

**„Terapie molekularne w mysich modelach metabolicznych chorób z grupy mukopolisacharydoz”**  
**mgr Estera Rintz**

Mukopolisacharydozy (MPS) należą do grupy dziedzicznych chorób metabolicznych, w których, w wyniku mutacji genu kodującego enzym odpowiedzialny za rozkład związków z grupy mukopolisacharydów (glikozaminoglikanów, GAG) [1,2]. Proces ich degradacji w zdrowym organizmie jest sekwencyjną reakcją kilku enzymów, jednak gdy jeden z nich nie funkcjonuje prawidłowo, reakcja zostaje zatrzymana i GAG gromadzą się w komórkach. W zależności od tego, który enzym jest nieaktywny, wyróżnia się 13 typów i podtypów MPS. Wiele objawów jest wspólnych dla większości typów i podtypów MPS, jednak najcięższe dotyczą układu nerwowego (CNS) i układu szkieletowego [3]. Dostępne obecnie terapie są nie skuteczne dla objawów ze strony CNS oraz układu szkieletowego.

Najczęściej stosowaną terapią MPS jest terapia enzymatyczna (ERT), która polega na dostarczaniu aktywnej formy brakującego enzymu. Podawanie brakującego enzymu nie jest wystarczające w przypadku typów MPS, w których główne objawy dotyczą CNS (takich jak MPS III), ponieważ enzym nie przekracza bariery krew-mózg [4,5]. Istnieją również inne ograniczenia związane z ERT, w tym krótki okres półtrwania enzymu, wysoki koszt terapii, ograniczony wpływ na tkanki i narządy beznaczyniowe oraz konieczność cotygodniowych infuzji przez całe życie [6,7]. Ponadto, choć ERT dla nieneuropatycznego typu MPS IVA została zatwierdzona, ma ona ograniczony wpływ na nieprawidłowości szkieletowe, które są jednym z głównych objawów choroby [8]. Dlatego konieczne są badania nad alternatywnymi terapiami dla tych typów MPS.

Jedną z alternatywnych strategii jest przyspieszenie degradacji GAG poprzez indukcję procesu autofagii. Autofagia jest to proces fizjologiczny zachodzący w lizosomach, który rozkłada zbędne lub nieprawidłowe makrocząsteczki w komórce [9]. Ostatnie odkrycia sugerują, że GAG mogą być takimi makrocząsteczkami, co potencjalnie oferuje nowe leczenie dla chorób związanych z magazynowaniem tych polisacharydów [10]. Kluczowe pytanie brzmi, jak proces autofagii aktywuje degradację GAG w przypadku uszkodzenia kluczowego enzymu. Całkowity brak enzymu jest wyzwaniem, wiele przypadków MPS ma pewną resztkową aktywność enzymatyczną. Zwiększenie autofagii mogłoby poprawić tę resztkową aktywność, poprawiając degradację GAG. Dodatkowo, enzymy niespecyficznie degradujące GAG- hydrolazy, choć w niewielkiej ilości, mogą wspomagać usuwanie GAG, jeśli autofagia zostanie pobudzona. Nawet jeśli pełne usunięcie GAG nie jest możliwe ze względu na brak enzymu, degradacja wtórnych materiałów magazynowanych w komórce

może przynieść korzyści pacjentom, ponieważ niezbędne enzymy są obecne w lizosomach komórek MPS [11-Artykuł no.1].

