

**„Identyfikacja czynników genetycznych, biochemicznych i komórkowych
wpływających na przebieg mukopolisacharydoz ze szczególnym uwzględnieniem
choroby Sanfilippo”**

mgr Karolina Joanna Wiśniewska

Mukopolisacharydozy (MPS) to heterogenna grupa dziedzicznych zaburzeń metabolicznych, klasyfikowanych jako lizosomalne choroby spichrzeniowe. Główną przyczyną MPS są mutacje w genach kodujących enzymy lizosomalne, które odpowiadają za rozkład glikozoaminoglikanów (GAG). W wyniku niedoboru lub całkowitego braku aktywności tych enzymów dochodzi do akumulacji GAG w komórkach różnych tkanek i narządów, co z kolei prowadzi do ich stopniowego uszkodzenia i dysfunkcji. MPS charakteryzują się szerokim spektrum objawów klinicznych, takich jak dysmorfia twarzy, niski wzrost, deformacje kostne, przewlekłe bóle stawowe, hepatosplenomegalia, zmętnienie rogówki, niedosłuch, trudności oddechowe oraz powikłania sercowo-naczyniowe.

Do niedawna wyróżniano 11 typów i podtypów MPS, klasyfikowanych na podstawie rodzaju spichrzanego GAG oraz enzymu, którego dotyczy defekt. W ostatnich latach opisano nowo odkryte, ultraradkie jednostki o fenotypie MPS: MPS X oraz tzw. syndrom MPS-plus. MPS X jest spowodowana mutacją w genie *ARSK*, kodującym arylosulfatazę K, co prowadzi do akumulacji siarczanu dermatanu. Z kolei syndrom MPS-plus (MPS-PS) jest zaburzeniem o fenotypie zbliżonym do MPS, w którym obserwuje się podwyższony poziom GAG, jednak bez defektu któregośkolwiek ze znanych enzymów lizosomalnych degradujących GAG. Patomechanizm choroby pozostaje nie do końca poznany, mimo zidentyfikowania mutacji w genie *VPS33A*, którego produkt uczestniczy w szlakach endocytozy i autofagii. Ze względu na brak klasycznego defektu enzymu degradującego GAG oraz pewne różnice w obrazie klinicznym (min. zaburzenia czynności nerek i nieprawidłowości układu hematopoetycznego), syndrom MPS-plus nie jest obecnie włączany do formalnej klasyfikacji MPS, lecz zaliczany do tzw. „chorób podobnych do MPS” (ang. *MPS-like disorders*). Aktualny podział obejmuje więc 12 „klasycznych” typów i podtypów MPS, które wraz z ich charakterystyką przedstawiono w Tabeli 1.

Dodatkowo MPS można podzielić na typy neuropatyczne (MPS I, II, III oraz VII), w których dominują objawy neurologiczne oraz formy nieneuropatyczne (IV, VI, IX oraz X), gdzie funkcje układu nerwowego pozostają nienaruszone. Objawy neuropatyczne pojawiające się w przypadku ciężkich postaci MPS I i II, wszystkich podtypach MPS III

oraz w MPS VII obejmują zaburzenia poznawcze, agresję, hiperaktywność, zaburzenia rytmu dobowego, bezsenność, padaczkę, drgawki, trudności w mowie, utratę słuchu i zmiany osobowości.

Tabela 1. Charakterystyka opisanych dotychczas typów/podtypów MPS.

Typ/podtyp MPS	Nazwa zwyczajowa	Zmutowany gen	Spichrzany GAG	Komponenta neurodegeneracyjna
MPS I	Zespół Hurler, Scheie lub Hurler-Scheie	<i>IDUA</i>	Siarczan dermatanu, siarczan heparanu	Tak (ciężkie przypadki)
MPS II	Zespół Huntera	<i>IDS</i>	Siarczan dermatanu, siarczan heparanu	Tak (ciężkie przypadki)
MPS IIIA	Zespół Sanfilippo	<i>SGSH</i>	Siarczan heparanu	Tak
MPS IIIB		<i>NAGLU</i>		
MPS IIIC		<i>HGSNAT</i>		
MPS IIID		<i>GNS</i>		
MPS IVA	Zespół Morquio	<i>GALNS</i>	Siarczan keratanu	Może wystąpić w skutek drugo- i trzeciorzędowych zaburzeń
MPS IVB		<i>GLB1</i>	Siarczan keratanu, siarczan chondroityny	
MPS VI		<i>ARSB</i>	Siarczan dermatanu	
MPS VII	Zespół Sly	<i>GUSB</i>	Siarczan dermatanu, siarczan heparanu, siarczan chondroityny	Tak
MPS IX	Zespół Natowicza	<i>HYAL1</i>	Kwas hialuronowy	Nie
MPS X	-	<i>ARSK</i>	Siarczan dermatanu	Dane niejednoznaczne

