększoną długością życia. Ponadto, w przeciwieństwie do MPS IVA, w IVB mogą wystąpić cechy neuronopatii, choć tylko w nietypowych przypadkach, które mają fenotyp pośredni między MPS IV a gangliozydozą GM1 (choroby te są spowodowane mutacjami w tym samym genie).

Dlatego też celem opisywanej pracy było określenie zmian we wzorze ekspresji genów w komórkach pochodzących od pacjentów ze wszystkimi podtypami choroby Sanfilippo i Morquio, które mogą wskazywać na udział zmian w ekspresji genów w rozwoju różnych objawów u pacjentów.

Analiza wyników transkryptomicznych zobrazowała liczbę transkryptów, które różnią się poziomem ekspresji pomiędzy poszczególnymi podtypami tych samych typów chorobowych. Wskazała ona na znaczną zmienność w MPS III, podczas gdy cecha ta była znacznie mniej wyraźna w MPS IV. Liczba transkryptów o zmienionej ekspresji w niektórych podtypach MPS III, a mianowicie MPS IIIA vs. IIIB, IIIA vs. IIID, IIIB vs. IIID oraz IIIC vs. IIID, wynosiła aż ponad 400. Z kolei liczba transkryptów wykazujących zróżnicowaną ekspresję w MPS IV A vs IVB wynosiła poniżej 100.

W kolejnym kroku przeprowadziłam szczegółową analizę liczby transkryptów o szczególnie wysokich wartościach krotności zmiany poziomu ekspresji. Założyłam, że geny te mogą mieć szczególne znaczenie jako potencjalnie determinujące istotne różnice w fizjologii komórek (a być może i organizmu). Analiza transkryptów ujawniających szczególnie duże różnice w ekspresji, tj. o ponad 16-krotnych zmianach poziomu ekspresji ($\log_2FC > 4$ lub $\log_2FC < -4$), pomiędzy różnymi parami podtypów MPS III wykazała 18 takich transkryptów. Wśród wyodrębnionych genów w największej liczbie znalazły się te, których produkty są związane z funkcjami rybosomów (*RPLP2*, *RPL23*, *RPL10*) oraz prawidłowej struktury tkanki łącznej (*COL4A1*, *COL4A2*, *COMP*). Zmiany w poziomach wymienionych powyżej transkryptów wykryłam pomiędzy różnymi podtypami MPS III, natomiast nie stwierdziłam ich w przypadku MPS IV.

O ile duże zróżnicowanie w ekspresji genów zaangażowanych w zachowanie funkcji tkanki łącznej nie jest zaskakujące, ponieważ było już wielokrotnie wspomniane w kontekście patogenezy MPS, to znaczna liczba genów zaangażowanych w funkcje rybosomów jest nowym odkryciem. Ponieważ rybosomy są kluczowymi organellami zaangażowanymi w ekspresję genów, wyniki te sugerują znaczne zróżnicowanie wydajności syntezy białek w ogóle, co może być kolejną przyczyną różnego przebiegu tych chorób.

Niektóre z wymienionych przeze mnie powyżej genów mogą być zaangażowane w konkretne zaburzenia, które występują w MPS. Jednym z przykładów jest wspomniane już

wielokrotnie spektrum autyzmu które jest powszechne w MPS III. Obniżony poziom ekspresji dwóch genów, *RPL10* i *RPL23*, kodujących białka rybosomalne, wystąpił w MPS IIIA w stosunku do MPS IIIC i IIID. Dysfunkcje syntezy białek były natomiast już wykrywane właśnie w zaburzeniach ze spektrum autyzmu. Co więcej, szczegółowe analizy genu *RPL10* wskazały na obecność mutacji w tym genie u pacjentów autystycznych, a także u pacjentów z innymi zaburzeniami psychicznymi, jak np. mikrocefalia sprzężona z X czy syndromowa niepełnosprawność intelektualna typu X (X-linked). Jest zatem możliwe, że obniżone poziomy ekspresji tych genów, wykryte w MPS IIIA w stosunku do MPS IIIC i IIID, odpowiadają za częstsze występowanie zachowań autystycznych u dzieci z tym podtypem choroby Sanfilippo niż w innych podtypach. Mutacje w genie *RPL10*, prowadzące do rybosomopatii, były również opisywane jako związane z syndromową niepełnosprawnością intelektualną i padaczką. Zatem niższy poziom ekspresji tego genu w MPS IIIA w stosunku do innych podtypów MPS III może również tłumaczyć, w pewnym stopniu bardziej nasilone zdarzenia padaczkowe obserwowane w tym podtypie. Innym przykładem genu związanego z padaczką jest *RARRES2*, kodujący chemerynę, która jest wykrywana we krwi dzieci z idiopatyczną padaczką jako czynnik prognostyczny. W rzeczywistości, ekspresja tego genu jest podwyższona w MPS IIIA w stosunku do chociażby MPS IIID, a padaczka jest znacznie częstsza w pierwszym z wymienionych podtypów niż w drugim.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie analizy transkryptomocne wykazały istotne różnice we wzorcach ekspresji genów pomiędzy różnymi podtypami MPS III. Większość z genów o tak zróżnicowanej ekspresji zaangażowanych jest w procesy utrzymania prawidłowej struktury tkanki łącznej oraz w procesy związane z funkcją rybosomów. O ile nieprawidłowości tkanki łącznej są znaną dysfunkcją w MPS o tyle zaburzenia budowy lub funkcjonowania rybosomów jako czynnik różnicujący przebieg choroby Sanfilippo to stosunkowo nowa myśl badawcza.

Przedstawione powyżej analizy transkryptomocne zawarte są w artykule [Wiśniewska et al. \(2022\) Differences in gene expression patterns, revealed by RNA-seq analysis, between various Sanfilippo and Morquio disease subtypes. *Gene* 812:146090 \(Publikacja nr 8\).](#)

Podczas moich badań nad patogenezą MPS szczególnie zainteresowałam się procesem ferroptozy. Ferroptoza jest jednym z ostatnio opisanych rodzajów śmierci komórkowej, która jest zależna od wielu czynników, w tym akumulacji żelaza i peroksydacji lipidów. Jej indukcja angażuje wiele różnych ścieżek sygnalizacyjnych w komórce. Określenie dokładnych mechanizmów molekularnych prowadzących do indukcji ferroptozy jest jednym z intensywnie badanych zagadnień. Badania te wskazują, że proces ten zależy przede wszystkim od

(i) poziomu żelaza w komórce, (ii) specyficznych szlaków metabolicznych, (iii) szlaku zależnego od GPX4 oraz (iv) poziomu ROS i peroksydacji lipidów albo (v) aktywności kinazy MAP. Dane ostatnich lat przyniosły najnowsze informacje o tym, że ferroptoza może być także regulowana przez proces autofagii (w procesie zwanym ferroptozą zależną od autofagii, *ang. autophagy-dependent ferroptosis*). Autofagia jest ważnym fizjologicznie procesem, który polega na recyklingu błędnie sfałdowanych cząsteczek lub dysfunkcyjnych organelli, tworząc prekursorów nowo syntetyzowanych makrocząsteczek. W procesie tym makrocząsteczka lub organellum zostaje otoczone przez błonę zwaną fagoforem, a następnie zamyka się tworząc autofagosom. Pęcherzyk ten łączy się z lizosomem, a hydrolazy lizosomalne trawią jego zawartość.

Indukcja ferroptozy była dotychczas badana głównie w świetle terapii przeciwnowotworowej. Aktywatory ferroptozy indukują śmierć komórek w różnych rodzajach nowotworów, co jest obiecujące w świetle poszukiwania leków o działaniu antynowotworowym. Jednakże wzmożona ferroptoza została odnotowana w wielu innych chorobach, w tym w chorobach Alzheimer'a i Parkinsona, ostrej niewydolności nerek, uszkodzeniach wątroby i serca, niedokrwinnym uszkodzeniu reperfuzyjnym oraz miażdżycy. Leczenie inhibitorami ferroptozy powodowało zwiększenie przeżywalności modeli komórkowych albo zwierzęcych tych chorób. Rola ferroptozy, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych, jest wciąż słabo poznana i stanowi przedmiot intensywnych badań. Nadaktywacja tego procesu wydaje się pogarszać przebieg wszystkich badanych dotychczas chorób. Z drugiej strony wykazano, że ferroptoza jest wymagana do proliferacji komórek, co może sugerować inną fizjologiczną rolę tego procesu.

Odkryta niedawno zależność ferroptozy od procesu autofagii, w którym uczestniczy układ lizosomalny, zwróciła moją uwagę. Dysfunkcja lizosomów wynikająca z mutacji genów kodujących różne enzymy lizosomalne, obserwowana w MPS, przez które zmianom ulega wydajność autofagii, może wpływać na efektywność ferroptozy, z nieznanymi dotąd konsekwencjami dla funkcji komórek, tkanek i organizmu.

Dlatego postanowiłam przyjrzeć się danym literaturowym dotyczącym markerów procesu ferroptozy w lizosomalnych chorobach spichrzeniowych. Do markerów tych należą przede wszystkim zwiększony poziom żelaza, peroksydacja lipidów lub modulacja aktywności ścieżki GPX4-GSH-Xc⁻. Zmiany w poziomach lub aktywnościach tych markerów zauważono w wielu chorobach z grupy chorób lizosomalnych, między innymi w chorobie Niemann-Picka, chorobie Gauchera, neuronalnej lipofuscynozie ceroidalnej, mukolipidozie, fukozydozie i niektórych typach MPS (głównie typu III).

Doniesienia o zmianach w poziomach/aktywnościach tych markerów pojawiały się w literaturze już od dłuższego czasu, ale dotychczas nie wiązano ich z możliwymi zaburzeniami wydajności ferroptozy. Dopiero dzięki odkryciu szlaków łączących autofagię i ferroptozę, stały się one, po raz kolejny, czynnikami patogenezy tych chorób rozpatrywanymi w nowym aspekcie.

Wszystkie te aspekty, tzn. (i) wyjaśnienie molekularnych szlaków prowadzących do indukcji ferroptozy, (ii) opisanie szlaków łączących ferroptozę oraz autofagię oraz (iii) wskazanie zmian w poziomach/aktywnościach markerów ferroptozy w lizosomalnych chorobach spichrzeniowych (w tym MPS) przedstawiłam w pracy [Pierzynowska et al. \(2021\) Ferroptosis and Its Modulation by Autophagy in Light of the Pathogenesis of Lysosomal Storage Diseases. *Cells* 10\(2\):365 \(Publikacja nr 9\)](#). Warty nadmienienia jest fakt, że w 2021 roku na modelu komórek i myszy MPS I przeprowadziłam wstępne analizy dotyczące wydajności ferroptozy w MPS (w ramach Projektu Młodych Naukowców pt. Rola szlaku Xc/GSH/GPX₄ w zaburzeniach ferroptozy w komórkowym i mysim modelu mukopolisacharydozy typu I), z których wynika, że zarówno poziom żelaza jak i peroksydacja lipidów ulegają obniżeniu w przypadku MPS I, a efekt ten zależny jest od szlaku GPX₄-GSH-Xc⁻ oraz od procesu autofagii. Wyniki te posłużyły jako rezultaty wstępne do projektu grantowego złożonego do Narodowego Centrum Nauki w konkursie Sonata 18 pt. [Molekularny mechanizm zaburzeń ferroptozy w mukopolisacharydozie typu I oraz ich wpływ na przebieg choroby \(2022/47/D/NZ2/03095\)](#). Projekt ten jest obecnie rozpatrywany w II etapie oceny.

