

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

Mgr Zuzanna Cyske

Mukopolisacharydozy (MPS) zaliczane są do grupy lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LSD). Stanowią one schorzenie dziedziczne o charakterze postępującym, wynikające z całkowitego braku bądź znacznego obniżenia aktywności określonych enzymów lizosomalnych, odpowiedzialnych za degradację nierozgałęzionych łańcuchów polisacharydowych – glikozoaminoglikanów (GAG) [Nagpal et al. 2022]. Niezdegradowane GAG stopniowo gromadzą się w lizosomach, prowadząc do zaburzeń funkcjonowania komórek, tkanek, a z czasem całych narządów [Freeze et al. 2015]. Aktywność poszczególnych enzymów, w tym szlaku metabolicznego, jest ze sobą ściśle skorelowana – każdy enzym rozpoczyna działanie dopiero po zakończeniu reakcji przez poprzedni. W konsekwencji brak aktywności choćby jednego z nich skutkuje zaburzeniem całego procesu degradacji [Parenti et al. 2015; Trovão de Queiroz et al. 2016].

Dziedziczenie MPS ma najczęściej charakter autosomalny recesywny, z wyjątkiem MPS typu II (choroba Huntera), który jest sprzężony z chromosomem X. Częstość występowania poszczególnych typów jest bardzo zróżnicowana w zależności od regionu na świecie – szacuje się, że MPS I występuje z częstością około 1 na 88 000 żywych urodzeń, natomiast MPS VII z częstością około 1 na 2 111 000 urodzeń. MPS IX jest ekstremalnie rzadką postacią – dotychczas opisano jedynie cztery przypadki na świecie [Natowicz et al. 1996; Imundo et al. 2011; Tomatsu et al. 2018; Węgrzyn et al. 2022].

Jak dotąd opisano 14 typów i podtypów MPS, sklasyfikowanych na podstawie nieaktywnego bądź o szczątkowej aktywności enzymu lizosomalnego lub na podstawie gromadzącego się GAG [Zhou et al. 2020]. Obraz kliniczny obejmuje zarówno objawy wspólne dla wszystkich postaci choroby, jak i symptomy specyficzne dla konkretnych typów/podtypów MPS. Do symptomów opisywanych w prawie wszystkich typach/podtypach należą między innymi: organomegalia, charakterystyczne rysy twarzy, nieprawidłowości w obrębie układu szkieletowego, a w późniejszych etapach także zmiany w obrębie układu oddechowego oraz sercowo-naczyniowego. W części przypadków występują zaburzenia słuchu i wzroku. Upośledzenie funkcji poznawczych obserwuje się w MPS I, ciężkich postaciach MPS II, wszystkich typach MPS III oraz w MPS VII [Muenzer 2011a].

Pomimo, że poszczególne typy/podtypy MPS są spowodowane konkretną mutacją w różnych genach, prowadzą one do tego samego efektu biochemicznego – akumulacji GAG w lizosomach [Jakóbkiewicz-Banecka et al. 2009]. Jeszcze niedawno uważano, że gromadzenie GAG jest pierwotnym i jedynym czynnikiem patogenetycznym [Wraith 2013]. Najnowsze badania wskazują jednak, że MPS wiąże się także z dysfunkcją wielu procesów komórkowych kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórek. Możliwe jest zatem, iż to zaburzenia molekularne – a nie sama akumulacja GAG – odgrywają zasadniczą rolę w patogenezie choroby. Zmiany te obejmują m.in.: zaburzenia apoptozy i autofagii [Tessitore et al. 2009; Brokowska et al. 2021], nieprawidłowości w transporcie

pęcherzykowym [Gaffke et al. 2023], proteasomie [Pierzynowska et al. 2020], dysfunkcję mitochondriów [Pshezhetsky 2015] oraz zaburzenia w obrębie cytoszkieletu [Parente et al. 2016] i przekazywaniu sygnału wewnątrz komórkowego [Pierzynowska et al. 2022]

Przez długi czas możliwości terapeutyczne u pacjentów z MPS ograniczały się wyłącznie do opieki paliatywnej. Alternatywną formą leczenia, wprowadzoną po raz pierwszy w 1980 roku, był przeszczep szpiku kostnego [Hobbs et al. 1981]. Skuteczność tej metody jest jednak ograniczona do przypadków, w których choroba została zdiagnozowana na bardzo wczesnym etapie, jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów klinicznych. Terapia ta nie pozwala na odwrócenie istniejących deficytów neurologicznych, takich jak zaburzenia funkcji poznawczych, hiperaktywność czy problemy natury emocjonalnej, a także nie koryguje wszystkich zmian strukturalnych, m.in. powszechnie występujących deformacji szkieletowych [Weisstein et al. 2004]. Uważa się, że przeszczep szpiku kostnego jest nieskuteczny w leczeniu MPS typu II, III i IV [Sivakumur and Wraith 1999; Peters and Krivit 2000; Prasad and Kurtzberg 2010].