Diagnostyka w kierunku MPS po zauważeniu objawów mogących sugerować chorobę metaboliczną, rozpoczyna się od analizy biochemicznej, w której wykrywa się nadmiar GAG wydalanego z moczem. Potwierdzenie diagnozy wymaga oceny aktywności specyficznych enzymów lizosomalnych w leukocytach lub fibroblastach pacjenta. Współczesne techniki molekularne umożliwiają identyfikację mutacji w genach, których dysfunkcje warunkują każdy typ MPS, co pozwala na precyzyjne określenie typu/podtypu choroby i podjęcie odpowiedniego leczenia, jeśli takie jest dostępne. Proces diagnostyczny jest jednak niezwykle trudny i czasochłonny ze względu na rzadkie występowanie tych chorób, zróżnicowany obraz kliniczny (zarówno między poszczególnymi typami jak i w obrębie jednego typu), postępujący i wielonarządowy/układowy charakter choroby. Ze względu na rzadkość występowania, rozwój objawów w różnym czasie i ich podobieństwo do innych (częstszych) chorób, MPS są często błędnie diagnozowane. Najczęściej rozpoznawane są jako zaburzenia neurologiczne (tj.: zaburzenia ze spektrum autyzmu, nadpobudliwość psychoruchowa

czy niepełnosprawność intelektualna), choroby reumatologiczne i ortopedyczne (tj.: młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, choroba Perthesa, krzywica czy dystrofia mięśniowa). Postawienie prawidłowej diagnozy może trwać nawet latami, a samo rozpoznanie MPS to wciąż jedynie połowa sukcesu. Ważną częścią procesu diagnostycznego jest prawidłowa identyfikacja typu/podtypu choroby w znacznym stopniu rzutująca na planowanie/dostępność terapii. Problemy diagnostyczne pacjentów z MPS, choroby z którymi mogą być one mylone, a także sposoby zapobiegania temu zjawisku, opisane zostały przeze mnie i współautorów w artykule przeglądowym [Wiśniewska K, Wolski J, Gaffke L, Cyske Z, Pierzynowska K, Węgrzyn G. \(2022\) Misdiagnosis in mucopolysaccharidoses. *Journal of Applied Genetics*; 63\(3\):475-495.](#)

Zarejestrowane metody leczenia MPS obejmują przede wszystkim enzymatyczną terapię zastępczą (ERT, ang. *enzyme replacement therapy*) oraz przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT, ang. *hematopoietic stem cell transplantation*). ERT polega na podawaniu brakującego enzymu w celu zmniejszenia spichrzenia GAG, co łagodzi niektóre objawy somatyczne. Stosowana jest w praktyce klinicznej w MPS I, MPS II, MPS IVA, MPS VI i MPS VII. Nie wpływa ona jednak na objawy neurologiczne (z uwagi na brak możliwości przekraczania bariery krew-mózg przez cząsteczkę enzymu) oraz zaburzenia układu kostno-szkieletowego (brak możliwości dotarcia enzymu do kości i chrząstek). HSCT, polegająca na przeszczepieniu prawidłowych krwiotwórczych komórek macierzystych w celu odbudowy układu krwiotwórczego i odpornościowego pacjenta, stosowana jest najczęściej u najmłodszych pacjentów z MPS I i II. Prowadzone są badania nad wieloma innymi podejściami terapeutycznymi, które pozostają na razie w fazie badań klinicznych lub przedklinicznych. Obejmują one terapię genową, terapię redukcji syntezy substratu (SRT, ang. *substrate reduction therapy*) lub terapię molekularnymi chaperonami. Należy zaznaczyć, że dostępne metody terapeutyczne są leczeniem objawowym (za wyjątkiem terapii genowej), w dodatku ich możliwości są mocno ograniczone, a efekty nie są w pełni zadowalające.

Długo uważano, że magazynowane GAG są główną, a nawet jedyną, przyczyną MPS. Jednak fakt, że żadna z terapii ukierunkowanych na obniżenie poziomu GAG (ERT, SRT, terapia genowa) nie prowadziła do całkowitej korekty objawów zaczęła budzić wątpliwości co do mechanizmów zaburzeń obserwowanych w przebiegu MPS. Uwagę zwróciło również szerokie spektrum objawów występujące pomiędzy pacjentami różnych typów. Przykładem takiej zmienności klinicznej może być MPS III

charakteryzująca się neurodegeneracją, ciężkimi objawami neuropsychiatrycznymi i stosunkowo łagodną komponentą somatyczną oraz MPS IV charakteryzująca się prawidłowym rozwojem ośrodkowego układu nerwowego (OUN) ale równocześnie ciężkimi schorzeniami kości i stawów. Nawet jeśli tak duża zmienność objawów może wynikać ze spichrzania różnego rodzaju GAG (co nie jest wykluczone) to w MPS I i MPS II, w których gromadzą się te same rodzaje GAG (siarczan dermatanu i heparanu), ich cechy biochemiczne oraz objawy mogą się znacząco różnić. Dla przykładu, zmętnienie rogówki pojawia się u pacjentów z MPS I, ale nie z MPS II. Natomiast zmiany skórne (charakterystyczne grudki) są obecne w MPS II, a nieobecne w MPS I. Także nadpobudliwość i agresywne zachowania są jedną z cech charakterystycznych dla pacjentów z neuropatycznym typem MPS II, ale nie MPS I, gdzie jeśli nawet występuje znaczny niedobór poznawczy, to pacjenci są łagodni i spokojni.