Ostatnim z patomechanizmów MPS, którym się zajęłam w ciągu ostatnich lat jest zjawisko stresu oksydacyjnego. Stres oksydacyjny został wykryty w wielu chorobach człowieka. Zaburzenia procesów oksydacyjnych mogą: (i) przyczyniać się do utraty neuronów (w niedokrwieniu mózgu, zaburzeniach napadowych, schizofrenii, chorobie Parkinsona i chorobie Alzheimera), (ii) sprzyjać reakcjom prozakrzepowym (w cukrzycy), (iii) zwiększać poziom utlenionego cholesterolu (w chorobach układu krążenia), (iv) powodować uszkodzenie kłębuszków nerkowych i niedokrwienie nerek (w ostrej i przewlekłej chorobie nerek), (v) indukować reakcje immunologiczne i przewlekły stan zapalny (w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, depresji i nowotworach) oraz (vi) powodować dysfunkcje mitochondriów (wraz z upośledzoną odpowiedzią immunologiczną oraz metabolizmem żelaza i miedzi w autyzmie).

W większości tych chorób nie jest jeszcze jasne, czy zjawisko stresu oksydacyjnego jest wynikiem zaburzonej homeostazy komórek, czy jedną z jej przyczyn. Wiele z tych cech jest również charakterystycznych dla MPS i powszechnie oceniano je jako istotny wkład w neurodegenerację (w MPS I, II, III lub VII), a także rzadziej opisywano jako efekt dysfunkcji

mitochondriów. Jednak doniesienia na temat stresu oksydacyjnego w lizosomalnych chorobach spichrzeniowych są stosunkowo nieliczne.

Dlatego w ostatnim etapie moich dotychczasowych badań zebrałam wszystkie dotychczasowe dane dotyczące markerów stresu oksydacyjnego w MPS. W różnych komórkowych oraz mysich modelach MPS zaobserwowano nie tylko zwiększone ilości ROS lub tlenku azotu (NO) ale także wzrost aktywności oksydazy NADPH, dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy. Zauważono również zwiększoną ekspresję genów zaangażowanych w reakcje oksydacyjne. Co więcej, okazuje się, że podanie niektórych GAG do zdrowych komórek również generuje stres oksydacyjny. Skutkiem tego stresu jest obserwowane nasilenie zjawisk utleniania białek, peroksydacji lipidów oraz utleniania DNA. Nasilenie stresu oksydacyjnego badane było także w próbach klinicznych na modelu MPS IVA, które wskazało na znaczący wzrost aktywności antyoksydantów GPX w erytrocytach wraz ze wzrostem poziomu zredukowanego glutationu (GSH), a także podwyższone poziomy 15-F2t-izoprostanu i 8-OHdG w moczu, wskazujące na zwiększone nasilenie peroksydacji lipidów i uszkodzeń oksydacyjnych DNA.

W ostatniej pracy [Pierzynowska et al. \(2021\) Oxidative Stress in Mucopolysaccharidoses: Pharmacological Implications. *Molecules* 26\(18\):5616](#) (**Publikacja nr 10**) opisałam wszystkie wskazane do tej pory markery stresu oksydacyjnego w MPS. Zrelacjonowałam także wpływ stosowanej ERT i innych terapii opartych na obniżaniu poziomów GAG na te markery. Dużą część pracy poświęciłam na opis stosowanych do tej pory substancji o działaniu antyoksydacyjnym (witaminy C, A, E; retinol; melatonina; genisteina; resweratrol; aspiryna; CoQ10 i selen, a także ekstrakt z *Medicago sativa*) i ich efektywności w łagodzeniu markerów stresu oksydacyjnego, a także wpływie na aspekty kliniczne choroby. W pracy tej dyskutuję także zagadnienie stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego jako przyczyny lub konsekwencji zaburzeń homeostazy komórek w różnych modelach MPS.

Uzyskane przeze mnie wyniki badań przedstawione w ramach mojego osiągnięcia habilitacyjnego oczywiście nie marginalizują kluczowej roli akumulacji GAG w rozwoju MPS, jednak podważają wszystkie hipotezy mówiące o magazynowaniu GAG jako jedynej przyczynie MPS.

Opisane powyżej badania wykonywane były w ramach realizacji projektu grantowego pt. „Zmiany w procesach komórkowych jako kluczowe defekty w patogenezie dziedzicznych chorób metabolicznych z grupy mukopolisacharydoz”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w konkursie Opus, którego byłam współtwórcą i głównym wykonawcą (kierownik projektu: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn).

Podsumowanie

Podsumowując, badania które wykonałam w ciągu ostatnich 3 lat (na przełomie 2020-2023), z których składa się moje osiągnięcie habilitacyjne, wskazują, że:

- a)** regulacja ekspresji genów pozornie nie związanych z metabolizmem GAG może mieć duży wpływ na przebieg MPS;
- b)** szczególnie dużo genów o zmienionej ekspresji w MPS bierze udział w procesach związanych z zachowaniem człowieka, aktywacją komórek, aktywnością proteasomu, homeostazą jonową, sygnalizacją komórkową zależną od receptorów, fałdowaniem białek oraz aktywnością rybosomów;
- c)** geny, na które warto zwrócić uwagę i które mogą modulować przebieg choroby będąc tym samym celem dla przyszłych terapii (wspomagających dla terapii celujących w GAG lub indywidualnych, jeśli same okażą się także normalizować poziom GAG) to w szczególności *OXTR*, *GPER1*, *CLU*, *MFGES*, *MME*;
- d)** dysregulacja ekspresji przedstawionych genów lub wybranych procesów komórkowych może być bezpośrednio związana z określonymi objawami chorobowymi występującymi w MPS co podkreśliłam poprzez porównanie ich ze zmianami ekspresji tych genów w innych schorzeniach, w których te objawy również występują;
- e)** regulacja aktywności proteasomu (a konkretnie obniżenie jego aktywności) może być pomocna przy zachowaniu resztkowej aktywności enzymów lizosomalnych co ma diametralny wpływ na kliniczną postać choroby;
- f)** obniżony poziom białek chaperonowych może być dodatkową przyczyną niepowodzeń stosowanych terapii opartych na dostarczeniu lub syntezie aktywnych enzymów lizosomalnych;
- g)** niektóre białka (w tym przypadku receptory estrogenowy oraz oksytocyny) mogą tworzyć agregaty białkowe po wiązaniu się z GAG w dużych stężeniach, co może upośledzać dodatkowo sygnalizację wewnątrzkomórkową (nigdy wcześniej nie przedstawiono podobnych wyników);
- h)** wydajność procesu ferroptozy oraz stres oksydacyjny są dodatkowymi aspektami patogenezy MPS, którym warto się przyjrzeć.

[4d] Pozostałe osiągnięcia naukowe

Jako że Kandydat do stopnia doktora habilitowanego powinien wykazać się więcej niż jednym osiągnięciem naukowym (art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. 2018 poz. 1668, z późniejszymi zmianami), chciałabym przedstawić dodatkowe dwa cykle publikacji dotyczące poszukiwania nowych markerów oraz strategii terapii chorób neurodegeneracyjnych.

Choroby neurodegeneracyjne stanowią obecnie jeden z największych problemów medycznych. Brak możliwości ich skutecznego leczenia powoduje nie tylko wysoką niepełnosprawność lub śmierć pacjentów, ale także bardzo niekorzystne, wtórne skutki społeczne i ekonomiczne. Jednym z możliwych podejść terapeutycznych w chorobach neurodegeneracyjnych spowodowanych nagromadzeniem nieprawidłowych form białek (około 70% tych chorób) może być aktywacja procesów degradacji tych białek, a szczególną uwagę zwraca się obecnie na aktywację autofagii. Mechanizm działania procesu autofagii przedstawiłam już przy okazji opisu moich badań nad ferroptozą. Poszukiwania związku indukującego autofagię, który byłby jednocześnie skuteczny, bezpieczny w stosowaniu i przekraczałby barierę krew-mózg, doprowadziły do wykonania przeze mnie doświadczeń z wykorzystaniem genisteiny, naturalnie występującego izoflawonu. Wyniki tych badań, przeprowadzonych na modelach dwóch chorób, Alzheimerera i Huntingtona, wyraźnie wskazały na obniżenie poziomu nagromadzonych toksycznych form białek (beta-amyloidu, hiporfosforylowanej formy białka tau oraz zmutowanej huntingtyny) zarówno w kulturach komórkowych, jak i tkankach pobranych od zwierząt. Ponadto testy behawioralne wykazały, że chore zwierzęta leczone genisteiną są nie do odróżnienia od zwierząt zdrowych. Badając molekularny mechanizm działania genisteiny wykazałam, że zjawiska te są zależne od zwiększonej biogenezy i aktywności lizosomów. Moje badania nie tylko wskazują na genisteinę jako potencjalny lek w chorobach Alzheimerera i Huntingtona, ale ponieważ autofagia jest procesem nie wybiórczym, dają nadzieję na rozwój terapii obejmującej całą pulę nieuleczalnych dotąd chorób neurodegeneracyjnych, spowodowanych agregacją białek i innych makrocząsteczek.