Wprowadzenie enzymatycznej terapii zastępczej (ERT), polegającej na dożylnym podaniu aktywnej formy nieaktywnego lub o szczątkowej aktywności enzymu, doprowadziło do pewnego ograniczenia w stosowaniu przeszczepów szpiku kostnego. Decyzję tę uzasadniał m.in. wysoki odsetek zgonów po pierwszym przeszczepie u pacjentów z MPS I, wynoszący około 15% [Boelens et al. 2007]. W ciągu ostatnich kilkunastu lat opracowano ERT dla MPS I, II, IVA, VI i VII, przy czym największy postęp odnotowano w przypadku MPS I [Wraith 2005; Wraith and Jones 2014; de Ru et al. 2011; Burton et al. 2025], co prawdopodobnie wynika z największej częstości występowania tego typu MPS. Podobnie jak w przypadku przeszczepu szpiku kostnego, kluczowe znaczenie ma wczesne rozpoznanie choroby i szybkie rozpoczęcie terapii [McGill et al. 2010; Schulze-Frenking et al. 2011; Pérez-López et al. 2017; Burton et al. 2025].

Korzyści wynikające z zastosowania ERT u pacjentów z MPS obejmują m.in.: poprawę ruchomości stawów, a w konsekwencji zdolności lokomocyjnych; poprawę funkcjonowania układu oddechowego; redukcję hepatomegalii oraz istotny spadek stężenia GAG w moczu [Wraith et al. 2007; Clarke et al. 2009; Harmatz et al. 2006; Muenzer et al. 2011b; Pérez-López et al. 2017]. Mimo to, ERT nie eliminuje wszystkich objawów choroby. Szczególnym ograniczeniem jest fakt, że podawany enzym nie przekracza bariery krew-mózg, co czyni terapię nieskuteczną w przypadku postaci z zajęciem ośrodkowego układu nerwowego, a także ograniczony wpływ enzymu na tkanki kostne [Chen et al. 2019; Rossi and Brunetti-Pierri 2024].

Z uwagi na konieczność opracowania terapii dla postaci neuronopatycznych, zaproponowano alternatywne podejście – terapię redukcji syntezy substratu (SRT) [Jakóbkiewicz-Banecka et al. 2009]. Metoda ta polega na zahamowaniu biosyntezy GAG w sytuacji, gdy ich degradacja jest upośledzona, co pozwala na przywrócenie równowagi pomiędzy ich powstawaniem a usuwaniem. Bezpośrednie

zahamowanie aktywności enzymów syntetyzujących GAG jest niewykonalne, ponieważ ich substratami są cukry proste uczestniczące w licznych procesach metabolicznych. Dlatego ukierunkowano działania na obniżenie ekspresji genów kodujących syntetazy GAG, co prowadzi do redukcji ich poziomu i w konsekwencji zmniejszenia tempa syntezy tych związków. Substancją wykorzystywaną w tym podejściu terapeutycznym jest trihydroksyizoflawon (genisteina) [Jakóbkiewicz-Banecka et al. 2009], naturalny związek z grupy izoflawonów który, z uwagi na szerokie spektrum działania, jest już stosowany w medycynie m.in. jako środek łagodzący objawy menopauzy oraz o potencjale przeciwnowotworowym.

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem innego związku naturalnego – ambroksolu (4-((2-amino-3,5-dibromofenilo)metyloamino)cykloheksan-1-ol), wykazały, że pozytywnie wpływa on na funkcje komórkowe poprzez poprawę aktywności enzymów lizosomalnych, funkcji lizosomów oraz indukuje proces autofagii w modelu komórkowym mukopolisacharydozy typu III (MPS III) [Goker-Alpan et al. 2020]. Eksperymenty z wykorzystaniem ambroksolu, jako potencjalnego terapeutyku, przeprowadzono również modelu choroby Gaucher wskazują, że może on pomóc w zmniejszeniu nagromadzonych, toksycznych substancji przez aktywację ścieżki autofagia-lizosom [McNeill et al. 2014].

