

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
tel.: +48618528503 wew. 1150
e-mail: mfigiel@ibch.poznan.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Cyske pt.:

„Mukopolisacharydoza plus (MPSPS): pierwsze badania molekularnego mechanizmu choroby w aspekcie opracowania terapii”

Rozprawa doktorska mgr Zuzanny Cyske została przygotowana jako cykl czterech publikacji, obejmujący dwie prace oryginalne oraz dwie prace przeglądowe, opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Uzupełnieniem cyklu publikacji są streszczenia przygotowane w języku polskim i angielskim wraz z kompletem oświadczeń współautorów. Oświadczenia nie budzą żadnych wątpliwości, co do wiodącego wkładu mgr Zuzanny Cyske w cykl prac rozprawy doktorskiej. Manuskrypty składające się na pracę doktorską powstały w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa dotyczy badań nad bardzo rzadką chorobą metaboliczną, mukopolisacharydozą plus (MPSPS) wywołaną mutacją c.599G>C (p.Arg200Pro) w genie VPS33A. Wariant ten występuje w formie homozygotycznej w komórkach jedynej polskiej pacjentki cierpiącej na chorobę w wyniku tej mutacji. Mimo zidentyfikowanej etiologii genetycznej, dokładny patomechanizm choroby pozostawał dotąd w dużej mierze nieznany. Autorka podjęła się ambitnego zadania poszerzenia wiedzy na temat molekularnych podstaw MPSPS oraz oceny potencjału terapeutycznego pewnych związków chemicznych. Streszczenie do rozprawy jest starannie opracowane i przytacza aktualną literaturę naukową. Doktorantka omawia kontekst biologiczny klasycznych mukopolisacharydoz, a następnie przechodzi do szczegółowego omówienia MPSPS, w tym epidemiologii, genetyki, objawów klinicznych oraz dwóch konkurencyjnych hipotez patomechanizmu. Wprowadzenie stanowi solidną podstawę teoretyczną dla części eksperymentalnej.

Część badawcza rozprawy obejmuje szeroki zakres analiz komórkowych, w tym oznaczenia poziomu glikozoaminoglikanów (siarczanu heparanu; HS), badania ultrastruktury organelli, analizy markerów endosomalnych i lizosomalnych, ocenę kolokalizacji oraz testowanie potencjalnych związków terapeutycznych, genisteiny and ambroxolu zastosowanych łącznie. Wyniki są przedstawione w sposób przejrzysty, a ich interpretacja jest logiczna i zgodna z aktualnym stanem wiedzy. Szczególnie wartościowe są obserwacje dotyczące poziomu białek VPS33A i VPS16, które są mocno obniżone nawet w 80%, nietypowej dystrybucji HS, zwiększonej liczby lizosomów oraz podwyższonych poziomów markerów endosomalnych. Wyniki te wspierają hipotezę, że podstawowym defektem komórkowym w MPSPS jest zaburzenie transportu endosomalnego, prowadzące do uwięzienia GAG w endosomach i ich niedostatecznej degradacji.

W drugiej części badań doktorantka testuje ambroksol i genisteinę jako potencjalne leki mogące podnosić poziom VPS33A. Wyniki są niezwykle obiecujące i stanowią pierwszą propozycję terapii celującej w defekt endosomów w MPSPS. Dla ścisłości należy wspomnieć, że taka terapia nie jest skierowana bezpośrednio na mechanizm molekularny związany z etiologią MPSPS. Nie jest to wada, ponieważ autorka wykazuje, że oba związki zwiększają poziom VPS33A i VPS16, obniżają poziom GAG, normalizują liczbę lizosomów oraz poprawiają parametry transportu endosomalnego. Dane te mają wysoką wartość translacyjną.

Obie prace przeglądowe stanowią istotne uzupełnienie części eksperymentalnej. Praca opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* jest pierwszą w literaturze tak kompletną analizą MPSPS, natomiast praca opublikowana w *Acta Biochimica Polonica* przedstawia kontekst funkcjonowania pacjentów z chorobami rzadkimi, co nadaje rozprawie bardziej interdyscyplinarny charakter.

Uwagi krytyczne i kierunki dalszych badań

Rozprawa jest wartościowa i nowatorska, jednak jak każda praca naukowa, ma pewne ograniczenia, które warto wskazać w kontekście dodatkowych eksperymentów i kierunków dalszych badań.

Tytuł pracy zawiera pytanie o mechanizm molekularny. W związku z tym aspektem zabrakło mi pewnych dodatkowych eksperymentów oraz szerszej dyskusji dotyczącej samego białka VPS33A z mutacją. Nasuwają się pytania, jak może zmieniać się struktura zmutowanego białka

w porównaniu do formy WT. Czy taka zmieniona struktura prowadzi do zmian w interakcji z innymi białkami i jakimi. Takie analizy mogłyby zostać przeprowadzone wyłącznie bioinformatycznie. Następnie, pozwoliłoby one zaplanować eksperymenty koimmunoprecypitacji lub inne. Czy Pani plany przewidują kontynuację badań w tym kierunku?