Do cyklu artykułów w zakresie tego osiągnięcia przedstawiam:

1. [Pierzynowska K, Gaffke L, Hać A, Mantej J, Niedziałek N, Brokowska J, Węgrzyn G. \(2018\) Correction of Huntington's disease phenotype by genistein-induced autophagy in the cellular model. *Neuromolecular Medicine*, 20:112-123. IF₂₀₁₈: 2.576; MEiN: 35* \(70\)[#]](#)

2. [Pierzynowska K](#), Gaffke L, Cyske Z, Michał Puchalski, Estera Rintz, Michał Bartkowski, Marta Osiadły, Michał Pierzynowski, Jagoda Mantej, Ewa Piotrowska, Węgrzyn G (2018) Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metabolic Brain Disease*, 33:989-1008. IF₂₀₁₈: 2.411; MEiN: 25* (70)[#]
3. [Pierzynowska K](#), Podlacha M, Gaffke L, Majkutewicz I, Mantej J, Węgrzyn A, Osiadły M, Myślińska D, Węgrzyn G (2019) Autophagy-dependent mechanism of genistein-mediated elimination of behavioral and biochemical defects in the rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 148:332-346. IF₂₀₁₉: 4.367; MEiN: 40* (140)[#]
4. [Pierzynowska K](#), Gaffke L, Cyske Z, Węgrzyn G (2019) Genistein induces degradation of mutant huntingtin in fibroblasts from Huntington's disease patients. *Metabolic Brain Disease*, 34:715–720. IF₂₀₁₉: 2.411; MEiN: 25* (70)[#]
5. [Pierzynowska K](#), Gaffke L, Podlacha M, Brokowska J, Węgrzyn G. (2020) Mucopolysaccharidosis and autophagy: controversies on the contribution of the process to the pathogenesis and possible therapeutic applications. *Neuromolecular Medicine*, 22:25-30. IF₂₀₂₀: 2.576; MEiN: 70
6. [Pierzynowska K](#), Kamińska T, Węgrzyn G (2020) One drug to treat many diseases: unlocking the economic trap of rare diseases. *Metabolic Brain Disease*, 35:1237-1240. IF₂₀₂₁: 3.230; MEiN: 70
7. [Pierzynowska K](#), Cyske Z, Gaffke L, Rintz E, Jagoda Mantej, Podlacha M, Wiśniewska K, Żabińska M, Sochocka M, Lorenc P, Bielańska P, Giecewicz I, Węgrzyn G. (2021) Potencjał autofagii indukowanej przez genisteinę w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. *Postępy Biochemii*, 67:117-129. IF₂₀₂₁: -; MEiN: 70

* - Punkty MEiN według wykazu z 2017 roku

- Punkty MEiN według wykazu z 2019 roku

Pierwsze 4 prace z przedstawionego cyklu weszły w skład mojej rozprawy doktorskiej.

Chciałabym nadmienić, że prace te są często cytowane w literaturze:

Publikacja nr 1: **38** cytowań, 23 bez autocytowań (wg Scopus);

Publikacja nr 2: **52** cytowania, 42 bez autocytowań (wg Scopus);

Publikacja nr 3: **57** cytowań, 47 bez autocytowań (wg Scopus);

Publikacja nr 4: **15** cytowań, 10 bez autocytowań (wg Scopus).

W kwestii przedstawionego osiągnięcia naukowego warto dodać, że na początku 2023 roku zakończyłam realizację projektu grantowego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego byłam kierownikiem, pt. „Modulacja poziomu zmutowanej huntingtyny przez genisteinę w mysim modelu choroby Huntingtona oraz jej efekty na rozwój psychomotoryczny zwierząt” (Preludium, NCN). Podczas jego realizacji wykazałam nie tylko wysoką efektywność genisteiny w znoszeniu objawów choroby Huntingtona, ale także, że działanie genisteiny zależne jest od czasu podania (podanie tego izoflawonu przed pojawieniem się objawów u myszy pozwoliło na całkowite nie dopuszczenie do ich pojawienia się), oraz że efekty lecznicze zależne są od płci. Zbadałam także dokładny mechanizm indukcji autofagii przez genisteinę, który zależny jest od szlaku FoxO3a/TFEB. Jako efekt realizacji tego projektu planuję cykl kolejnych co najmniej 4 prac, z czego pierwsza jest właśnie przygotowywana.

Warto również, żebym wspomniała, że efektem prowadzonych badań naukowych w tej tematyce jest patent przyznany przez Urząd Patentowy RP.

Dane patentu:

Węgrzyn G, Gaffke L, [Pierzynowska K](#), Podlacha M, Myślińska D, Majkutewicz I (2021) **Genisteina do zastosowania do leczenia choroby Alzheimerera** (*ang. Genistein and its composition to be used in treatment of Alzheimer disease*)
numer patentu: **237739**, data udzielenia prawa: 17 maja 2021 r.

Dzięki opracowanej przeze mnie terapii eksperymentalnej, opartej na działaniu genisteiny, uzyskałam wiele prestiżowych nagród naukowych. Badaniami tymi zainteresowało się także społeczeństwo, firmy farmaceutyczne oraz media. Nagrody te oraz efekty wspomnianego zainteresowania opisałam w rozdziale [7].

Oprócz wykorzystania procesu autofagii indukowanego przez genisteinę jako nowego podejścia do terapii chorób neurodegeneracyjnych, zajmowałam się zagadnieniem poszukiwania nowych markerów choroby Huntingtona. Ponieważ postęp tej choroby jest zwykle powolny, a pierwsze objawy kliniczne są niespecyficzne, prawidłowe jej rozpoznanie jest trudne. Ponadto, wszelkie próby opracowania terapii wymagają monitorowania jednoznacznych markerów choroby. Pracując z mysimi modelami tej choroby (R6/1 charakteryzującym się łagodniejszym przebiegiem oraz R6/2 charakteryzującym się cięższym przebiegiem) zauważyłam, że sierść myszy ulega znacznemu pogorszeniu wraz z rozwojem choroby, z tym, że w modelu R6/2 zmiany te były bardziej widoczne i pojawiały się szybciej. Pobrane na różnych etapach choroby włosy poddałam dokładniejszemu badaniu przy pomocy

elektronowego mikroskopu skaningowego. Zaobserwowałam specyficzne zmiany w kształcie włosów, strukturze łusek i średnicy włosów i były one nasilone wraz z rozwojem choroby. Badanie to podkreśliło, że morfologia włosów może być użytecznym, nieinwazyjnym i prostym markerem szeroko stosowanych modeli mysich choroby Huntingtona, szczególnie w testowaniu efektów potencjalnych terapii lub progresji choroby.

Byłam zaangażowana także w prace nad zbadaniem biomarkerów biochemicznych we krwi obwodowej, a także związanych z zaburzeniami poznawczymi lub lękowymi, odpowiadających najbardziej charakterystycznym punktom przełomowym w progresji choroby Huntingtona. Na modelu myszy R6/1 opisaliśmy istotne podwyższenie poziomu specyficznych markerów stanu zapalnego (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-12). We wczesnych stadiach choroby widoczne było także upośledzenie przeciwzapalnych mechanizmów obronnych (wyrażone znacznym obniżeniem poziomu IL-10). Zaburzenia te występowały szybciej u samic niż u samców co może przekładać się na szybszą progresję choroby oraz stosunkową gorszą odpowiedź na leczenie. W poszczególnych punktach czasowych zaobserwowaliśmy także upośledzenie pamięci oraz zaburzenia zachowań lękowych.

Wraz z zespołem z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zajmowałam się również badaniem metabolizmu energetycznego i metabolizmu nukleotydów. Na modelu komórek HEK293T transfekowanych plazmidami kodującymi dzikiego typu lub zmutowany wariant huntingtyny wskazaliśmy na zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, zwiększenie aktywności deaminazy adenozy, a także zmniejszenie aktywności ektonukleozydowej difosfohydrolazy trójfosforanowej, ekto-5'-nukleotyduazy oraz deaminazy ektoadenozy. Badanie to podkreśla, że ekspansja zmutowanego wariantu huntingtyny skutkuje zubożeniem komórkowego stężenia ATP i zmniejszeniem tempa rozkładu pozakomórkowych nukleotydów. Dane te mogą wskazywać na kolejną grupę potencjalnych markerów progresji choroby.

Do cyklu artykułów w zakresie tego osiągnięcia przedstawiam:

1. [Toczek M, Pierzynowska K, Kutryb-Zajac B, Gaffke L, Słomińska EM, Węgrzyn G, Smoleński RT \(2018\) Characterization of adenine nucleotide metabolism in the cellular model of Huntington's disease. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 37:630–638. IF₂₀₁₈: 0.768; MEiN: 15* \(40\)#](#)
2. [Pierzynowska K*, Podlacha M, Dorota Łuszczek, Rintz E, Gaffke L, Szczudło Z, Tomczyk M, Smoleński RT, Węgrzyn G. \(2021\) Hair dysmorphology in the R6/1 and R6/2 mouse models of Huntington's disease. *Gene*, 765:145133. IF₂₀₂₁: 3.913; MEiN: 70](#)

3. Podlacha M, [Pierzynowska K](#), Gaffke L, Grażyna Jerzemowska, Piotrowska E, Węgrzyn G. (2022) Behavioral- and blood-based biomarkers for Huntington's disease: Studies on the R6/1 mouse model with prospects for early diagnosis and monitoring of the disease. *Brain, Behavior, and Immunity - Health*, 23:100482. [IF₂₀₂₁: -; MEiN: -](#) (czasopismo powstałe w 2020 roku)

*Autor korespondujący

* - Punkty MEiN według wykazu z 2017 roku

- Punkty MEiN według wykazu z 2019 roku

Do pozostałych aktywności naukowych, którymi się obecnie zajmuje należą także:

- 1) poszukiwanie molekularnych szlaków indukcji autofagii przez genisteinę na modelach choroby Huntingtona (w ramach projektu pt. „Molekularne mechanizmy stymulacji autofagii przez genisteinę oraz jej efekty komórkowe i fizjologiczne w chorobie Huntingtona”, Opus 19, Narodowe Centrum Nauki);
- 2) określenie terapeutycznego potencjału resweratrolu w leczeniu mukopolisacharydoz typu III (w ramach projektu pt. „Mechanizm degradacji glikozoaminoglikanów pod wpływem resweratrolu w mysim modelu neuronopatycznej choroby z grupy mukopolisacharydoz”, Preludium 18, Narodowe Centrum Nauki);
- 3) opracowanie strategii konstrukcji pierwszego na świecie termofilnego systemu „phage display” (w projekcie pt. „Systemy nowej generacji dostarczania molekuł bioaktywnych w syntetyzowanych chemicznie i poddanych inżynierii genetycznej nanobiomateriałach”, TechMatStrateg, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju);
- 4) określenie wydajności procesu autofagii oraz skuteczności genisteiny w eliminowaniu cech choroby w komórkach pobranych od osób z chorobą NBIA [w ramach projektu pt. „Wpływ eksperymentalnej terapii z użyciem modulatorów autofagii, na procesy zapalne w układzie obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym podstawowych odmian NBIA” (PKAN, BPAN, MPAN, PLAN), Fundacja NBIA Polska];
- 5) określenie skuteczności genisteiny w mysim, genetycznie modyfikowanym modelu choroby Alzheimera (w projekcie pt. „Genisteina w chorobie Alzheimera - badania na modelach zwierzęcych”, Fundacja ORLEN);
- 6) ocena skuteczności i bezpieczeństwa terapii fagowej skierowanej przeciwko szczepom *Salmonella* sp. u drobiu (w ramach projektu pt. „Biologiczne badania efektywności i bezpieczeństwa terapii fagowej na modelu zakażeń kurcząt wywołanych szczepami *Salmonella*”, Opus 14, Narodowe Centrum Nauki);

- 7) określenie biologicznych aktywności (antybakteryjnych, przeciwgrzybiczych, przeciwnowotworowych) związków produkowanych przez bakterie z trudno dostępnych środowisk;
- 8) określenie roli wybranych genów w procesie autofagii i zbadanie różnic pomiędzy komórkami drożdżowymi i ludzkimi w tym aspekcie (w ramach współpracy z prof. Andriyem Sibirnym, opis w rozdziale [5]);
- 9) określenie roli zmian w ekspresji genów zaangażowanych w proteostazę podczas indukcji obwodowego stanu zapalnego u myszy (w ramach współpracy z prof. Gregory'm Konatem, opis w rozdziale [5]).