Na początku 2010 roku w Republice Sacha (Jakucja, Rosja) opisano kilku pacjentów z objawami przypominającymi zespół Hurler (ciężką postać MPS I), prowadzące do zgonu przed ukończeniem drugiego roku życia [Gurinova et al. 2014]. Początkowo schorzenie zostało sklasyfikowane jako „niezróżnicowana dziedziczna choroba metaboliczna” [Vasilev et al. 2020]. W 2017 roku, po szczegółowym scharakteryzowaniu obrazu klinicznego oraz ustaleniu etiologii, jednostka ta została opisana jako zespół mukopolisacharydozy plus (MPS-plus, MPSPS). U pacjentów zaobserwowano nadmierne wydalenie GAG z moczem, jednak nie było to wynikiem obniżonej aktywności enzymów lizosomalnych. Nazwa wskazuje, iż poza klasycznymi objawami typowymi dla konwencjonalnych postaci MPS, u chorych występują również inne cechy fenotypowe, m.in. wrodzone wady serca, zaburzenia czynności nerek oraz nieprawidłowości w obrębie układu krwiotwórczego [Faraguna et al. 2022; Sofronova et al. 2022]. Do chwili obecnej chorobę stwierdzono u kilkadziesiąt pacjentów, jednak dokładna ich liczba jest trudna do określenia, ponieważ niektórzy pacjenci mogli zostać ujęci kilkukrotnie w różnych publikacjach [Lipiński et al. 2022]. Większość zdiagnozowanych pacjentów pochodzi z populacji jakuckiej (Republika Sacha) [Kondo et al. 2017], natomiast opisano również przypadki w innych regionach świata – w Turcji [Dursun et al. 2017], oraz po jednym pacjencie z rejonu Morza Śródziemnego [Pavlova et al. 2022] i w Polsce [Lipiński et al. 2022]. Szacuje się, że częstość występowania MPSPS w populacji Jakutów wynosi około 1:12 100 żywych urodzeń [Kondo et al. 2017].

MPSPS dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny i jak dotąd opisano dwie homozygotyczne mutacje, w genie *VPS33A*, prowadzące do jego powstania. Wariant c.1492C > T (p.Arg498Trp) został opisany u wszystkich pacjentów pochodzących z Jakucji oraz Turcji [Dursun et al. 2017; Kondo et al. 2017; Faraguna et al. 2022], natomiast mutacje c.599G > C (p.Arg200Pro) opisano u pacjentów z rejonu Morza Śródziemnego oraz Polski [Pavlova et al. 2022; Cyske et al. 2025b - **Artykuł nr 3** wchodzący w skład tej rozprawy doktorskiej]. Porównując fenotyp wszystkich pacjentów z MPSPS można zauważyć, że mutacja c.1492C > T (p.Arg498Trp) prowadzi do powstania znacznie cięższych objawów oraz bardzo wczesnej śmierci pacjenta, natomiast w przypadku mutacji c.599G > C (p.Arg200Pro) objawy są znacznie łagodniejsze [Pavlova et al. 2019; Pavlova et al. 2022; Lipiński et al. 2022].