Potencjalny lek na MPS IIIB powinien również przekraczać barierę krew-mózg i być bezpieczny w długoterminowej terapii. Wydaje się, że jeden z polifenoli, resweratrol, może spełniać te wymagania. Winogrona, orzeszki ziemne, morwy i czarne porzeczki są szczególnie bogate w resweratrol. Ma on wiele funkcji biologicznych, takich jak działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające i neuroprotektoryjne. Jest to związek, który był szeroko badany i aktywuje proces degradacji makrocząsteczek poprzez kilka mechanizmów [12]. Ze względu na pleiotropowy mechanizm indukcji autofagii, zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg i profil bezpieczeństwa, resweratrol jest obiecującym kandydatem do leczenia neuronopatycznych form MPS [11-Artykuł nr 1]. Resweratrol indukuje autofagię poprzez wiele ścieżek molekularnych, w tym aktywację PTEN, AMPK, FoxOs i TFEB oraz hamowanie kinazy mTOR i genu kodującego Bcl-2. Te mechanizmy zostały szczegółowo opisane w Rintz et al. 2019 [11-Artykuł nr 1]. Dlatego leczyłam model myszy z MPS IIIB resweratrolem, aby poprawić zachowanie wraz z redukcją zgromadzonych GAG [13-Artykuł nr 2].

Obiecującą alternatywną terapią dla pacjentów z MPS IVA jest terapia genowa. ERT z elosulfazą alfa ma ograniczone efekty na wzrost kości u pacjentów z MPS IVA (zespół Morquio A). Przeszczepienie hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT) może oferować więcej korzyści niż ERT, takich jak poprawa funkcji serca, gęstości mineralnej kości i elastyczności stawów [14], ale ma również istotne ograniczenia: ryzyko śmiertelności, trudności w znalezieniu dawców, powikłania po przeszczepie i ograniczony wpływ na wzrost kości [14,15]. Zarówno ERT, jak i HSCT opierają się na korekcji krzyżowej za pośrednictwem szlaku receptora mannozo-6-fosforanu, gdzie komórki produkujące enzym lizosomalny pomagają komórkom z deficytem enzymu [16]. Jednak metoda ta ma trudności z przenikaniem do chrząstki stawowej [15]. Dlatego istnieje duże zapotrzebowanie na środki penetrujące kości w celu leczenia beznaczyniowych zmian kostnych i indukcji kostnienia u pacjentów z MPS IVA.

Peptyd natriuretyczny typu C (CNP) indukował wzrost kości poprzez aktywację receptora natriuretycznego peptydu typu B (NPR-B) na chondrocytach w płytce wzrostu kości [17]. Stymulacja cząsteczki wewnątrzkomórkowej cGMP przez CNP aktywuje wiele szlaków, co skutkuje wzrostem kości (szczegóły w ref. [18-Artykuł nr 3]). Mimo swojego potencjału, naturalny CNP ma krótki okres półtrwania, co wymaga częstego podawania pacjentom [19]. Dlatego dążyłam do poprawy patologii kostnej w MPS IVA poprzez wykorzystanie terapii

genowej z CNP [20-Artykuł nr 4]. Następnym krokiem było połączenie dwóch transgenów (*GALNS* i *NPPC*) w systemie AAV w celu poprawy wzrostu kości przy jednoczesnym zmniejszeniu akumulacji GAG w innych tkankach [21-Artykuł nr 5].

**Celami tej pracy doktorskiej było:**

- 1) Określenie roli resweratrolu i dokładnego mechanizmu jego działania na modelu mysim MPS IIIB.**
- 2) Opracowanie innowacyjnej terapii kombinowanej genowej w celu poprawy zmian kostnych w modelu mysim MPS IVA.**

Cel 1 - Określenie roli resweratrolu i dokładnego mechanizmu jego działania na modelu mysim MPS IIIB.

Zarówno myszy typu dzikiego, jak i MPS IIIB były testowane w dwóch grupach, gdzie przez 30 tygodni codziennie podawano im wodę lub resweratrol. Aby sprawdzić skuteczność resweratrolu, przeprowadzono kilka testów. Wykonano testy behawioralne. Test aktywności lokomotorycznej wykonano w celu pomiaru nadpobudliwości zwierząt. Test otwartego pola wykonano w celu pomiaru lęku u myszy. Przeprowadzono również testy biochemiczne i molekularne w celu oceny wpływu resweratrolu na komórki z różnych narządów, zwłaszcza mózgu i wątroby, gdzie akumulacja GAG jest największa. Stężenia GAG w moczu (próbki pobierano w 5, 10, 20 i 30 tygodniu życia myszy) zmierzono testem Blyscan. Wpływ resweratrolu na poziomy specyficznych białek w kontekście molekularnego mechanizmu indukcji autofagii przez resweratrol oceniano techniką Western-blot.