[4e] Dalsze plany badawcze

W rozdziale tym chciałabym krótko przedstawić moje najbliższe plany badawcze. Zagadnienia wskazane w rozdziale 4d będą kontynuowane. Oprócz nich planuję także rozpoczęcie zupełnie nowych wątków badawczych, które dotychczas nie były realizowane.

Wspominałam już o moich zainteresowaniach procesem ferroptozy, a także rolą zaburzeń w jej wydajności w przebiegu MPS. Wyniki wstępne wykonane w ramach realizacji projektu pt. „Rola szlaku Xc/GSH/GPX4 w zaburzeniach ferroptozy w komórkowym i mysim modelu mukopolisacharydozy typu I”, którego byłam kierownikiem, wskazały, że poziomy markerów ferroptozy ulegają obniżeniu w przypadku MPS I. Zagadnienie to wydaje się bardzo interesujące, gdyż we wszystkich znanych dotychczas chorobach obserwowano się raczej wzrost poziomu tych markerów co świadczyło o nasileniu procesu ferroptozy. Tak więc dokładniejsze badania nad tym aspektem nie tylko przyniosą odpowiedzi na pytanie o rolę ferroptozy w przebiegu MPS I ale także mogą wskazać MPS I jako pierwszy model do badania skutków obniżonej wydajności ferroptozy co wydaje się bardzo ważne, gdyż konsekwencje dysregulacji tego procesu jak i jego dokładna rola są jeszcze w fazach badań. Wspomniane rezultaty badań posłużyły jako wyniki wstępne do projektu grantowego złożonego do Narodowego Centrum Nauki w konkursie Sonata 18 (pt. „[Molekularny mechanizm zaburzeń ferroptozy w mukopolisacharydozie typu I oraz ich wpływ na przebieg choroby](#)” [2022/47/D/NZ2/03095]), który jest obecnie rozpatrywany w II etapie oceny. W projekcie tym planuję określić dokładne ścieżki molekularne prowadzące do zjawiska obniżonej efektywności ferroptozy na modelu mysim MPS I, a także określić skutki podania modulatorów ferroptozy na przebieg choroby u gryzoni (zarówno cechy biochemiczne jak i behawioralne). Skupię się także na zbadaniu powiązań pomiędzy procesem autofagii a ferroptozy, badając mechanizmy

ferroptozy zależnej od autofagii (*ang.* autophagy-dependent ferroptosis) co jest stosunkowo nowym zagadnieniem (opisanym po raz pierwszy w 2020 roku).

Bazując na wynikach uzyskanych podczas przygotowywania osiągnięcia habilitacyjnego, wskazujące wybrane geny mogące stanowić cele dla rozwoju przyszłych terapii (**Tabela 3**), postanowiłam zbadać potencjalną efektywność niektórych z takich terapii. Jak wspominałam, na szczególną uwagę w tym aspekcie zasługują geny *OXTR* i *GPER1*, kodujące odpowiednio receptor dla oksytocyny oraz estrogenu, a także geny *MFGE8*, *MME* oraz *CLU*, kodujące odpowiednio laktadherynę, neprylizynę oraz klasterynę.

Wykazany przeze mnie wzrost poziomu receptorów oksytocyny oraz estrogenu, a także tworzenie przez nie agregatów białkowych poprzez interakcje z GAG skłoniły mnie do dokładniejszego zbadania roli tego zjawiska w przebiegu MPS. Na modelach fibroblastów pobranych od pacjentów z MPS I planuję przeprowadzić doświadczenia wskazujące na wpływ podania antagonistów tych receptorów na markery choroby (poziom GAG, morfologia lizosomów, aktywność wybranych enzymów lizosomalnych). W kolejnych etapach (w razie obiecujących wyników badań *in vitro*), związki o działaniu antagonistycznym lub agonistycznym względem *OXTR* i *GPER1* będą podawane myszom MPS I. Podczas tych doświadczeń określony zostanie ich wpływ nie tylko na biochemiczne markery choroby, ale także na zaburzenia behawioralne i stan zapalny. Na badania te złożyłam wniosek grantowy w konkursie [JunG w ramach programu młodych liderów grup badawczych Uniwersytetu Gdańskiego pt. „Modulacja poziomu receptorów estrogenu i oksytocyny jako ważny aspekt patogenezy oraz potencjalny cel terapeutyczny dla mukopolisacharydozy typu I”](#). Wniosek ten jest obecnie rozpatrywany. W badania te zaangażowana jest doktorantka I roku Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UG, nad którą sprawuję opiekę w roli promotora pomocniczego.

Przypatrując się także genom *MFGE8*, *MME* oraz *CLU* oraz ich powiązaniom z akumulacją i transportem β -amyloidu, postanowiłam rozeznąć się bliżej w zagadnieniach jego spichrzania w MPS. Samo zjawisko odkładania się płytek amyloidowych u pacjentów z MPS jest już znane, natomiast mechanizmy, które do niego prowadzą nigdy nie zostały określone. Jak wspominałam uprzednio, wyniki moich dotychczasowych badań wskazujące na wzrost ekspresji genów *MFGE8* i *CLU* oraz spadek ekspresji genu *MME* w komórkach MPS w stosunku do komórek kontrolnych może świadczyć o fakcie, że zaburzenia te w dużym stopniu przyczyniają się do odkładania złogów amyloidowych w MPS. Dlatego poziom ekspresji tych genów, a także poziom amyloidu w różnych tkankach mysich MPS I i MPS IIIB będzie

Tabela 3. Wykaz genów, których zaburzenia ekspresji zaobserwowano w dotychczasowych badaniach i które stanowią nowe cele terapeutyczne dla MPS.

Gen	Produkt białkowy	Powiązane objawy/cechy w MPS	Inne choroby związane z zaburzeniami danego genu z podobnymi objawami	Numery publikacji (zgodnie z pkt [4b])
<i>OXTR</i>	receptor oksytocyny	zaburzenia zachowań społecznych, problemy z komunikacją werbalną i niewerbalną, problemy z koncentracją uwagi, nadpobudliwość, impulsywność, agresja, niestabilność emocjonalna, nadwrażliwość na bodźce zewnętrzne, nietypowe zachowania sensoryczne (głównie gryzienie), niezdolność do rozpoznawania twarzy, zaburzenia prawidłowych zachowań lękowych, zaburzenia rytmu dobowego	zaburzenia ze spektrum autyzmu, depresja, schizofrenia, zaburzenia obsesyjno-kompulsywne, otępienie naczyniopochodne	[1] [5] [6]
		pogrubienie zastawek serca, dysfunkcja i przerost mięśnia sercowego, zajęcie tętnic wieńcowych i innych naczyń krwionośnych	miażdżyca, niewydolność serca, nadciśnienie tętnicze, kardiomiopatia	
		niedobór witaminy D, zmniejszona gęstość mineralna kości	osteoporoza	
<i>GPER1</i>	błonowy receptor estrogenowy	dysfunkcje neuronów (obniżony wzrost neuronów, obniżone poziomy wapnia)	stwardnienie rozsiane, depresja	
		nietolerancja glukozy	cukrzyca, zwiększona wrażliwość na insulinę, zaburzenia transportu glukozy	[5]
		podwyższone ciśnienie krwi, pogrubienie zastawek serca, dysfunkcja i przerost mięśnia sercowego	niewydolność serca, nadciśnienie tętnicze, kardiomiopatia	
		niedobór witaminy D, zmieniona gęstość mineralna kości	choroba zwyrodnieniowa stawów, osteoporoza	
<i>MFGE8</i>	laktadheryna	akumulacja β -amyloidu	choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, udar, urazowe uszkodzenie mózgu	[2]
<i>MME</i>	neprylizyna		choroba Alzheimera	[2]
<i>CLU</i>	klasteryna		choroba Alzheimera	[2] [7]

monitorowany na różnych etapach rozwoju choroby i korelowany z wystąpieniem objawów, głównie wynikających z uszkodzeń układu nerwowego. Ponadto, geny te będą wyciszane (w przypadku tych ze zwiększoną ekspresją) lub nadekspresjonowane (w przypadku tych o obniżonej ekspresji) pojedynczo lub na raz w modelach komórkowych i w takim układzie monitorowane będzie zjawisko akumulacji β -amyloidu. Badania te pozwolą odpowiedzieć na pytanie o dokładną rolę zmian w ekspresji tych trzech genów w odkładaniu amyloidu i związanej z nim neurodegeneracji w modelach MPS. Na badania te złożony zostanie wniosek grantowy do Narodowego Centrum Nauki w najbliższym konkursie Preludium przez Doktorantkę III roku Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UG, nad którą sprawuje opiekę w roli promotora pomocniczego.

Poszukiwanie nowych strategii terapii dla MPS chciałabym rozszerzyć także o zupełnie nową grupę związków, które jeszcze nigdy nie były testowane w tych schorzeniach. Do tej pory potencjalnych terapeutyków poszukiwałam wśród związków (i) obniżających wydajność syntezy GAG (co doprowadziło do pierwszych badań z wykorzystaniem genisteiny) lub (ii) indukujących autofagię usuwającą nadmiar GAG (co doprowadziło do badań z wykorzystaniem resweratrolu, kurkuminy, trehalozy i innych). Wśród takich związków następnie selekcjonowałam te, które charakteryzują się bezpieczeństwem dla komórek (brak obniżania ich przeżywalności) oraz przekraczaniem bariery krew-mózg. Po uwzględnieniu tych wszystkich kryteriów, liczba takich związków ostatecznie pozostawała niewielka. Postanowiłam podejść do tego problemu w inny sposób i już na wstępie skorzystać z listy związków, które znane są ze zdolności do przekraczania bariery krew-mózg, a konkretnie z selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) stosowanych głównie w leczeniu depresji, fobii, zaburzeń lękowych i natręctw. Związki te (citalopram, escitalopram, fluoksetyna, dapoksetyna, paroksetyna, sertralina) w pierwszym etapie badań będą testowane pod względem bezpieczeństwa dla komórek MPS. W drugim etapie będzie określana ich zdolność do obniżania poziomu GAG oraz niwelowania innych cech choroby (ze szczególnym uwzględnieniem zmian morfologii i aktywności lizosomów). W przypadku znalezienia cząsteczki charakteryzującej się pożądanymi cechami, badania będą kontynuowane na modelu zwierzęcym. Projekt pt. „Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny jako nowe związki terapeutyczne dla mukopolisacharydoz” (1220/227/2023), na który otrzymałam dofinansowanie w Programie Małych Grantów Uniwersytetu Gdańskiego (UGrants-START 3) rozpocznę w maju tego roku.