Pomimo identyfikacji mutacji prowadzącej do powstania MPSPS dokładny patomechanizm choroby pozostaje nieznany. Zaproponowano natomiast dwie hipotezy, które potencjalnie mogą wyjaśniać mechanizm choroby. Pierwsza z nich opiera się na badaniach potwierdzających nadmierne zakwaszenie lizosomów w wariancie p.Arg498Trp MPSPS. Enzymy lizosomalne w nadmiernie zakwaszonym środowisku nie funkcjonują prawidłowo i nie mogą rozkładać GAG, przez co gromadzą się one w lizosomach powodując szereg ciężkich objawów [Kondo et al. 2017]. Druga z hipotez dotyczy wariantu p.Arg200Pro MPSPS i skupia się na funkcji produktu białkowego genu *VPS33A* (białko VPS33A). Białko to jest składnikiem dwóch, dużych, wielofunkcyjnych kompleksów: homotypowego kompleksu fuzji i sortowania białek (HOPS) oraz kompleksu wiązanie wakuoli rdzeniowo-endosomalnych klasy C (CORVET). Oba te kompleksy uczestniczą w transporcie białek do lizosomów, a także w procesach autofagii i endocytozy [Wartosch et al. 2015; Sofronova et al. 2022]. Obniżony poziom białka VPS33A wykazano w przypadku obu opisanych wariantów MPSPS, jednak w obu przypadkach białko zachowało swoją aktywność biochemiczną, co wskazuje na to, że za powstające objawy odpowiedzialna jest obniżona ilość białka, spowodowana nadmierną jego degradacją w proteasomie, a nie brak jego aktywności. [Pavlova et al. 2022; Terawaki et al. 2025]. Kolejne badania wskazały, że za patomechanizm MPSPS może być odpowiedzialny zaburzony transport endosomalny, który spowodowany jest obniżonym poziomem białka VPS33A, a co za tym idzie GAG nie są efektywnie dostarczane do lizosomów w celu ich degradacji [Cyske et al. 2024a – **Artykuł nr 2**; Cyske et al. 2025b – **Artykuł nr 3**; Terawaki et al. 2025]. Takie badania zostały już wcześniej przeprowadzone na komórkowym (MPS I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IVA, IVB, VI, VII, IX) oraz mysim modelu MPSI i wskazały na znaczne zaburzenia w transporcie pęcherzykowym, a także na poprawę tych parametrów po zastosowaniu genisteiny [Gaffke et al. 2023]. Jeśli przedstawiona hipoteza byłaby prawdziwa, powinny nastąpić istotne zmiany w poziomach białek zaangażowanych w transport pęcherzykowy w MPSPS, a także w wybranych organellach komórkowych.

W związku z brakiem poznania dokładnego patomechanizmu, bardzo ograniczoną wiedzą na temat zaburzeń komórkowych w MPSPS oraz potrzebą opracowania skutecznego leku uzasadnionym

jest zbadanie jakie procesy komórkowe mogą być upośledzone w MPSPS, co doprowadzić może do poznania dokładnego mechanizmu powstawania choroby oraz potencjalnych leków na MPSPS.

Dlatego celem mojej rozprawy doktorskiej stało się:

- 1) Określenie jakie procesy komórkowe są zaburzone w MPSPS, a co za tym idzie poznanie patomechanizmu choroby**
- 2) Przetestowanie dwóch związków naturalnych - ambroksolu i genisteiny, jako potencjalnych leków dla pacjentów z MPSPS**

W pracy wykorzystywałam komórki skórne – fibroblasty, pobrane od jedynej polskiej pacjentki z MPSPS z homozygotycznym wariantem c.599G>C (p.Arg200Pro) genu *VPS33A*. Nie miałam możliwości uzyskania większej liczby linii komórkowych MPSPS z uwagi na niezwykle małą liczbę pacjentów (jedynie kilkadziesiąt na świecie), bardzo dużą odległość i izolację geograficzną większości z nich (chorzy głównie zamieszkują regiony Jakucji – Syberii), a także niezwykle krótką długość życia chorych (większość umiera przed ukończeniem 2. roku życia). Te, a także wiele innych problemów związanych z chorobami rzadkimi zostały szerzej omówione w artykule Cyske et al. 2025 [Cyske et al. 2025a - **Artykuł nr 1**]. Jako kontrolę wybrałam komórki skórne pobrane od osoby zdrowej odpowiadającej wiekiem i płcią badanej pacjentce. W części doświadczeń zostały również wykorzystane linie komórkowe pobrane od pacjentów z chorobą Sanfilippo, jako porównanie do opisanych już i lepiej poznanych zaburzeń komórkowych w MPS.

- 1) Określenie jakie procesy komórkowe są zaburzone w MPSPS, a co za tym idzie poznanie patomechanizmu choroby**

Aby przetestować hipotezę mówiącą o zaburzonym transporcie endosomalnym GAG, wynikającym z obniżonej ilości białka VPS33A i nieefektywnego dostarczania ich do lizosomów, w pierwszej kolejności określiłam poziom samych GAG w komórkach MPSPS z wariantem p.Arg200Pro genu *VPS33A* w komórkach kontrolnych oraz pacjenta cierpiącego na chorobą Sanfilippo (MPSIII). Eksperymenty, z wykorzystaniem metody dot-blotting, wykazały znacznie podwyższony poziom siarczanu heparanu (HS) w komórkach MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych. Zwizualizowałam również wewnątrzkomórkową lokalizację HS, co okazało się niezwykle interesujące, ponieważ obraz uzyskany po wybarwieniu komórek MPSPS znacznie różnił się o tego uzyskanego z komórek MPS III. Mianowicie, w MPS III HS był widoczny w postaci wielu skupisk według wcześniejszych danych literaturowych można sądzić, że są to agregaty HS w lizosomach natomiast w przypadku MPSPS HS był rozproszony równomiernie po całej komórce. Taki obraz może wskazywać na zaburzony transport i dostarczanie GAG do lizosomów.