Przedstawione dane dotyczące zaburzeń transportu endosomalnego obejmują poziomy białek i HS, oraz liczne analizy kolokalizacji białek. Takie dane, choć bardzo mocne, mają charakter głównie pośredni. W rozprawie nie wykonano testów funkcjonalnych transportu pęcherzykowego. Chociaż postuluje się, że GAG zostają uwięzione w endosomach i wykonano badanie poziomu EEA1 i RAB7, to jednak nie wykonano np. analizy konwersji Rab5 do Rab7, pomiarów zakwaszenia lizosomów, czy też zbadanie niektórych ścieżek przekazywania sygnału, np. z pomocą przeciwciał fosfospecyficznych. Czy uważa Pani, że takie testy mogłyby wzmocnić hipotezę o zaburzonym transporcie endosomalnym? Jeżeli tak, to jakie testy funkcjonalne uważa Pani za najbardziej adekwatne do potwierdzenia hipotezy i czy planuje Pani ich wykonanie w przyszłości? W rozprawie nie oceniono pH lizosomalnego po terapii, choć wiadomo, że w MPSPS występuje nadmierne podniesienie pH lizosomów. Czy uważa Pani, że normalizacja pH lizosomalnego jest konieczna do pełnej naprawy fenotypu komórkowego?

W rozprawie nie wykonano eksperymentu przywrócenia ekspresji prawidłowego białka i jego funkcji, polegającego na nadekspresji VPS33A WT w fibroblastach pacjentki (np. z pomocą AAV), a może nawet połączenia wyciszenia zmutowanego białka z nadekspresją białka WT. Taki eksperyment stanowiłby bardzo silny dowód przyczynowości obserwowanych zaburzeń. Czy rozważała Pani wykonanie podobnego eksperymentu w przyszłości?

Choć w rozprawie wykazano obniżony poziom VPS33A i jego wzrost po leczeniu, to jednak stabilność VPS33A mogłaby zostać oceniona poprzez ustalenie stopnia jego ubikwitynacji. Badania te mogłyby bezpośrednio potwierdzić mechanizm działania ambroksolu i genisteiny. Zasadne jest więc pytanie: czy planuje Pani określić stabilność VPS33A i stopień jego ubikwitynacji?

Analiza autofagii w pracy obejmuje badanie pewnych wybranych cech tego procesu. Nie wykonano pogłębionych testów autofagii, takich jak inkubacja z bafilomycyną czy ocena

degradacji LC3 II. Czy uważa Pani, że zaburzenia autofagii w MPSPS są pierwotne czy wtórne oraz jakie eksperymenty mogłyby to rozstrzygnąć?

Rozprawa dotyczy wariantu p.Arg200Pro, co jest zrozumiałe ze względu na dostępność materiału biologicznego. Jednak porównanie z wariantem p.Arg498Trp mogłoby dostarczyć dodatkowych informacji o różnicach fenotypowych i mechanistycznych. Czy uważa Pani, że mechanizm choroby w wariacie p.Arg498Trp jest identyczny, czy jedynie częściowo zbieżny z mechanizmem w p.Arg200Pro?

W rozprawie analizowano poziomy białek, ale nie określono, czy zmiany te mogą też być zależne od zmian w mRNA (poziom ekspresji) lub modyfikacji post translacyjnych. W pracy Lipiński et al. wykonano WES, natomiast nie znalazłem informacji czy w omawianym wariacie MPSPS istnieją zaburzenia szlaków komórkowych jako rezultat choroby i czy te szlaki normalizują się po genisteinie i ambroksolu. Pokazano, że ambroksol ma szeroki wpływ na transkrypcję i ekspresję genów. Czy w wypadku proponowanej terapii, podwyższenie poziomu VPS33A może być związane z transkrypcyjnym działaniem ambroksolu? Czy planuje Pani przeprowadzić analizę transkryptomiczną, żeby to zbadać?

Mikroskopia elektronowa została wykonana, jednak nie przeprowadzono bardziej dogłębnej ilościowej analizy ultrastruktur, takiej jak zliczanie organelli czy pomiar średnicy pęcherzyków. Dane takie mogłyby dodatkowo wzmocnić wnioski dotyczące zaburzeń transportu pęcherzykowego.

Fibroblasty są dobrym modelem do badań podstawowych, jednak mogą mieć swoje ograniczenia. W przypadku MPSPS istotnymi tkankami, w których występuje patogenezą, to mózg, serce i nerki. Modele oparte na iPSC i organoidach mogłyby poszerzyć zakres badań i umożliwić ocenę fenotypu neuronalnego. Czy takie badania są planowane?

Dodatkowe pytanie o potencjalne chroniczne zastosowanie ambroksolu u pacjentów. Czy może być niebezpieczne?

Na koniec pytania o obecny zintegrowany model molekularny mechanizmu patogenezą zależnej od zmutowanego VPS33A z wariantem c.599G > C (p.Arg200Pro). Z czego dokładnie może wynikać jego obniżony poziom, jaką dokładnie funkcję lub zespół funkcji białka związany z jego strukturą ulega zaburzeniu? W jaki sposób mutacja zaburza interakcję z innymi białkami w tym z kompleksami HOPS i CORVET, ubiquitynacją i innymi procesami?

Wniosek końcowy

Pomimo wskazanych ograniczeń, które stanowią naturalne kierunki dalszych badań, rozprawa mgr Zuzanny Cyske jest pracą bardzo wartościową, nowatorską i w pełni spełniającą wymagania określone w art. 187 ust. 1–4 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). Autorka wykonała pionierską pracę w zakresie badań nad MPSPS, a jej wyniki stanowią fundament dla przyszłych badań translacyjnych. W związku z powyższym rekomenduję dopuszczenie mgr Zuzanny Cyske do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. Maciej Figiel