[5] Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Moją dotychczasową działalność badawczą prowadziłam w kilku uczelniach i instytucjach naukowych. Większość moich publikacji powstała dzięki mojej pracy na Uniwersytecie Gdańskim, niemniej istotną aktywność naukową prowadziłam również na Uniwersytecie Zachodniej Wirginii w Morgantown (USA), w Instytucie Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk we Lwowie (Ukraina) oraz na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Moje osiągnięcia naukowe powstałe w wyniku badań przeprowadzonych wyłącznie na Uniwersytecie Gdańskim opisałem w innych rozdziałach Autoreferatu (rozdziały 4c, 4d), natomiast poniżej skupię się na opisie badań przeprowadzonych w innych jednostkach naukowych.

Od grudnia 2016 roku, kiedy to odbyłam (wraz z ówczesnym promotorem mojej rozprawy doktorskiej, prof. Grzegorzem Węgrzynem) moją pierwszą wizytę we Lwowie, w Instytucie Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk, prowadzę badania we współpracy z grupą prof. Andriya Sibirnego. Współpraca ta dotyczy w szczególności badania procesu autofagii. Co ciekawe, prof. Sibirny prowadzi badania na modelu drożdżowym, podczas gdy ja używam głównie modeli komórek ludzkich. Ponieważ jednak proces autofagii jest silnie konserwowany w ewolucji, homologiczne białka biorą w nim udział nawet w tak odległych taksonomicznie organizmach. W kolejnych latach odbyłam kilka wizyt (1-2 tygodniowych) we Lwowie, a współpraca z grupą prof. Sibirnego nabrała jeszcze większego tempa po przyznaniu grantu na wspólne badania przez NAWA ([projekt pt. „Identification of genes involved in autophagic degradation of soluble proteins in yeast and human cells”, 2019-2022](#)). Realizowany wspólnie projekt doprowadził do bardzo ciekawego odkrycia, mianowicie stwierdzenia, że gen drożdży *Komagataella phaffii*, nazwany przez nas *ACG1* i kodujący β -1,6-N-acetylglikozaaminylotransferazę, pełni istotną rolę w zależnej od autofagii degradacji białek cytoplazmatycznych i peroksysomalnych. Zjawisko to jest o tyle fascynujące, że w procesie autofagii degradowane są głównie agregaty białkowe, inne makrocząsteczki o nieprawidłowej strukturze oraz produkty rozkładu uszkodzonych organelli komórkowych. Degradacja rozpuszczalnych białek cytoplazmatycznych na drodze autofagii jest dotąd bardzo słabo poznanym procesem, zatem nasze odkrycie ma istotne znaczenie w zrozumieniu mechanizmu tego zjawiska. Co ciekawe, w genomie ludzkim są trzy geny kodujące białka podobne do produktu genu *ACG1*. Są to geny *GCNT2*, *MGAT5* oraz *SPI*. Poprzez zastosowanie siRNA,

wyciszyliśmy ekspresję każdego z tych genów w komórkach ludzkich, jednak nie dało to widocznych efektów na efektywność procesu autofagii. Wytlumaczeniem tych wyników może być albo brak analogicznego procesu w komórkach ludzkich, w porównaniu do drożdży, albo możliwość wzajemnego zastępowania funkcji genów *GCNT2*, *MGAT5* oraz *SPI* – być może dopiero inaktywacja wszystkich trzech genów mogłaby skutkować upośledzeniem procesu autofagii. Planuję testowanie tej drugiej z przedstawionych hipotez w ramach moich dalszych prac badawczych. Opisane wyżej wyniki badań zostały opisane w artykule opublikowanym ostatnio w czasopiśmie *Yeast* (Zazulya et al. (2023) [The Komagatella phaffii ACG1 gene, encoding \$\beta\$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, is involved in the autophagy of cytosolic and peroxisomal proteins.](#) *Yeast*, doi: 10.1002/yea.3846). Ze względu na prowadzenie prac badawczych zarówno na Uniwersytecie Gdańskim jak i w Instytucie Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk, w artykule tym przypisane są mi afiliacje obu tych jednostek naukowych.

W roku 2019 odbyłam także miesięczny staż naukowy w Uniwersytecie Zachodniej Wirginii (West Virginia University) w Morgantown (USA), dzięki funduszom uzyskanym z Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA, program Prom). Pracowałam tam w grupie, którą kierował prof. Gregory Konat. Na wyżej wymienionej uczelni prowadziłam prace badawcze w Zakładzie Biochemii (Department of Biochemistry), Zakładzie Neurobiologii (Department of Neuroscience) oraz w Instytucie Neurobiologii im. B. Rockefeller (Rockefeller Neuroscience Institute). Miałam tam możliwość zapoznania się z ciekawym zwierzęcym modelem badawczym imitującym obwodowe zakażenie wirusowe oraz jego wpływ na funkcje ośrodkowego układu nerwowego. Prof. Gregory Konat opracował ten model z wykorzystaniem dootrzewnowego podania myszom kwasu poli-inozylo-cytydynowego (kwasu rybonukleinowego poli(IC), w skrócie PIC). Warunki takie wywołują u myszy objawy analogiczne jak obwodowe zakażenie wirusowe. Model ten umożliwia badanie wpływu takiej „infekcji” na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego, jeśli analizuje się procesy zachodzące w mózgu oraz zachowanie zwierząt. Prof. Konat zaobserwował także, że podanie PIC myszom z chorobami neurodegeneracyjnymi (np. z chorobą Alzheimera) nie tylko indukuje poważnie stan zapalny w organizmie, ale również prowadzi do zaostrzenia objawów tych chorób (motorycznych lub kognitywnych). Zapalenie nerwów, aktywacja szlaków prowadzących do apoptozy i aktywacji układu dopełniacza, a także podwyższone stężenie glutaminianu to obecnie najczęściej wymieniane mechanizmy indukowane przez PIC, które mogą prowadzić do rozwoju objawów psychomotorycznych zaostrzających stan chorobowy. Celem mojej pracy było określenie czy inne podstawowe procesy komórkowe są aktywowane

przez PIC, a jeśli tak, to czy mogą przyczyniać się do rozwoju objawów nasilających odpowiedź mózgową w przypadku infekcji obwodowych.

W przypadku współpracy, którą prowadziłam z prof. Konatem i jego zespołem wykorzystywałam moje doświadczenia z badań transkryptomicznych. U myszy po dootrzewnowym podaniu PIC badany był poziom ekspresji genów w hipokampie w różnych odstępach czasu. Przeprowadziłam analizy transkryptomów, stwierdzając występowanie po podaniu PIC licznych zmian w ekspresji genów odpowiadających za proteostazę (w procesach związanych z funkcjami białek chaperonowych lub działaniem proteasomu). Dodanie zaburzeń proteostazy jako kolejnego mechanizmu towarzyszącego indukcji obwodowego stanu zapalnego pozwala lepiej zrozumieć obserwowane wcześniej efekty neuronopatyczne występujące po zakażeniach wirusowych. Ponieważ analizy transkryptomiczne są długotrwałe, manuskrypt opisujący uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski jest aktualnie przygotowywany do wysłania do redakcji międzynarodowego czasopisma naukowego.

Model, nad którym pracowałam w laboratorium prof. Konata wydaje mi się szczególnie ciekawy w kontekście moich badań nad wykorzystaniem genisteiny w terapii chorób neurodegeneracyjnych z uwagi na jej zdolność do usuwania przyczyn tych chorób (w postaci agregatów białkowych z komórek nerwowych) ale także z uwagi na jej właściwości przeciwzapalne. Wykorzystanie tego modelu do badań nad genisteiną jako lekiem na takie choroby także w przypadku stanów zaostrzonych reakcjami zapalnymi mogłoby przynieść niezwykle ciekawe wyniki badań. Doświadczenia takie planujemy wykonać w ramach dalszej współpracy.

Od kilku lat współpracuję także z grupą kierowaną przez prof. R. Tomasza Smoleńskiego z Zakładu Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Współpraca ta rozpoczęła się wraz z otrzymaniem przeze mnie grantu badawczego z Narodowego Centrum Nauki (projekt pt. „Modulacja poziomu zmutowanej huntingtyny przez genisteinę w mysim modelu choroby Huntingtona oraz jej efekty na rozwój psychomotoryczny zwierząt”, 2018-2023), który zakładał prace na mysim modelu choroby Huntingtona R6/1, którym to modelem zainteresowała się także dr Marta Tomczyk, adiunkt z zespołu prof. R. Tomasza Smoleńskiego. Nasze wspólne zainteresowania naukowe dotyczą molekularnych mechanizmów choroby Huntingtona oraz poszukiwania potencjalnych metod jej leczenia. We wspomnianej wyżej jednostce odbyłam staż naukowy na przełomie 2017 i 2018 roku, prowadząc prace właśnie z wykorzystaniem mysich modeli choroby Huntingtona.

Dane literaturowe dotyczące mechanizmów prowadzących do choroby Huntingtona wskazują na pogorszenie metabolizmu energetycznego nie tylko w zaawansowanych stadiach

choroby, ale także w okresie przedobjawowym. Można sugerować więc, że deficyt energetyczny jest prawdopodobnie wczesnym zjawiskiem w kaskadzie zdarzeń prowadzących do patogenezy tego schorzenia. Strategie terapii korygujące zaburzone poziomy ATP mogłyby być interesujące w kontekście wspomagania terapii celowanych w bezpośrednie przyczyny choroby. Alternatywą do zastosowania koenzymu Q10 lub kreatyniny w tym aspekcie jest użycie agonistów receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR), które przeszły już badania przedkliniczne w leczeniu chorób OUN, układu krążenia oraz mięśni szkieletowych.