Uwagę należy zwrócić również na MPS typu III (choroba Sanfilippo), na którą położono szczególny nacisk w obrębie przedstawionej rozprawy doktorskiej. MPS III jako jedna z dwóch typów MPS (obok MPS IV) podzielona została na podtypy (MPS III A, B, C i D) z uwagi na podłoże genetyczne, deficyt innego enzymu lizosomalnego, jednak prowadzący do spichrzania tego samego GAG (w MPS III siarczanu heparanu). Podobnie jak w opisanym powyżej przypadku MPS I i II, pacjenci MPS III różnych podtypów potrafią znacząco się różnić klinicznie. Zaburzenia ze spektrum autyzmu występują u prawie 30% pacjentów z MPS IIIA i tylko u 8% pacjentów z MPS IIIC. Padaczka występuje u 17% pacjentów z MPS IIIA i 8% pacjentów z MPS IIIC. Podobnie, cechy dysmorfii twarzy i powiększenie wątroby, występują odpowiednio u 94% i 56% pacjentów z MPS IIIB oraz 85% i 39% pacjentów z MPS IIIC. Podtypy te ewidentnie różnią się także wiekiem pierwszego wystąpienia poszczególnych objawów. 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 pacjentów również wykazuje znaczne zróżnicowanie i wynosi 15-18 lat dla MPS IIIA, 17-19 lat dla MPS IIIB i 19-34 lat dla MPS IIIC (brak dostępnych danych dla MPS IIID).

Wszystkie dotychczasowe obserwacje wskazują, że akumulacja glikozoaminoglikanów (GAG) jest procesem kluczowym dla patogenezy MPS, jednak nie może być jedynym czynnikiem determinującym obraz kliniczny. Również resztkowa aktywność enzymu lizosomalnego, choć istotna dla ogólnej ciężkości choroby – łagodniejsze postacie w przypadku zachowanej częściowej aktywności, cięższe przy jej całkowitym braku – nie wyjaśnia dużej zmienności fenotypowej pomiędzy pacjentami.

Podobnie, różnice w rodzaju gromadzonych GAG są faktem biochemicznym, ale same w sobie nie tłumaczą, dlaczego poszczególne typy i podtypy MPS manifestują się tak odmiennym zakresem i dynamiką objawów, szczególnie w odniesieniu do układu nerwowego.

Coraz więcej badań wskazuje, że przebieg MPS jest modulowany przez dodatkowe procesy komórkowe i molekularne, które mogą działać niezależnie od akumulacji GAG lub rozwijać się wtórnie do niej. Należą do nich m.in. zaburzenia równowagi redoks, przewlekła aktywacja odpowiedzi zapalnej, stres oksydacyjny czy zakłócenia w regulacji ekspresji genów. Mechanizmy te mogą w istotny sposób modyfikować przebieg choroby, wpływając na różnorodność objawów i tempo ich progresji.

W związku z tym **celem mojej pracy doktorskiej była identyfikacja czynników genetycznych, biochemicznych i komórkowych, które mogą modulować przebieg MPS, ze szczególnym uwzględnieniem choroby Sanfilippo**. Podejście to ma na celu lepsze zrozumienie, dlaczego pacjenci z teoretycznie tym samym defektem enzymatycznym i typem spichrzanego GAG mogą prezentować tak odmienny obraz kliniczny.

Badania prowadziłam głównie na modelu fibroblastów skóry pobranych od pacjentów ze wszystkimi typami/podtypami MPS opisanymi do 2020 roku (kiedy rozpoczynałam badania). Charakterystykę wykorzystywanych linii komórkowych przedstawiłam w **Tabeli 2**.

Tabela 2. Charakterystyka wykorzystanych linii komórkowych

Typ MPS	Defektywny enzym	Typ mutacji	Nr. katalogowy **
MPS I	α -L-iduronidase	p.Trp402Ter/p.Trp402Te	GM00798
MPS II	2-iduronate sulfatase	p.His70ProfsTer29	GM13203
MPS IIIA	N-sulfoglucosamine sulfhydrolase	p.Glu447Lys/p.Arg245His	GM00879
MPS IIIB	α -N-acetylglucosaminidase	p.Arg626Ter/p.Arg626Ter	GM00156
MPS IIIC	Acetyl-CoA: α -glycosaminide acetyltransferas	p.Gly262Arg/pArg509Asp	GM05157

MPS IIID	N-acetylglucosamine 6-sulfatase	p.Arg355Ter/p.Arg355Ter	GM05093
MPS IVA	N-acetylglucosamine-6-sulfate sulfatase	p.Arg386Cys/p.Phe285Ter	GM00593
MPS IVB	β -galactosidase	p.Trp273Leu/p.Trp509Cys	GM03251
MPS VI	N-acetylglucosamine-4-sulfatase (arylsulfatase B)	Not determined	GM03722
MPS VII	N-acetylgalactosamine 4-sulfatase	p.Trp627Cys/p.Arg356Ter	GM00121
MPS IX	Hyaluronidase	p.Glu268Lys/c.37bp-del;14bp-ins at nt 1361	GM17494
Linia kontrolna	N/A	N/A	N/A

*Numery katalogowe są zgodne z opisem linii komórkowej w Instytucie Coriell.