Spośród związków testowanych *in vitro* (genisteina, kapsaicyna, kurkumina, resweratrol, trehaloza i kalcytriol), resweratrol wykazywał największy efekt, szczególnie redukując poziom siarczanu heparanu (HS), GAG gromadzącego się w chorobie Sanfilippo. Sugerowało to, że poziom HS został zmniejszony po stymulacji autofagii przez resweratrol. Eksperymenty na modelu myszy z MPS IIIB potwierdziły indukcję autofagii resweratrolem, normalizację poziomów GAG w moczu oraz poprawę zachowania u chorych zwierząt. Te wyniki potwierdzają propozycję użycia resweratrolu jako potencjalnego leku na chorobę Sanfilippo, wymagającego dalszych badań. Resweratrol został również zaproponowany do innych chorób magazynowych lizosomalnych ze względu na swoje liczne funkcje biologiczne. Jednak jego mechanizm działania może być różny w różnych chorobach; na przykład, wykazywał właściwości przeciwutleniające w modelach choroby Battena. Indukcja autofagii przez resweratrol może obejmować wiele szlaków, w tym niezależne od mTOR i zależne od fosfatazy białkowej 2A. Dodatkowo, badania behawioralne na myszach z MPS

IIIB wykazały, że nadpobudliwość zmniejszyła się po leczeniu resweratolem, podobnie jak poziom lęku [13 -Artykuł nr 2].

Cel 2 - Opracowanie innowacyjnej terapii kombinowanej w celu poprawy zmian kostnych w modelu mysim MPS IVA.

Myszy z MPS IVA były testowane pod kątem monoterapii i terapii kombinowanej, aby ocenić skuteczność leczenia. W wieku 4 tygodni myszom dożylnie podano wektor wirusowy AAV zawierający gen *NPPC* dla peptydu CNP, który aktywuje wzrost myszy, gen *GALNS* dla enzymu lub terapię kombinowaną, gdzie myszom podano mieszanę obu wektorów. Od tego czasu zwierzęta były mierzone co tydzień w celu oceny skuteczności indukcji wzrostu. Aby ocenić skuteczność leczenia, przeprowadzono testy biochemiczne i molekularne, w tym badanie aktywności enzymatycznej we krwi, narządach i kościach, oraz histologiczne preparaty pokazujące patologię kości i skuteczność leczenia. Do określenia liczby kopii wektora zmierzono stężenie peptydu CNP we krwi zwierząt za pomocą testu ELISA. Poziomy przeciwciał anti-GALNS również mierzone za pomocą testu ELISA w celu monitorowania reakcji immunologicznej. Poziomy GAG oceniano za pomocą chromatografii cieczerwnej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Dodatkowo, specjalistyczne badanie mikrotomografii komputerowej było używane do określenia gęstości i struktury kości po leczeniu.

W modelu myszy z MPS IVA zaobserwowałam akumulację monosiarczanowanego siarczanu keratanu (KS) w kości, GAG magazynowanego w chorobie Morquio, wraz z nieuporządkowaną strukturą kolumn chondrocytów. Aktywność enzymu GALNS była nie wykrywalna w tkankach i osoczu myszy z MPS IVA. Choć nie zaobserwowałam znaczących nieprawidłowości wzrostu kości ani dysplazji szkieletowej, zaobserwowano tendencję do zwiększonej objętości kości i większej powierzchni kości u myszy z MPS IVA w porównaniu z kontrolami typu dzikiego (WT). Badanie wykazało również, że nieleczone myszy z MPS IVA miały około 200 razy wyższe poziomy monosiarczanowanego KS w wątrobie i 100 razy wyższe poziomy monosiarczanowanego KS w płucach w porównaniu z WT, z 30% wzrostem w kości. Modele myszy odzwierciedlają patologię MPS IVA u ludzi z brakiem aktywności enzymu, akumulacją GAG i zmianami histologicznymi kości. Jednak żaden z istniejących modeli myszy nie w pełni odzwierciedla ciężką fenotypową dysplazję szkieletową obserwowaną u ludzi.