Celem moich tamtejszych badań we współpracy z zespołem prof. R. T. Smoleńskiego było zbadanie wpływu rosiglitazonu, jednego z agonistów PPAR- γ , na siłę uchwytu i czynności serca w mysim modelu R6/1. Zauważyliśmy, że leczenie rosiglitazonem prowadzi do poprawy siły uchwytu myszy R6/1 i funkcji mechanicznej serca. Towarzyszyło temu zwiększenie całkowitej puli nukleotydów adeninowych, zwiększone utlenianie glukozy, zmiany liczby mitochondriów oraz zmniejszenie aktywności kompleksu mitochondrialnego I. Poprawa w zakresie niedoboru energii u myszy występowała po podaniu rosiglitazonu i można ją było zmierzyć jako zmniejszoną akumulację katabolitów nukleotydów w surowicy krwi myszy. Wraz ze współpracownikami zasugerowaliśmy zatem, że potencjalne leczenie rosiglitazonem mogłoby złagodzić kardiopatię i miopatię w chorobie Huntingtona, głównie poprzez poprawę energetyki komórkowej. Wyniki tych badań zostały opublikowane ([Tomczyk et al. Rosiglitazone Ameliorates Cardiac and Skeletal Muscle Dysfunction by Correction of Energetics in Huntington's Disease. *Cells* 2022, 11: 2662, doi: 10.3390/cells11172662](#)). W związku z moją pracą wykonywaną w ramach tych badań zarówno na Uniwersytecie Gdańskim jak i w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, w artykule tym przypisane są mi afiliacje obu tych jednostek naukowych.

[6] Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

[6a] Informacja o osiągnięciach dydaktycznych

Od rozpoczęcia studiów doktoranckich (2015) aktywnie prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów z kierunków: Biologia, Biologia medyczna, Bioinformatyka, Genetyka i biologia eksperymentalna na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Prowadziłam następujące kursy:

- 1) biologia komórki (kierunek: Biologia, Bioinformatyka);
- 2) diagnostyka molekularna (kierunek: Biologia medyczna);
- 3) biologia molekularna z biotechnologią (kierunek: Biologia);
- 4) biologia molekularna Eukaryota (kierunek: Biologia medyczna);
- 5) neurofizjologia molekularna (kierunek: Genetyka i biologia eksperymentalna);
- 6) seminarium (kierunek: Biologia, Biologia medyczna, Genetyka i biologia eksperymentalna);
- 7) pracownia dyplomowa (kierunek: Biologia, Biologia medyczna, Bioinformatyka, Genetyka i biologia eksperymentalna).

Moja fascynacja środowiskiem akademickim rozpoczęła się we wczesnym dzieciństwie, kiedy tata (ówczesny pracownik Politechniki Gdańskiej) zabierał mnie na swoje wykłady. Od tamtego czasu moją karierę zawodową z całą pewnością wiązałam z dydaktyką akademicką. Już od pierwszego roku studiów doktoranckich opiekowałam się studentami wykonującymi prace dyplomowe lub uczestnikami wymian międzynarodowych takich jak Erasmus, Erasmus+ i inne (w okresie wakacyjnym).

Już na początku moich studiów doktoranckich, dwie studentki nad którymi sprawowałam bezpośrednią opiekę uzyskały I nagrodę za najlepszą prezentację podczas *I Ogólnopolskiej Neurobiologicznej Konferencji Naukowej „Neuron”* (2-3.12.2016, Lublin, Polska). Rok później kolejna studentka, z którą pracowałam uzyskała I nagrodę za poster przedstawiający wyniki pracy dyplomowej w wewnętrznym konkursie Wydziału Biologii UG (2017). Sprawowałam także opiekę nad studentką, która przyjechała na wymianę akademicką z University of Houston Downtown, Texas, USA, którą zaangażowałam w badania nad zaburzeniami cytoszkieletu w mukopolisacharydozie typu III. Studentka ta po powrocie do Houston otrzymała I nagrodę za najlepszy komunikat konferencyjny (Lopez-Lugo S, Pierzynowska K, Gaffke L, Węgrzyn G: Changes in the cytoskeleton of mucopolysaccharidosis [MPS] patients. *Molecular Basis of Infectious Diseases Retreat*, 23.02.2018, Houston, Texas).

Był to też czas, kiedy byłam niezwykle zaangażowana w prace koła naukowego „Molekuła” działającego przy Katedrze Biologii Molekularnej, w której pracuję. Zaangażowałam grupę studentów w prace nad zbadaniem wpływu popularnie spożywanych napojów na indukcję produkcji toksyny Shiga w enterokrwotocznych szczepach *Escherichia coli*. Niespodziewanie wyniki tego małego projektu wskazały, że niektóre składniki mrożonej herbaty mogą indukować produkcję toksyny Shiga. Było to na tyle interesujące odkrycie, że dane te zostały opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie (ze współautorstwem studentów): Pierzynowska K, Bunikowska M, Droczek R, Jasińska W, Cyske Z, Węgrzyn G (2018) Effects of some commonly used drinks on induction of Shiga toxin-converting prophage

in *Escherichia coli*. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 13:125–129. Co więcej, projekt ten został zgłoszony w ogólnopolskim konkursie StRuNa (Studencki Ruch Naukowy) w kategorii: Projekt Roku, w którym po zaprezentowaniu wyników badań zajął I miejsce (18.11.2018, Warszawa, Polska).

Od 2020 roku posiadam uprawnienia do prowadzenia prac dyplomowych (w roli promotora). Od tego czasu wypromowałam **5 licencjatów** i **5 magistrów**. Poniżej przedstawiam tematy prac dyplomowych studentów realizowane pod moją opieką:

- 1) „Wpływ obecnie stosowanych terapii dla mukopolisacharydoz na poziom receptora estrogenowego (GPER1) w chorobach Hurler i Huntera” – licencjat, data obrony: 15.07.2020;
- 2) „Zmiany w poziomie receptora oksytocyny (OXTR) jako dodatkowy aspekt patogenezy oraz potencjalny marker efektywności terapii w mukopolisacharydozie typu I i II” – licencjat, data obrony: 15.07.2020;
- 3) „Zaburzenia metabolizmu komórek ze szczególnym uwzględnieniem procesu autofagii jako dodatkowy czynnik patogenezy mukopolisacharydoz” – praca magisterska, data obrony: 15.07.2020;
- 4) „Zmiany w obrębie budowy i funkcji proteasomu jako nieznany aspekt patogenezy mukopolisacharydoz: badania transkryptomiczne i komórkowe” – praca magisterska, data obrony: 21.09.2020;
- 5) „Wpływ ekstraktów izolowanych z bakterii jaskiniowych na żywotność i proliferację komórek raka piersi” – licencjat, data obrony: 13.07.2021;
- 6) „Zaburzenia wydajności transportu pęcherzykowego jako nowy aspekt patogenezy mukopolisacharydoz: dane transkryptomiczne i komórkowe” – praca magisterska, data obrony: 13.07.2021;
- 7) „Zaburzenia modyfikacji DNA ze szczególnym uwzględnieniem procesu metylacji w świetle patogenezy mukopolisacharydoz” – praca magisterska, data obrony: 13.07.2021;
- 8) „Zaburzenia gospodarki jonowej w mukopolisacharydozach jako jeden z aspektów patogenezy oraz potencjalny cel terapii tych schorzeń” – praca magisterska, data obrony: 13.07.2021;
- 9) „Analiza transkryptomiczna zmian w wydajności wybranych procesów komórkowych w hipokampie myszy po wywołaniu stanu zapalnego przy pomocy poliinozyno-policytydyny (PIC)” – praca magisterska, data obrony: 08.07.2022;
- 10) „Zaburzenia poziomu białek opiekuńczych jako jeden z aspektów patogenezy mukopolisacharydoz: badania komórkowe i transkryptomiczne” – praca magisterska, data obrony: 08.07.2022.

Studenci Ci aktywnie uczestniczyli/uczestniczą w realizacji badań naukowych oraz są współautorami publikacji w międzynarodowych czasopismach co przyniosło im wielokrotnie stypendia Wydziału Biologii UG za osiągnięcia naukowe, a niektórym także inne nagrody naukowe:

- 1) Nagroda Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcia naukowe w roku 2020, 2021 (trzech studentów);
- 2) Stypendium Ministra Edukacji i Nauki za wybitne osiągnięcia naukowe w roku 2021 (dwie studentki);
- 3) Stypendium Miasta Sopotu za osiągnięcia naukowe w roku 2022 (jedna studentka).

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w 2023 roku jedna ze studentek realizująca badania w ramach pracy magisterskiej pod moją opieką otrzymała finansowanie na grant badawczy w programie Ministra Edukacji i Nauki „Perły Nauki”. W projekcie tym poszukiwać będzie związków o aktywnościach antybakteryjnych, przeciwgrzybiczych i antynowotworowych produkowanych przez nowo wyizolowane szczepy bakteryjne z rodzaju *Streptomyces*, pozyskane z jaskiń ze Szczeliny Chochołowskiej. Studentka ta aplikować będzie w tym roku do Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Gdańskiego, a swój projekt badawczy realizowała będzie w ramach pracy doktorskiej.

Pełnię także funkcję promotora pomocniczego dwóch prac doktorskich, które są w trakcie realizacji (jedna od 2020 roku, a druga od 2022 roku).

[6b] Informacja o osiągnięciach organizacyjnych

Będąc jeszcze studentką studiów magisterskich zaczęłam angażować się w organizację wydarzeń naukowych. Uczestniczyłam w organizacji konferencji międzynarodowych będąc członkiem komitetu organizacyjnego lub naukowego:

1. Frontiers in Cancer Prevention: Fulfilled Promises, Translational Challenges and Future Directions, 2015, Gdańsk, Polska;
2. 7th International Weigl Conference, 2017, Lwów, Ukraina;
3. 4th Congress of Baltic Microbiologists, 2018, Gdańsk, Polska;
4. International Sopot Youth Conference entitled ‘Where the world is heading’?, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, Sopot, Polska.

W roli przewodniczącej komitetu organizacyjnego zorganizowałam także II Konferencję Doktorantów Pomorza BioMed Session 2018, Gdańsk, Polska.

Jeszcze podczas studiów doktoranckich rozpoczęłam pracę nad recenzowaniem artykułów wysłanych do międzynarodowych czasopism naukowych. Od tego czasu wykonałam

około 100 takich recenzji (dla czasopism *Acta Biochimica Polonica*, *Metabolic Brain Disease*, *International Journal of Molecular Science*, *Molecules*, *Medical Science Monitor*, *Scientific Reports*, *Gene Reports*, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*). Recenzowałam także projekty grantowe złożone w konkursie na finansowanie badań Fundacji Cure Sanfilippo (Cure Sanfilippo Foundation, Columbia, USA) finansującej projekty naukowe w zakresie poszukiwania terapii choroby Sanfilippo (2022) oraz złożone w ramach subwencji Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (2023). W roli członka zespołu oceniającego brałam także udział w konkursach na najlepsze komunikaty konferencyjne przedstawione w ramach konferencji *International Sopot Youth Conference 'Where the world is heading?' (2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022)* organizowanej przez Instytut Oceanologii PAN w Sopocie oraz *27th International Student Scientific Conference (w sesji „Basic Science”)* organizowanej przez Gdański Uniwersytet Medyczny (2022). Jako laureatka międzynarodowej nagrody Future Science Future Star Award z 2021 roku finansowanej przez wydawnictwo „Future Science” i czasopismo „BioTechniques”, rok później zostałam członkiem kapituły oceniającej wnioski nominowane do tej samej nagrody.