Chociaż fibroblasty mogą wydawać się nieoczywistym modelem do badania neurodegeneracji, mają one kilka istotnych cech wspólnych z neuronami. Oba typy komórek pochodzą z ektodermy, co sugeruje wspólne mechanizmy molekularne, w tym szlaki sygnałowe i procesy regulacji ekspresji genów. Cecha ta ma kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia patogenezy chorób neurodegeneracyjnych. Ponadto fibroblasty wykazują zaburzenia w szlakach komórkowych, takich jak stres oksydacyjny, autofagia i metabolizm, które są również istotnymi czynnikami w neurodegeneracji. Fibroblasty mogą odzwierciedlać ogólnoustrojowe zmiany komórkowe, które wpływają na funkcjonowanie neuronów, zwłaszcza w zaburzeniach genetycznych, w których konsekwencje mutacji pozostają niejasne. Co więcej, fibroblasty znajdują się w pobliżu naczyń krwionośnych, w oponach mózgowych oraz w splocie naczyniówkowym mózgu i rdzenia kręgowego, gdzie odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu funkcji OUN. Warto zauważyć też, że fibroblasty są łatwo dostępne dzięki minimalnie inwazyjnym procedurom, umożliwiającym regularne monitorowanie pacjentów, a ich stabilne hodowle ułatwiają długoterminowe badania, co czyni je cennym modelem do badań nad mechanizmami neurodegeneracyjnymi.

Część badań wykonałam również na tkankach pobranych z mysiego modelu MPS IIIB.

W badaniach nie uwzględniłam MPS X, typu MPS odkrytego dopiero po rozpoczęciu moich badań, a także syndromu MPS-plus-. Dostęp do komórek pacjentów

cierpiących na te dwa typy MPS nawet po rozpoczęciu projektu był ograniczony z uwagi na bardzo małą liczbę pacjentów (nie przekraczającą 30 na całym świecie) oraz na fakt, że większość z nich pochodzi z objętej konfliktem zbrojnym Rosji.

Jak wspomniałam wcześniej, MPS dzieli się na 12 typów/podtypów ze względu na rodzaj spierzchanego GAG jak i defektywny enzym. Dodatkowo, MPS można podzielić na typy neuronopatyczne (MPS I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, VII) i nieneuronopatyczne (MPS IV, VI, IX, X) ze względu na obecność/brak cech neurodegeneracji. Jest to o tyle ciekawy podział, że przy z pozoru tej samej przyczynie choroby jaką jest spichrzanie GAG, widać wyraźne zróżnicowanie w występowaniu objawów somatycznych i tych związanych z neurodegeneracją.

Obecnie nie ma możliwości jednoznacznego stwierdzenia, czy u pacjenta z MPS wystąpią objawy neurologiczne, a jeśli wystąpią trudno próbować prognozować tempo ich progresji czy stopień nasilenia. Możliwość przewidywania takiego komponentu miałaby istotne znaczenie dla pacjentów i ich rodzin. Po pierwsze, stwarzałoby to możliwość wczesnego zastosowania terapii ukierunkowanych na ochronę funkcji neurologicznych, w tym dokanałowej lub dokomorowej ERT oraz terapii genowej podawanej dokanałowo, aby bezpośrednio oddziaływać na ośrodkowy układ nerwowy. Po drugie, umożliwiłoby to lepsze planowanie opieki specjalistycznej i rehabilitacyjnej, co mogłoby poprawić jakość życia i spowolnić postęp objawów. Wczesne rozpoznanie ryzyka neurodegeneracji pomogłoby również w dostosowaniu oczekiwań i przygotowaniu opiekunów na specyficzne wyzwania związane z postępującymi zmianami neurologicznymi. Dlatego tak ważne jest poszukiwanie markerów neurodegeneracji w MPS.

Wykorzystując bibliotekę RNA-seq, opracowaną we wcześniejszych latach przez zespół, w którym wykonywałam badania, przeprowadziłam analizę transkryptomyczną mającą na celu wyselekcjonowanie genów, których zmiany poziomu ekspresji w stosunku do komórek kontrolnych są specyficzne wyłącznie dla neuronopatycznych typów/podtypów MPS (I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID i VII), przy jednoczesnym braku zmian poziomu ekspresji w typach nie-neuronopatycznych. Wyniki łącznie pokazały ponad 300 transkryptów, które mogą być związane z zaburzeniami układu nerwowego (dokładnie 322 unikalnych genów, których ekspresja jest znacząco zmieniona w co najmniej 2 neuronopatycznych typach/podtypach MPS, ale nie w typach nieneuronopatycznych). Do transkryptów ulegających zmianom w poziomie ekspresji w co najmniej 5