Użyłam wektora AAV8 do ekspresji genu *NPPC*, kodującego peptyd CNP, który indukował wzrost kości i zmniejszał akumulację KS w kościach. Badanie wykazało zmniejszoną akumulację KS i zwiększoną proliferację chondrocytów w kości po leczeniu

CNP myszy z MPS IVA. Podsumowując, użycie wektora AAV8 do ekspresji *NPPC* u myszy z MPS IVA skutkowało wysokim poziomem sekrecji CNP, indukcją wzrostu kości, poprawą patologii kości i zmianami w poziomach GAG. Dalsze badania z większymi próbkami i długoterminowe badania są niezbędne do potwierdzenia tych wyników i opracowania skutecznych metod leczenia dysplazji szkieletowej u pacjentów z MPS IVA [20-Artykuł nr 4].

Peptyd CNP wspiera homeostazę chrząstki i formowanie kości. Połączenie dwóch wektorów (jeden dla produkcji GALNS i jeden dla produkcji CNP) wykazało obiecujące wyniki, z utrzymującą się aktywnością GALNS i zmniejszoną akumulacją KS, co poprawiało wzrost kości bez negatywnych skutków ubocznych. Zaobserwowałam wysoką aktywność GALNS i zmniejszone poziomy KS we krwi i tkankach po leczeniu kombinowanym, co prowadziło do poprawy patologii kości. Optymalna dawka CNP jest kluczowa, aby uniknąć nadmiernego wzrostu. Analiza biodystrybucji potwierdziła obecność GALNS w kości i wątrobie, podczas gdy poziomy NT-proCNP korelowały z produkcją CNP i indukcją wzrostu. Połączenie wysokich dawek wektorów AAV8-hNPPC i AAV9-hGALNS przyniosło najbardziej znaczące poprawy.

Podsumowując, ko-ekspresja genów *GALNS* i *NPPC*, zwłaszcza w oddzielnych wektorach, zwiększyła wzrost kości i aktywność GALNS. Określenie optymalnej dawki CNP w większych badaniach jest kluczowe, aby uniknąć nadmiernego wzrostu i negatywnych skutków, zmierzając ku badaniom klinicznym. Rozważane może być również wprowadzenie systemu mikroRNA do kontroli ekspresji CNP w celu uniknięcia nadmiernego wzrostu [21-Artykuł nr 5].

Podsumowując, niniejsza praca doktorska koncentruje się na rozwiązaniu problemu dostarczania środków terapeutycznych do trudno dostępnych tkanek w modelach myszy z MPS. Proponuję użycie małych cząsteczek zdolnych do przenikania przez bariery biologiczne, aby skutecznie dotrzeć do tych tkanek. Konkretnie, zbadalam potencjał resweratrolu do przenikania przez barierę krew-mózg (BBB) w leczeniu MPS IIIB oraz CNP do celowania w beznaczyniowe chondrocyty w MPS IVA. Obie terapie wykazały znaczący potencjał w poprawie wyników leczenia myszy cierpiących na te formy MPS poprzez zwiększenie dostarczania leków do trudno dostępnych miejsc w ciele. To podejście nie tylko ma na celu poprawę skuteczności obecnych terapii, ale także torowanie drogi do opracowania nowych strategii terapeutycznych dla MPS i potencjalnie innych chorób magazynowych lizosomalnych.