Wcześniejsze badania, zarówno z wykorzystaniem wariantu p.Arg200Pro jak i p.Arg498Trp, wskazywały na obniżoną ilość białka VPS33A w MPSPS [Pavlova et al. 2022; Terawaki et al. 2025]. Zbadałam więc poziom tego białka w fibroblastach pobranych od polskiej pacjentki w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Stwierdziła drastycznie, bo o ponad 80%, obniżenie poziomu białka VPS33A w komórkach MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych. Wykorzystując metodę mikroskopii fluorescencyjnej również wykazałam zmniejszoną intensywność fluorescencji tego białka. Białko VPS16, tak samo jak VPS33A, jest jedną z podjednostek kompleksów HOPS i CORVET. Białka te ściśle ze sobą oddziałują, dlatego określiłam również tego białka. Podobnie do wcześniejszego doświadczenia określającego poziom białka VPS33A, stwierdziłam także obniżony poziom białka VPS16 w MPSPS

Mikroskopia elektronowa pozwala na szerokie spojrzenie na ogólną morfologię komórki. Dla wcześniej opisanych typów/podtypów MPS, w obrazie tym, charakterystyczne są struktury „skórki cebuli” oraz „ciała zebrowate”, są to specyficzne obrazy po których rozpoznać można lizosomy, w których zakumulowane są nierozłożone GAG [Piotrowska et al. 2006]. Dla pełnego oglądu komórek MPSPS wykonałam takie samo badanie, które wykazało znacznie podwyższoną Liczbę pęcherzyków o zmienionej strukturze w porównaniu do komórek kontrolnych. Jeśli jednak teoria mówiąca o zaburzonym transporcie pęcherzykowym jest prawdziwa, nie ma pewności czy na obrazie mikroskopowym widoczne pęcherzyki są lizosomami, jak w innych typach MPS, czy endosomami. Żeby odpowiedzieć na to pytanie wybarwiłam lizosomy z wykorzystaniem barwnika LysoTracker. Doświadczenia wykazały znacznie silniejszy sygnał w komórkach MPSPS niż w komórkach kontrolnych. Może to dowodzić zwiększonej liczbie lizosomów, jednak wcześniejsze eksperymenty dowiodły, że w MPSPS lizosomy są nadmiernie zakwaszone [Kondo et al. 2017; Pavlova et al. 2022], a wiadomym jest że barwnik LysoTracker wykazuje wyższe powinowactwo do organelli o niższym pH. Dlatego zadałam pytanie czy lizosomy są liczniejsze czy jedynie nadmiernie zakwaszone. Do uzyskania odpowiedzi wykorzystałam białko LAMP2, białko błonowe lizosomów i jeden z najczęstszych markerów w badań lizosomów. Zarówno poziom tego białka jak i intensywność fluorescencji była podwyższona na tej podstawie można stwierdzić, że lizosomy są liczniejsze w MPSPS, niezależnie od większego ich zakwaszenia.

Biorąc pod uwagę „rozsiany” obraz HS uzyskany z analiz mikroskopii fluorescencyjnej postawiłam pytanie czy GAG są efektywnie dostarczane do lizosomów w celu ich degradacji. Dlatego też określiłam kolokalizację lizosomów z HS w MPSPS oraz w MPS III i wykazałam, że w przypadku MPS III kolokalizacja była na znacznie wyższym poziomie niż w komórkach kontrolnych, jednak w MPSPS różnic tych nie było. Może to wskazywać, że GAG nie są dostarczane do lizosomów i mimo, że enzymy lizosomalne działają prawidłowo, GAG nie mogą być rozłożone. Niezwykle ciekawy okazał się kolejny eksperyment pokazujący kolokalizację HS z białkiem LAMP1, kolejnym białkiem błonowym lizosomów, w którym wynik był odwrotny. Mianowicie, kolokalizacja HS/LAMP1 była znacznie

podwyższona w MPSPS w porównaniu z komórkami kontrolnymi, natomiast w MPS III obniżona. Mogłoby się to wydawać sprzeczne z poprzednim eksperymentem, jednak w literaturze opisane są badania mówiące o tym, że białko LAMP1 znajduje się również we wczesnych i późnych endosomach [Cook et al. 2004]. Zatem prawdopodobne jest, że GAG zostają uwięzione w endosomach i nie są transportowane do lizosomów w celu degradacji.