neuropatycznych typach/podtypach MPS (nie ulegając jednocześnie zaburzeniom poziomu ekspresji w typach nie-neuropatycznych) należą transkrypty o zwiększonej ekspresji np. *PDIA3* (kodujący izomerazę disiarczkową białek A3, PDIA3) jak i o obniżonej np. *ARL6IP6* (kodujący białko oddziałujące z GTPazą 6 podobne do ARF 6, ARL6IP6). Zaburzenia funkcji ARL6IP6 mogą prowadzić do nieprawidłowego różnicowania neuronów oraz zaburzeń homeostazy mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego. Ponadto, białko to pełni rolę w przetwarzaniu APP w β -amyloid. Zmniejszenie jego poziomu może zatem wyjaśniać wzrost poziomu β -amyloidu i jego prekursorów, a także ich tendencję do agregacji. Dane literaturowe dotyczące badań z użyciem mysiego modelu *PDIA3*^{-/-} wykazały, że brak *PDIA3* znacząco zmniejsza efektywność apoptozy, łagodzi stan zapalny i stres oksydacyjny, a ponadto poprawia funkcje poznawcze i zmniejsza objętość stłuczenia spowodowanego urazem w modelu urazowego uszkodzenia mózgu. Dodatkowo wykazano zależny od wieku wzrost poziomu PDIA3 w mózgowiu myszy z chorobą Alzheimera w przeciwieństwie do jego spadku wraz z wiekiem u myszy zdrowych. Dane te sugerują zdecydowanie, że wysoki poziom ekspresji *PDIA3* wykryty w przypadku przeprowadzonej analizy w komórkach neuropatycznych typów/podtypów MPS może więc także częściowo przyczyniać się do neurodegeneracji.

Opisane powyżej wyniki badań nad *ARL6IP6* i *PDIA3* oraz innymi genami, sugerujące możliwe zastosowanie ich jako biomarkerów neurodegeneracji w MPS, opisane zostały w artykule: [Wiśniewska K, Żabińska M, Szulc A, Gaffke L, Węgrzyn G, Pierzynowska K. \(2024\) The Role of Gene Expression Dysregulation in the Pathogenesis of Mucopolysaccharidosis: A Comparative Analysis of Shared and Specific Molecular Markers in Neuronopathic and Non-Neuronopathic Types of the Disease. *International Journal of Molecular Sciences*; 25\(24\):13447.](#)

Jako, że interesowały mnie badania z zakresu funkcjonowania całej komórki, podobnej analizy dotyczącej mechanizmów neurodegeneracji dokonałam z podziałem na funkcjonowanie poszczególnych organelli komórkowych. Przy użyciu metod transkryptomicznych zidentyfikowałam geny związane z funkcją i budową poszczególnych organelli komórkowych (na podstawie bazy danych Ensembl), których poziomy ekspresji są zmienione w neuropatycznych typach MPS w porównaniu z komórkami kontrolnymi, pozostając niezmienionymi w nieneuropatycznych typach MPS. Ta analiza wskazała, że geny, których ekspresja jest zaburzona w neuropatycznym

typie MPS, często są związane ze strukturami lub funkcjami jądra komórkowego, retikulum endoplazmatycznego lub aparatu Golgiego. Doświadczenia z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej oraz elektronowej potwierdziły zaburzenia głównie w obrębie aparatu Golgiego, które pojawiały się znacznie częściej w komórkach pobranych od pacjentów neuropatycznych. Wyniki tych analiz przedyskutowano oraz porównano z tymi występującymi w innych chorobach neurodegeneracyjnych i zaburzeniach neurologicznych w artykule: [Wiśniewska K, Gaffke L, Żabińska M, Węgrzyn G, Pierzynowska K. \(2024\) Cellular Organelle-Related Transcriptomic Profile Abnormalities in Neuronopathic Types of Mucopolysaccharidosis: A Comparison with Other Neurodegenerative Diseases. *Current Issues in Molecular Biology*; 46\(3\):2678-2700.](#)

W kolejnym etapie badań skupiłam się na dwóch typach MPS – MPS III i MPS IV. Wybór ten był podyktowany kilkoma czynnikami. Są to jedyne postacie MPS, w których podział na podtypy wynika z różnic w defekcie molekularnym, a nie jak w przypadku MPS I – z odmienności przebiegu klinicznego.

Szczególnie intrygujący stał się dla mnie typ MPS III, w którym dominują objawy ze strony OUN. W tym typie gromadzony jest jedynie siarczan heparanu (HS) – związek, którego akumulacja jest wiązana z neurodegeneracją również w innych chorobach, takich jak choroba Alzheimera. Neurodegeneracja jest również tym, co m.in. różni typ IVA i IVB. Zaburzenia układu nerwowego mogą pojawiać się w przebiegu MPS IVB chociaż dominują w nim zaburzenia układu szkieletowego. Z tych powodów MPS III i IV są wyjątkowo wartościowym punktem odniesienia w badaniach nad neurodegeneracją w MPS.