Od czasu przyznania mi stopnia doktora (2020) zostałam także redaktorem trzech międzynarodowych czasopism naukowych (*Acta Biochimica Polonica*, *BMC Research Notes* oraz *Metabolic Brain Disease*). Czterokrotnie pełniłam też funkcję redaktora numeru specjalnego:

1. *Frontiers in Molecular Bioscience* ‘Molecular Aspects of Mucopolysaccharidoses’ (2021-2022);
2. *Molecules* ‘Hunting of Huntington's Disease’ (2022-2023);
3. *International Journal of Molecular Science* ‘Molecular Pathogenesis and Therapeutic Strategies of Lysosomal Storage Diseases’ (2023);
4. *Frontiers in Molecular Bioscience* ‘Molecular Aspects of Mucopolysaccharidoses – Volume II’ (2023).

Pełniłam/pełnię również różne funkcje na Wydziale Biologii UG, w którym jestem zatrudniona:

1. Członkini Rady Dziekana jako przedstawiciel pracowników niesamodzielnych na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (2020-2021);
2. Członkini Rady Wydziału jako przedstawiciel pracowników niesamodzielnych na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (od 2021 do teraz);
3. Kierownik Sekcji Promocji Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (2020-2023);

4. Członek Komisji ds. Planu Naprawczego powołanej przez Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (od 2023 do teraz).

Od 2018 roku jestem też członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

[6c] Informacja o aktywnościach popularyzujących naukę

Na I roku studiów licencjackich zostałam członkiem Studenckiego Koła Biochemicznego działającego przy Katedrze Biochemii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Dzięki temu jeszcze podczas studiów brałam udział w wielu imprezach popularyzujących naukę. Łącznie przeprowadziłam około 200 pokazów, warsztatów i wykładów w ramach wydarzeń takich jak Dni Mózgu, Krwawy Piątek, Bałtycki Festiwal Nauki, Piknik na zdrowie (2011-2023).

Jako że jeszcze na studiach magisterskich zostałam mamą, to szczególnie polubiłam pracę z najmłodszymi dziećmi. Z tego powodu w 2016 roku opracowałam cykl zajęć dla najmłodszych dzieci (na etapie przedszkolnym lub wczesnoszkolnym). Zajęcia te obejmowały zakres różnych ciekawych zagadnień biologicznych z zakresu anatomii człowieka, mikrobiologii, neurobiologii, biochemii, zoologii (przykładowe tytuły zajęć: *Mózg 3D*; *Czy każdy cukier jest słodki?*; *O czym mówią nam kości?*; *Czy mydło zabija drobnoustroje?*). Realizując cykl zajęć na stałe współpracuję z przedszkolami i szkołami z Gdańska. Przy okazji tych warsztatów, dzieciom ze szkoły podstawowej przedstawiam także zagadnienia dotyczące pracy naukowca, projektowania doświadczeń naukowych, stawiania hipotez i ich weryfikacji i wiele innych związanych z prowadzeniem badań naukowych.

W 2018 roku brałam również udział w kampanii promującej środowisko Uniwersytetu Gdańskiego „Odkryj z nami swoje super-moce” zachęcającej do podjęcia studiów na tej uczelni. Ponadto, w ramach Dnia Nauki Polskiej (19.02.2021) Centrum Hevelianum postanowiło zaprezentować dokonania młodych naukowców z trójmiejskich uczelni (po jednym reprezentancie z Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Politechniki Gdańskiej). Jako reprezentantka Uniwersytetu Gdańskiego udzieliłam wywiadu dotyczącego prowadzonych przeze mnie badań i planów na przyszłość a także opowiadałam jak wyglądają studia na tej uczelni w praktyce. Podobnie, 24.10.2021 wygłosiłam wykład pt. „Historia prostej cząsteczki: w poszukiwaniu nowych terapii chorób człowieka” w ramach cyklu wykładów popularnonaukowych Science Cafe organizowanych przez Centrum Nauki Experiment w Gdyni. Instytucja ta w ramach Międzynarodowego Dnia Kobiet i Dziewcząt w Nauce umieściła mnie na liście 6 polskich naukowczyń, które wniosły niepodważalny wkład w rozwój światowej nauki (11.02.2022).

W ramach popularyzacji nauki zostałam także zaproszona do udzielenia trzech wywiadów, w których przystępnym językiem opowiadałam o patomechanizmach oraz możliwościach leczenia chorób neurodegeneracyjnych. Wywiady te opublikowano na niektórych kanałach internetowych m. in. „Możliwe - program o pasji i realizacji marzeń z pozorów niemożliwych”, „Euroimmun Polska” oraz „Health Project Management”.

[7] Inne istotne informacje dotyczące kariery zawodowej.

Jak wspominałam, podczas badań wykonywanych w ramach mojej pracy doktorskiej opracowałam eksperymentalną terapię chorób neurodegeneracyjnych z użyciem genisteiny. Badania te kontynuuję do teraz, określając najefektywniejszy czas podania (w ramach projektu pt. „Modulacja poziomu zmutowanej huntingtyny przez genisteinę w mysim modelu choroby Huntingtona oraz jej efekty na rozwój psychomotoryczny zwierząt”, Preludium 13, Narodowe Centrum Nauki) oraz badając dokładne mechanizmy indukcji autofagii przez genisteinę (w ramach projektu pt. „Molekularne mechanizmy stymulacji autofagii przez genisteinę oraz jej efekty komórkowe i fizjologiczne w chorobie Huntingtona”, Opus 19, Narodowe Centrum Nauki). Jeszcze pod koniec studiów doktoranckich zaangażowałam się także w badanie mechanizmów patogenezы MPS co poskutkowało intensywnymi pracami nad projektem pt. „Zmiany w procesach komórkowych jako kluczowe defekty w patogenezie dziedzicznych chorób metabolicznych z grupy mukopolisacharydoz” (Opus 13, Narodowe Centrum Nauki) czego skutkiem jest powstanie przedstawionego osiągnięcia habilitacyjnego.

Badania te spotkały się z dużym odzewem ze strony społeczeństwa oraz ze strony firm farmaceutycznych, chcących nawiązać współpracę w zakresie finansowania i przeprowadzenia badań z udziałem pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi. Były to między Pfitzer i GlaxoSmithKline. Projekt dotyczący wykorzystania genisteiny w leczeniu choroby Alzheimera, był jednym z 6 projektów z Polski, którymi firma Pfitzer wyraziła zainteresowanie.

Wyniki moich badań nad poszukiwaniem patomechanizmów i nowych strategii terapii chorób genetycznych i neurodegeneracyjnych zostały docenione przez wiele gremiów naukowych. Otrzymałam za nie około 10 nagród za najlepsze komunikaty na konferencjach naukowych, a także wiele stypendiów. Listę najważniejszych przedstawiam poniżej:

1. Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla doktorantów za wybitne osiągnięcia naukowe w roku 2018/2019;
2. Nagroda Oddziału Gdańskiego Polskiej Akademii Nauk za najlepszą pracę oryginalną opublikowaną w 2018 roku w kategorii nauk medycznych, 14.06.2019, Gdańsk, Polska;

3. Stypendium 19. Edycji programu L’Oreal-UNESCO dla Kobiet i Nauki, 10.10.2019, Warszawa, Polska;
4. Nagroda Miasta Gdańska im. Jana Uphagena dla młodych naukowców za wybitne osiągnięcia naukowe, 04.03.2020, Gdańsk, Polska;
5. Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, 12.05.2020, Warszawa, Polska;
6. Międzynarodowa nagroda Future Science: Future Star organizowana przez wydawnictwo „Future Science” i czasopismo „BioTechniques”, 06.10.2021, USA.

Dzięki otrzymanym nagrodom zostałam zaproszona do udzielenia wielu wywiadów, w których opowiadałam o patomechanizmach chorób neurodegeneracyjnych oraz nowych możliwościach ich leczenia (Dzień Dobry TVN, TVN24, Dzień Dobry Tu Gdańsk TVP3, Radio Dla Ciebie i wiele innych). Na temat wyników moich doświadczeń powstało także około 20 artykułów internetowych (m. in. na portalach wp.pl; nauka.trójmiasto.pl; gdansk.pl; perspektywy.pl; prestiż.trojmiasto.pl) oraz parę materiałów telewizyjnych (dla tvn24 oraz gdansk.tvp). Odnośniki do wybranych wywiadów oraz materiałów telewizyjnych stanowią Załącznik 9 do wniosku.

Za swoją działalność naukową znalazłam się na liście **100 Kobiet Roku 2021** według rankingu Forbes Woman, a moje zdjęcie trafiło na okładkę. Docenił mnie także miesięcznik Zawsze Pomorze umieszczając moje nazwisko na liście **10 pomorzan roku 2021**, co jest wyróżnieniem przyznawanym osobom z największym wpływem na rozwój Pomorza. Otrzymałam także tytuł „Kobiety Charyzmatycznej” w kategorii: Kobieta w nauce i edukacji według „WHY” Media Group oraz magazynu WHY STORY (2021) oraz zostałam nominowana do nagrody serwisu WP Kobieta w plebiscycie #Wszechmocne w kategorii: Nauka (2022).

Dużą przygodą było zaproszenie mnie do jednego z odcinków „**Inspirujących Kobiet**”, programu prowadzonego przez Dorotę Wellman dla TVN Style, prezentującego tematykę osiągnięć kobiet w Polsce. Odcinek ten, w którym opowiadałam o mojej pasji naukowej i trudnościach jakie naukowcy spotykają po drodze podczas opracowywania nowych terapii jest pierwszym odcinkiem w 3 serii programu (2022).

Od momentu otrzymania stypendium L’Oreal-UNESCO dla Kobiet i Nauki w 2019 roku zainteresowały mnie tematy związane z karierą naukową kobiet. Angażując się na rzecz kobiet naukowców aktywnie promuję programy finansujące stypendia dla kobiet i dziewcząt (nie tylko Stypendium L’Oreal-UNESCO dla Kobiet i Nauki ale także Nowe Technologie dla Dziewczyn oraz Dziewczyny na politechniki i wiele innych). W ramach konferencji International Sopot Youth Conference ‘Where the world is heading?’ w 2020 roku

poprowadziłam panel dyskusyjny pt. „Kobiety i dziewczęta w nauce”, rozmawiając o trudnościach z jakimi zmagają się kobiety podczas prowadzenia badań naukowych. W 2021 roku wzięłam także udział w debacie podczas Europejskiego Forum Nowych Idei (EFNI) pt. „For Woman in Science”, w której dyskutowałam o możliwościach polepszenia sytuacji kobiet na uczelniach w Polsce oraz zachęcałam kobiety do podejmowania kariery naukowej.