Skoro białko VPS33A bierze udział w dojrzewaniu endosomów i ich transporcie do lizosomów [Wartosch et al. 2015; Marwaha et al. 2017; Kümmel et al. 2022], to zgodnie z testowaną hipotezą, poziom markerów endosomalnych powinien być podwyższony w komórkach MPSPS. Markerem wczesnych endosomów jest białko EEA1, które jest niezbędne do sortowania wczesnych i późnych endosomów, a także do sortowania na etapie wczesnych endosomów [Yap i Winckler 2022]. Podwyższony poziom tego białka oraz intensywność fluorescencji wykazałam w komórkach MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych, stosując odpowiednio metodę western-blotting oraz mikroskopię fluorescencyjną. W tym przypadku również uzyskany wynik potwierdza postawioną hipotezę, a dodatkowo jest on zgodny z eksperymentami przeprowadzonymi przez inny zespół na komórkach pacjenta z tą samą mutacją [Pavlova et al. 2022]. Idąc dalej tym tropem sprawdziłam poziom białka Rab7, które można uznać za marker późnych endosomów, ponieważ jest niezbędne do transportu późnych endosomów oraz do ich dostarczenia do lizosomów. Również ten eksperyment wykazał podwyższony poziom tego białka, a także analizy mikroskopowe potwierdziły zwiększoną intensywność fluorescencji tego białka.

Wracając do wspomnianego powyżej założenia zakładającego, że HS gromadzi się w endosomach i nie może zostać przetransportowany do lizosomów, określiłam kolokalizację HS z białkiem EEA1. Na podstawie wyników, które uzyskałam, można stwierdzić zdecydowanie podwyższoną kolokalizację HS/EEA1 w komórkach MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych, co potwierdza postawioną hipotezę. Jednak nie można nie zwrócić uwagi na poziom kolokalizacji HS/EEA1 w MPS III, który był jeszcze wyższy niż w MPSPS, natomiast badania mówiące o wtórnym defekcie transportu pęcherzykowego w MPS zostały już wcześniej przeprowadzone [Gaffke et al. 2023]

2) Przetestowanie dwóch związków naturalnych - ambroksolu i genisteiny, jako potencjalnych leków dla pacjentów z MPSPS

MPSPS jak dotąd jest chorobą nieuleczalną, a z uwagi na niezwykle małą liczbę pacjentów oraz bardzo krótką długość ich życia, opracowanie skutecznej terapii wydaje się być ogromnym wyzwaniem dla współczesnej nauki. Potencjalna terapia dla MPSPS musiałaby skupiać się na korygowaniu pierwotnych defektów molekularnych, ale oprócz tego również być bezpieczna w długoterminowym użyciu.

Wytypowałam dwa związki naturalne, które potencjalnie mogłyby stać się lekami dla MPSPS: ambroksol (4-((2-amino-3,5-dibromofenilo)metyloamino)cykloheksan-1-ol) oraz genisteina (5,7-dihydroksy-3-(4-hydroksyfenilo)-4H-1-benzopirany-4-on). W związku z tym, że oba były opisywane jako inhibitory degradacji białek – odpowiednio degradacji związanej z siateczką śródplazmatyczną (ERAD) oraz degradacji proteasomalnej. Oba związki mają również właściwości przeciwzapalne oraz antyoksydacyjne, a także indukują proces autofagii [Dhanve et al. 2023; Cyske et al. 2024b; Ponugoti et al. 2024; Borah et al. 2025; Goswami et al. 2025; Pierzynowska et al. 2025], ale ambroksol łagodzi też stres endoplazmatyczny i hamuje degradację ERAD [Bendikov-Bar et al. 2011; Dhanve et al. 2023], natomiast genisteina hamuje degradację proteasomalną poprzez modulację ubiquitynacji białek [Pierzynowska et al. 2020]. Zgodnie z wymaganiem stawionym lekom, które należy przyjmować przez całe życie, udowodniono, że oba związki są bezpieczne w długoletnim stosowaniu [Kim et al. 2013; Ghosh et al. 2021; Ponugoti et al. 2024]. Na podstawie powyższych danych wybrałam ambroksol i genisteinę jako potencjalne leki na MPSPS, a w przyszłości również na inne choroby związane z niestabilnością białek i zaburzeniami transportu endosomalnego, a także biorąc pod uwagę inne mechanizmy hamowania proteolizy przez ambroksol i genisteinę, określiłam czy zastosowanie terapii kombinowanej będzie skuteczniejsze niż wykorzystanie każdego związku osobno.