W pierwszej kolejności, wykorzystując dane transkryptomiczne uzyskane z modelu komórkowego, dokonałam selekcji tych genów, które ulegały znacząco różnej ekspresji pomiędzy podtypami MPS III. Liczba transkryptów ulegających zróżnicowanej ekspresji była największa pomiędzy podtypami IIIA vs. IIIB, IIIA vs. IIID, IIIB vs. IIID i IIIC vs. IIID i wynosiła aż ponad 400. Podobnej analizy dokonałam pomiędzy podtypami MPS IV (IVA i IVB), w których liczba transkryptów wykazujących zróżnicowaną ekspresję wynosiła poniżej 100. Procesy komórkowe, w których uczestniczą produkty wspomnianych transkryptów, w dużej mierze obejmują metabolizm komórkowy i jego regulację, ale także odpowiedź komórki na stymulację lub komunikację komórkową (zgodnie z bazą danych Ensembl). Część tych transkryptów

wykazało bardzo duże, bo ponad 16-krotne, różnice w poziomie ekspresji ($\log_2\text{fold change}$ [FC, krotność zmiany] >4 lub <-4), szczególnie pomiędzy MPS IIIA i IIID, MPS IIIB i IIIC oraz MPS IIIB i IIID. Do transkryptów tych należą cząsteczki mRNA pochodzące od genów, których produkty związane są z funkcjami rybosomów (*RPLP2*, *RPL23*, *RPL10*), utrzymaniem prawidłowej struktury tkanki łącznej (*COL4A1*, *COL4A2*, *COMP*), zaangażowane w sygnalizację wewnątrzkomórkową (*NME2*, *WISP2*, *SRFP1*) oraz receptory i czynniki komórkowe (*RARRES2*, *CRLF1*, *IGFBP5*, *TFPI2*).

Podczas gdy duża zmienność ekspresji genów warunkujących prawidłową funkcję tkanki łącznej nie jest zaskakująca (została już opisana w kontekście patologii MPS), znaczna liczba takich genów zaangażowanych w funkcje rybosomów jest nowym odkryciem. Rybosomy są kluczowymi organellami zaangażowanymi w ekspresję genów, a uzyskane wyniki sugerują znaczne zróżnicowanie w wydajności syntezy białek w ogóle, co może być przyczyną różnego przebiegu choroby u pacjentów z czterema podtypami MPS III. Co więcej, zaburzenia ekspresji genu *RPL10* wskazano także w innych schorzeniach neurologicznych np. zaburzeniach ze spektrum autyzmu, mikrocefalii sprzężonej z chromosomem X, syndromicznej niepełnosprawności intelektualnej sprzężonej z chromosomem X lub padaczce. Zatem obniżony poziom ekspresji tych genów, wykryty w MPS IIIA w porównaniu do MPS IIIC i IIID, w pewnym stopniu mógłby wyjaśniać częstsze występowanie zachowań autystycznych i cięższe epilepsje u dzieci z tym pierwszym podtypem choroby Sanfilippo niż w innych podtypach. Innym przykładem genu związanego z padaczką jest *RARRES2*, kodujący chemerynę, której wysoki poziom jest wykrywany we krwi dzieci z padaczką idiopatyczną jako czynnik prognostyczny. Przeprowadzone przeze mnie analizy transkryptomyczne wykazały, że poziom ekspresji tego genu jest podwyższony w MPS IIIA w porównaniu z IIID, a epilepsja występuje częściej w pierwszym wymienionym podtypie niż w innych. Jak już wspomniano, tak dużych zmian w poziomie ekspresji poszczególnych genów nie zaobserwowano pomiędzy fibroblastami MPS IVA i IVB. W rzeczywistości różnice fenotypowe między pacjentami z różnymi podtypami MPS IV są znacznie mniejsze niż między różnymi podtypami MPS III. Sugeruję zatem, że zmiany we wzorach ekspresji genów mogą warunkować zróżnicowanie przebiegu choroby u pacjentów cierpiących na różne podtypy MPS III. Artykuł [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](#) opisuje wyżej podsumowane rezultaty badań i wskazuje na

możliwość korelacji między globalnymi wzorami ekspresji genów a rozwojem różnych objawów u pacjentów cierpiących na różne podtypy MPS III.

W drugim etapie badań zajęłam się identyfikacją tych transkryptów, które ulegają wspólnym zmianom poziomu ekspresji w stosunku do komórek kontrolnych (pobranych od osób zdrowych) we wszystkich podtypach MPS III (IIIA, IIIB, IIIC i IIID) oraz IV (IVA i IVB). Nigdy wcześniej nie przeprowadzono analizy zaburzeń ekspresji genów wspólnych dla wszystkich podtypów MPS III i MPS IV. Wyniki tej analizy wskazały na 45 transkryptów o podobnych zmianach poziomu ekspresji we wszystkich podtypach MPS III oraz aż 150 takich transkryptów w obu podtypach MPS IV w stosunku do komórek kontrolnych. Identyfikując te transkrypty, które cechują się najwyższymi wartościami krotności zmiany ekspresji ($\log_2FC > 3$ lub < -3) zauważyłam trzy, które wykazywały wysoki poziom zmian ekspresji we wszystkich podtypach zarówno MPS III jak i MPS IV w porównaniu do komórek kontrolnych. Są to ulegające zwiększonej ekspresji geny *PFN1* oraz *MFAP5*, a także ulegający obniżonej ekspresji *MMP12*. Geny te kodują kolejno profilinę (PFN1), białko 5 związane z mikrofibrylami (MFAP5) oraz metaloproteazę macierzy 12 (MMP12). W komórkach wszystkich podtypów MPS III i IV przeprowadziłam immunodetekcję tych trzech białek technikami immunofluorescencyjnymi oraz western-blotting, która wskazała na wzrost poziomów PFN1 i MFAP5 w komórkach MPS III i IV oraz obniżenie poziomu MMP12 w komórkach MPS III. Ponieważ transkrypty te ulegały zmianom w poziomie ekspresji we wszystkich typach/podtypach MPS III, interesującym wydawało się zagadnienie zależności ich poziomu od poziomu spichrzanych GAG. Poziom GAG w komórkach MPS został obniżony przy pomocy jednego z flawonoidów, genisteiny, która hamuje autofosforylację receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), prowadząc ostatecznie do zahamowania ekspresji genów kodujących syntetazy GAG. W takich warunkach ponownie oceniono poziom białek PFN1, MFAP5 i MMP12 a wyniki tej analizy wskazały, że wraz z obniżeniem poziomu GAG spada też poziom PFN1. Co więcej, wyciszenie ekspresji genu *PFN1* powodowało także spadek poziomu GAG, wskazując na możliwą nową ścieżkę terapeutyczną.