Aktywnie współpracuję z Instytutem Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka, Centrum Chorób Rzadkich Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z organizacjami pacjentów (Fundacja Sanfilippo, Stowarzyszenie Uratujmy Życie, Stowarzyszenie Chorych na Mukopolisacharydozę i Choroby Rzadkie, Stowarzyszenie NBIA Polska) w zakresie (i) prowadzenia badań naukowych (hodowla komórek pobranych od pacjentów z danej placówki i poszukiwanie spersonalizowanych patomechanizmów schorzenia i podejść terapeutycznych dla konkretnych pacjentów) oraz (ii) poradnictwa genetycznego (konsultacje z pacjentami lub ich rodzinami, diagnostyka chorób genetycznych, próby przewidywania przebiegu choroby na podstawie typu mutacji, nowe metod leczenia i inne). Ponadto, regularnie kontaktuję się z pacjentami cierpiącymi na choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona i inne) oraz ich opiekunami szukającymi pomocy dla członków swoich rodzin. Kieruję ich do odpowiednich specjalistów, informuję o nowych próbach klinicznych i innych możliwościach wspomagania terapii. Za tę aktywność oraz osiągnięcia naukowe znalazłam się w finale konkursu o Nagrodę im. Artura Rojszczaka, przyznawaną przez Klub Stypendystów Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (2022).

Początek roku 2023 przyniósł mi także dwie ciekawe współpracy. Wystąpiłam w roli eksperta w kampanii marki kosmetycznej Biotherm (opierającej swoje produkty na składniku aktywnym jakim jest plankton termalny) podczas której przekazywałam informacje o biologicznych aktywnościach składników kosmetyków. Ponadto, nawiązałam współpracę z Fundacją na rzecz Nauki Polskiej. W organizowanej przez tę Fundację kampanii promującej przeznaczanie 1,5% podatku na stypendia START, promowałam badania naukowe prowadzone przez stypendystów programu START oraz opowiadałam o tym w czym pomogło mi otrzymanie tego stypendium.

Mam dwie córki (rocznik 2014 oraz 2021), które od najmłodszych lat aktywnie towarzyszą mi w pracach badawczych. Z ich powodu jeden z moich zaplanowanych staży zagranicznych został zamieniony na cykl krótszych wyjazdów do Instytutu Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk we Lwowie, Ukraina (05.12.2016 – 11.12.2016; 16.11.2018 – 31.11.2018; 07.06.2019 – 22.06.2019). Wyjazdy te zostaną wznowione po zakończeniu konfliktu zbrojnego na Ukrainie.

[8] Podsumowanie kariery naukowej

Moje prace badawcze koncentrują się głównie na poszukiwaniu patomechanizmów oraz nowych możliwości terapii chorób genetycznych i neurodegeneracyjnych.

Podsumowując moje osiągnięcia naukowe, jestem współautorką **57 artykułów** naukowych i **4 rozdziałów** w monografiach. Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowanych zostało 44 z tych artykułów, z czego 10 weszło w skład mojego głównego osiągnięcia habilitacyjnego.

Moje wyniki prezentowane były na **71 konferencjach i sympozjach** ogólnopolskich i międzynarodowych, z czego jedno było wygłoszeniem wykładu na zaproszenie ([Pierzynowska et al: Gene expression-targeted isoflavone therapy for Huntington's and Alzheimer's diseases. 18th European Congress On Biotechnology, 1-4.07.2018, Genewa, Szwajcaria](#)).

Od czasów studenckich aktywnie biorę udział w organizacji konferencji naukowych. Łącznie brałam udział w organizacji **10 konferencji** z czego jedną zorganizowałam w roli przewodniczącej komitetu organizacyjnego.

Brałam udział w realizacji **12 projektów** badawczych finansowanych na drodze konkursów ogólnopolskich (NCN, NCBR), w tym w jednym w roli kierownika (Preludium, NCN). Złożony przeze mnie projekt grantowy w konkursie Sonata NCN jest obecnie rozpatrywany (w II etapie ewaluacji). Ponadto, byłam kierownikiem **7 projektów** i wykonawcą kolejnych **5 projektów** finansowanych przez Uniwersytet Gdański.

Odbyłam **2 staże naukowe** (Gdański Uniwersytet Medyczny oraz West Virginia University) oraz **3 wyjazdy badawcze** (Instytut Biologii Komórki Ukraińskiej Akademii Nauk we Lwowie). Doświadczenia te możliwe były głównie dzięki Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) w programach Prom oraz wymianie bilateralnej naukowców pomiędzy Polską a Ukrainą.

Za swoje badania otrzymałam **12 nagród za najlepsze komunikaty konferencyjne** oraz **11 nagród, stypendiów i wyróżnień naukowych** (w tym Stypendium L'Oreal-UNESCO dla Kobiet i Nauki, Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, Nagroda Miasta Gdańska im. Jana Uphagena dla młodych naukowców, międzynarodowa Nagroda Future Science: Future Star). Ponadto, znalazłam się na liście **100 kobiet roku** według rankingu Forbes Woman oraz na liście **10 Pomorzan z największym wpływem na rozwój rejonu Pomorza** według miesięcznika Zawsze Pomorze.

Od czasu uzyskania stopnia doktora (2020 r.) pełnię funkcję **redaktora 3 czasopism naukowych** (*Acta Biochimica Polonica*, *BMC Research Notes*, *Metabolic Brain Disease*) oraz byłam **redaktorem gościnnym 4 numerów specjalnych** (*Frontiers in Molecular Bioscience*,

Molecules, International Journal of Molecular Science). Jeszcze na studiach doktoranckich dostawałam zaproszenia do recenzji artykułów przesłanych do międzynarodowych czasopism. Do dnia dzisiejszego wykonałam około **100 recenzji artykułów naukowych** (*Acta Biochimica Polonica, Metabolic Brain Disease, International Journal of Molecular Science, Molecules, Medical Science Monitor, Scientific Reports, Gene Reports, Frontiers in Cell and Developmental Biology*). Podjęłam się także **recenzji 3 projektów grantowych** (Fundacja Cure Sanfilippo oraz granty z subwencji 2023 Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu). Byłam również **7-krotnie członkiem komisji oceniających** w konkursach na najlepsze studenckie wystąpienia konferencyjne (*International Sopot Youth Conference 'Where the world is heading?'* oraz *International Student Scientific Conference* [w sesji „Basic Science”] organizowanej przez Gdański Uniwersytet Medyczny) oraz komisji oceniającej wnioski w konkursie o międzynarodową nagrodę Future Science: Future Star Award.

Na Wydziale Biologii UG pełniłam/pełnię funkcję członka Rady Dziekana, a następnie członka Rady Wydziału jako przedstawiciel pracowników niesamodzielných, a także kierownika Sekcji Promocji Wydziału i członka Komisji ds. Planu Naprawczego.

Jestem też członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Od początku studiów doktoranckich aktywnie opiekuję się studentami oraz uczestnikami zagranicznych wymian studenckich. Pod moją opieką prace dyplomowe obroniło **10 studentów** (w ciągu 3 lat). Studenci Ci są często nagradzani nagrodami konferencyjnymi oraz Nagrodami Rektora UG, Stypendiami Ministra Edukacji i Nauki, Stypendium Miasta Sopotu, a także ostatnio przyznaniem finansowania na projekt grantowy „Perły Nauki” przez Ministra Edukacji i Nauki. Pełnię też funkcję promotora pomocniczego dwóch osób wykonujących prace doktorskie.

Aktywnie angażuję się w popularyzację nauki. Łącznie przeprowadziłam około **200 pokazów, warsztatów i wykładów** w ramach wydarzeń takich jak Dni Mózgu, Krwawy Piątek, Bałtycki Festiwal Nauki, Piknik na zdrowie. Opracowałam również **cykl zajęć dla najmłodszych dzieci** (na etapie przedszkolnym lub wczesnoszkolnym), które obejmują zakres różnych ciekawych zagadnień biologicznych z zakresu anatomii człowieka, mikrobiologii, neurobiologii, biochemii, zoologii. Ponadto, wzięłam udział w organizowanej przez Centrum Hevelianum promocji badań naukowych prowadzonych przez młodych naukowców trójmiejskich uczelni (w ramach Dnia Nauki Polskiej, 19.02.2021), a także poprowadziłam wykład cyklu wykładów popularnonaukowych Science Café organizowanych przez Centrum Nauki Experiment w Gdyni (24.10.2021).

Brałam udział w wielu **kampaniach promocyjnych związanych z nauką lub środowiskiem akademickim** m.in. kampanii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Współpracuję także w roli eksperta z marką kosmetyczną Biotherm. Angażuję się w zagadnienia związane z sytuacją zawodową kobiet naukowców, prowadząc sesje tematyczne w ramach konferencji i biorąc udział w debatach dotyczących tej tematyki.

Aktywnie współpracuję z Instytutem Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka, Centrum Chorób Rzadkich Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z organizacjami pacjentów (Fundacja Sanfilippo, Stowarzyszenie Uratujmy Życie, Stowarzyszenie Chorych na Mukopolisacharydozę i Choroby Rzadkie, Stowarzyszenie NBIA Polska) w zakresie prowadzenia badań naukowych oraz poradnictwa genetycznego. Regularnie wspomagam pacjentów cierpiących na choroby neurodegeneracyjne oraz ich opiekunów, kierując ich do odpowiednich specjalistów, informując o nowych próbach klinicznych i innych możliwościach wspomagania terapii.

Udzieliłam wielu wywiadów telewizyjnych oraz radiowych dotyczących chorób neurodegeneracyjnych oraz nowych możliwości ich leczenia (Dzień Dobry TVN, TVN24, Dzień Dobry Tu Gdańsk TVP3, Radio Dla Ciebie i wiele innych), a na temat moich badań powstało wiele artykułów internetowych oraz materiałów telewizyjnych (tvn24, gdansk.tvp, wp.pl; nauka.trojmiasto.pl; gdansk.pl; perspektywy.pl; prestiż.trojmiasto.pl). Byłam również bohaterką jednego z odcinków programu „Inspirujące Kobiety” emitowanego w TVN Style.

Moje dane naukometryczne na dzień 19 kwietnia 2023 r. przedstawiają się następująco:

- Indeks Hirscha: **15** (wg Scopus), **15** (wg WoS);
- Łączny Impact Factor: **241.554**;
- Liczba cytowań: **1577** (wg Scopus), **1259** (wg WoS).

.....
(podpis wnioskodawcy)