Pierwszym i jednym z najważniejszych parametrów przy poszukiwaniu nowych leków jest bezpieczeństwo. Dlatego takie doświadczenie było pierwszym, które wykonałam dla ambroksolu i genisteiny jako potencjalnych leków na MPSPS, mimo, że oba związki są już wykorzystywane od wielu lat w medycynie. Na podstawie wcześniejszych danych literaturowych wybrałam stężenia 100 μ M dla ambroksolu i 50 μ M dla genisteiny, które efektywnie hamują proteolizę [Bendikov-Bar et al. 2011; Pierzynowska et al. 2020]. Na podstawie testu żywotności komórek (MTT) wykazałam, że oba związki są bezpieczne dla komórek MPSPS we wskazanych powyżej stężeniach.

Głównym problemem w przypadku MPSPS okazał się obniżony poziom białka VPS33A, co prowadzi do nieefektywnego transportu pęcherzykowego i uwięzienia GAG w endosomach. Potencjalny lek powinien więc podnosić poziom tego białka. Badania, które przeprowadziłam wykazały 4-krotnie obniżony poziom białka VPS33A w komórkach MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych. Natomiast podanie ambroksolu, genisteiny lub ich kombinacji spowodowało wzrost poziomu tego białka. Zastosowanie mieszaniny obu związków okazało się najbardziej efektywne i poziom białka VPS33A osiągnął około 80% wartości kontrolnej. Porównywalny wynik uzyskałam dla białka VPS16, które jest ściśle związane z białkiem VPS33A. Oba te wyniki wskazują, że ambroksol i genisteina podwyższają poziom białek VPS33A i VPS16 poprzez obniżenie aktywności ERAD (ambroksol) i proteasomu (genisteina) [Bendikov-Bar et al. 2011; Pierzynowska et al. 2020].

Eksperymenty, które przeprowadziłam potwierdziły znacznie podwyższony (około 3-krotnie) poziom HS w komórkach MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych [Cyske Z et al. 2025b –

Artykuł nr 3]. Natomiast zastosowanie ambroksolu, genisteiny oraz ich mieszaniny obniżyło poziom HS, nawet do poziomu zanotowanego w komórkach kontrolnych. Aby określić czy degradacja HS zachodzi przez szlak lizosomalny zastosowałam chlorochinę (inhibitor, który blokuje fuzję autofagosomu z lizosomem). Eksperymenty potwierdziły, że po zastosowaniu chlorochiny w stężeniu 10 μ M zaobserwować można bardzo wysokie poziomy HS, niezależnie od obecności ambroksolu i genisteiny. Wynik ten wskazuje, że degradacja GAG w komórkach MPSPS po użyciu ambroksolu i genisteiny zachodzi przez szlak lizosomalny.

Wiadomo już że w MPSPS zaburzenia występują również w lizosomach, więc ponownie określiłam ich liczbę oraz intensywność fluorescencji z w wykorzystaniem barwnika LysoTracker, tym razem jednak określiłam również wpływ ambroksolu i genisteiny na te parametry. Wykazałam, że liczba lizosomów oraz intensywność ich fluorescencji jest znacznie podwyższona w MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych, a leczenie ambroksolem, genisteiną oraz ich mieszaniną skutecznie obniżało liczbę lizosomów, natomiast zastosowanie mieszaniny obu związków najskuteczniej redukowało intensywność fluorescencji w MPSPS.