Profiliny kodowane przez gen *PFN1* to małe białka oddziałujące z cytoszkieletem komórkowym, gdzie wpływają na polimeryzację aktyny. Uczestniczą one również w transporcie błonowym, sygnalizacji komórkowej, transkrypcji i autofagii. Cytoszkielet odgrywa bardzo ważną rolę w synaptogenezie i neurotransmisji, a także bierze udział w rozwoju układu nerwowego i plastyczności dojrzałego mózgu. Jego zaburzenia często

obserwuje się w chorobach psychicznych, takich jak schizofrenia, choroba afektywna dwubiegunowa, autyzm lub silna depresja. Jest to bardzo istotne, ponieważ problemy behawioralne są jednym z neuropatycznych objawów MPS. Co więcej, pacjenci z MPS III są czasami błędnie diagnozowani jako osoby z zaburzeniami ze spektrum autyzmu.

Mutacje w genie *PFN1* wykrywa się także u pacjentów z innymi chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak stwardnienie zanikowe boczne, zespół łamliwego chromosomu X, rdzeniowy zanik mięśni, choroba Huntingtona i Parkinsona oraz adrenoleukodystrofia. Fakt ten wydaje się szczególnie interesujący, gdyż w wielu tych chorobach pojawiają się agregaty białkowe. Niektóre doniesienia literaturowe wskazują, że do ich powstania miałyby przyczyniać się wzrost poziomu ekspresji właśnie *PFN1*. Wskazano bowiem, że niektóre zmutowane białka PFN1 wykazują właściwości podobne do prionów i działają jako czynniki, które wyzwalają konwersję białka TDP43 do toksycznych stanów konformacyjnych.

Podsumowując, wskazane powyżej geny oraz ich produkty mogą być zaangażowane we wspólne ścieżki patogenezy różnych typów/podtypów MPS, z czego poziom PFN1 wydaje się być powiązany z poziomem GAG. Przedstawione powyżej wyniki badań dotyczących głównie zaburzeń poziomu PFN1 w komórkach MPS III i MPS IV opisane zostały w artykule: [Wiśniewska K, Żabińska M, Gaffke L, Szulc A, Walter BM, Węgrzyn G, Pierzynowska K. \(2024\) Shared Gene Expression Dysregulation Across Subtypes of Sanfilippo and Morquio Diseases: The Role of PFN1 in Regulating Glycosaminoglycan Levels. *Frontiers in Bioscience \(Landmark Ed.\)*; 29\(12\):415.](#)

Wskazane powyżej wyniki dotyczące zaburzeń poziomu profiliny w komórkach MPS oraz jej udział w patogenezie innych chorób neurologicznych skłoniły mnie do wykonania szerokiej analizy poziomów białek, które znane są ze swojej tendencji do tworzenia agregatów w różnych chorobach neurodegeneracyjnych. W komórkach MPS III wszystkich podtypów dokonałam immunodetekcji technikami immunofluorescencyjnymi oraz western-blotting poziomów beta-amyloidu i jego prekursora (białka APP), białka tau i jego hiper-fosforylowanej formy (p-tau), a także alfa-synukleiny oraz białka TDP43 (białko TDP-43 nigdy wcześniej nie było badane w kontekście patogenezy MPS). Wyniki tych analiz wskazały na podwyższone poziomy białek APP, β -amyloidu, tau i TDP43 we wszystkich podtypach MPS III, a podwyższone poziomy p-tau i α -synukleiny we wszystkich oprócz MPS IIIC. Ponadto, widoczne pod

mikroskopem fluorescencyjnym agregaty tworzone przez β -amyloid i tau obecne były we wszystkich podtypach MPS III, a agregaty tworzone przez p-tau, TDP43 i α -synukleinę we wszystkich podtypach MPS III z wyjątkiem IIIC. Podwyższony poziom wymienionych powyżej białek został zaobserwowany także w mózgowiu myszy stanowiących model MPS IIIB.