Aby potwierdzić normalizację transportu GAG do lizosomów określiłam kolokalizację HS z lizosomami (barwnik LysoTracker). Eksperymenty ponownie wykazały znacznie obniżony poziom ich kolokalizacji w komórkach MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych, ale także wzrost tego parametru po zastosowaniu ambroksolu, genisteiny oraz ich mieszaniny, przy czym zastosowanie mieszaniny obu związków było najbardziej efektywne. Badając kolokalizację HS z LAMP2, białkiem błonowym lizosomów, zauważyć można obniżony poziom kolokalizacji w MPSPS w porównaniu do kontroli, ale również wzrost do poziomu porównywalnego z kontrolą po zastosowaniu mieszaniny ambroksolu i genisteiny. Badania, które przeprowadziłam wcześniej sugerują, że w MPSPS GAG są uwięzione w endosomach z powodu wadliwego transportu endosomalnego [Cyske Z et al. 2025b]. Ponownie określiłam poziom białka EEA1 oraz jego kolokalizację z HS, co pokazało, że poziom białka EEA1 jest znacznie podwyższony w MPSPS w porównaniu do komórek kontrolnych, jednak zastosowanie ambroksolu, genisteiny oraz ich mieszaniny spowodowało normalizację do poziomu nieodróżnialnego od kontroli. Wynik ten wskazuje na poprawę wydajności transportu pęcherzykowego w MPSPS po zastosowaniu terapii. Wniosek ten dodatkowo potwierdza określenie kolokalizacji HS z białkiem LAMP1 (jak wspomniałam wcześniej białko to znajduje się zarówno w lizosomach jak i endosomach) [Cook et al. 2024]. Eksperyment ten wykazał, jak poprzednio, zwiększoną kolokalizację HS/LAMP1 w komórkach MPSPS w porównaniu z kontrolą, ale również normalizację tego poziomu po zastosowaniu mieszaniny ambroksolu i genisteiny. Po raz kolejny wyniki wskazują zatem na słuszność założeń hipotezy o wadliwym transporcie endosomalnym GAG oraz na poprawę jego wydajności po zastosowaniu ambroksolu, genisteiny, a w szczególności ich mieszaniny.

Oprócz poziomu białka EEA1 (markera wczesnych endosomów) określiłam również poziom markerów późnych endosomów – białka Rab5 i Rab7. Białko Rab5 zaangażowane jest w dojrzewanie endosomów [Nagano et al. 2019], natomiast Rab7 jest niezbędne w transporcie endosomalnym i dostarczaniu makrocząsteczek do lizosomów [Marwaha et al. 2017; Mulligan i Winckler 2023]. Poziomy obu białek markerowych dla późnych endosomów były podwyższone w MPSPS w porównaniu do kontroli, a zastosowanie mieszaniny ambroksolu i genisteiny powodowało normalizację tego parametru do poziomu kontroli (w przypadku Rab7) lub poprawę parametru (w przypadku Rab5).

Eksperymenty przeprowadzone przez inne zespoły [Terawaki et al. 2025] wskazały, że autofagia nie jest upośledzona w wariancie p.Arg498Trp MPSPS. Natomiast wyniki badań, które uzyskałam niedawno jasno pokazują, że proces ten jest zaburzony w wariancie p.Arg200Pro MPSPS [Cyske Z et al. 2025b]. Zarówno ambroksol jak i genisteina są znanymi induktorami procesu autofagii, określiłam ich wpływ na stymulację tego procesu w MPSPS w wariancie p.Arg200Pro. Określiłam poziom białka LC3-II (markera procesu autofagii) i stwierdziłam, że zarówno ambroksol jak i genisteina znacząco zwiększają poziom tego białka, co wskazuje na skuteczną stymulację autofagii, a proces ten jest najbardziej efektywny po zastosowaniu mieszaniny obu związków. Degradacja zakumulowanego materiału białkowego jest niezwykle ważna w kontekście potencjalnej terapii MPSPS, dlatego indukcja procesu autofagii przez ambroksol i genisteinę jest niezwykle pomocna w kontekście opracowania potencjalnej terapii z wykorzystaniem tych związków.

Rezultaty moich badań opisanych w tym rozdziale zostały przedstawione w manuskrypcie artykułu, który został przesłany do redakcji czasopisma *Mammalian Genome* i w momencie składania tej rozprawy doktorskiej znajdował się w recenzjach [Cyske et al. – **Artykuł nr 4**].

Wnioski

Niniejsza praca doktorska dostarcza dowodów eksperymentalnych popierających hipotezę o zaburzonym transporcie endosomalnym, spowodowanym przez obniżony poziom białka VPS33A, co jest podstawą molekularnego mechanizmu MPSPS. Terapia z wykorzystaniem ambroksolu i genisteiny, którą proponuję jako potencjalnie skuteczną w leczeniu MPSPS, skutkuje podwyższeniem poziomu białka VPS33A, co poprawia prawie wszystkie zaburzone parametry lub nawet normalizuje je do poziomu nieodróżnialnego od kontroli. Zaproponowana terapia w przyszłości ma potencjał stać się przydatna również w leczeniu innych chorób związanych z niestabilnością białek i zaburzonym transportem endosomalnym.