Jako że oznaczony w komórkach poziom GAG był najniższy ze wszystkich badanych linii właśnie w MPS IIIC (mimo, że w dalszym ciągu znacznie wyższy niż w komórkach kontrolnych), to nasunęło się pytanie o udział GAG w tworzeniu agregatów białkowych. Dlatego podobnie jak poprzednio, poziom GAG w komórkach MPS został obniżony przy pomocy genisteiny, a poziomy APP, β -amyloidu, tau, p-tau, TDP43 i α -synukleiny oraz ich agregatów zostały ponownie zbadane. Wyniki tych doświadczeń zaskakująco wskazały na obniżenie poziomu zarówno wszystkich wymienionych powyżej białek jak i tworzonych przez nich agregatów w komórkach poddanych działaniu genisteiny, z wyjątkiem α -synukleiny, której podwyższony poziom pozostawał niezależny od poziomu GAG. Sugeruje to ewidentny związek pomiędzy tworzeniem agregatów niektórych białek oraz poziomem GAG, co otwiera szereg pytań o rolę GAG w powstawaniu tego typu agregatów. Wyniki tych doświadczeń zostały opisane w artykule: [Wiśniewska K, Rintz E, Żabińska M, Gaffke L, Podlacha M, Cyske Z, Węgrzyn G, Pierzynowska K. \(2024\) Comprehensive evaluation of pathogenic protein accumulation in fibroblasts from all subtypes of Sanfilippo disease patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 733:150718.](#)

Ostatnim elementem mojej rozprawy doktorskiej było opracowanie przeglądu literatury poświęconego zaburzeniom behawioralnym i problemom ze snem w MPS III, czyli objawom, które są szczególnie charakterystyczne dla tego schorzenia i wyjątkowo obciążające zarówno dla pacjentów, jak i ich rodzin. Analizując dostępne dane, starałam się wyjaśnić podłoże zaburzeń, które obejmuje nakładające się procesy patologiczne w OUN. Potencjalne mechanizmy obejmują akumulację HS i wynikającą z niej neurodegenerację, przewlekły stan zapalny, stres oksydacyjny, dysfunkcję mitochondriów oraz zaburzenia w metabolizmie neurotransmiterów. Wszystkie te czynniki prowadzą do zaburzenia funkcji oraz struktur mózgu odpowiedzialnych za kontrolę zachowania, emocji i regulację rytmu snu i czuwania.

Najbardziej charakterystyczne objawy to nadpobudliwość psychoruchowa, impulsywność, napady agresji, stereotypie ruchowe, lęk oraz problemy ze snem, takie jak

trudności w zasypianiu, częste wybudzenia, skrócenie całkowitego czasu snu czy odwrócenie rytmu dobowego. Co istotne, symptomy te bardzo często pojawiają się już we wczesnych stadiach choroby, zanim rozwiną się wyraźne objawy somatyczne. W przeglądzie omówiłam także możliwości łagodzenia tych zaburzeń – zarówno farmakologiczne (m.in. leki przeciwdepresyjne, przeciwpsychotyczne, melatonina), jak i niefarmakologiczne, takie jak modyfikacje środowiska, utrzymywanie stałych rytuałów snu, terapie behawioralne czy wsparcie psychologiczne. Zwróciłam jednak uwagę, że skuteczność tych metod jest zróżnicowana, a potrzeba dobrze zaprojektowanych badań klinicznych w tym obszarze pozostaje aktualna. W omawianej pracy chciałam przede wszystkim zwrócić uwagę na codzienne problemy związane z chorobą, z którymi muszą mierzyć się rodziny pacjentów, wskazać te najbardziej znaczące oraz omówić potencjalne możliwości radzenia sobie z nimi. Artykuł ten to praca: [Wiśniewska K, Wolski J, Anikiej-Wiczenbach P, Żabińska M, Węgrzyn G, Pierzynowska K. \(2025\) Behavioural disorders and sleep problems in Sanfilippo syndrome: overlaps with some other conditions and importance indications. *Eur Child Adolesc Psychiatry*; 34\(6\):1795-1816.](#) Ta praca jest dla mnie szczególnie istotna, ponieważ zwraca uwagę na aspekt często pomijany w badaniach nad mechanizmami choroby i potencjalnymi terapiami przyczynowymi. Choć poszukiwanie skutecznych metod leczenia przyczynowego pozostaje priorytetem, nie można zapominać, że dopóki takie terapie nie będą dostępne, konieczne jest równoległe rozwijanie i udoskonalanie leczenia objawowego, które w chwili obecnej realnie poprawia jakość życia pacjentów i ich rodzin.

Podsumowując całość przedstawionych badań można wskazać, że odkrycia opisane w mojej rozprawie doktorskiej dostarczają nowego wglądu w mechanizmy molekularne leżące u podstaw patogenezy MPS oraz mechanizmy zróżnicowania między neuropatycznym i nie-neuropatycznym przebiegiem choroby. Ponad to moje badania pokazały jak zarówno jak wiele różnic i podobieństw jest między poszczególnymi podtypami MPS III, na każdym poziomie. Dodatkowo całość badań wskazuje na liczne podobieństwa pomiędzy neuropatycznymi typami MPS, a innymi chorobami neurodegeneracyjnymi, co może wskazywać nowe kierunki dla badań nad metodami leczenia.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. Wiśniewska, Karolina et al. "Misdiagnosis in mucopolysaccharidoses." *Journal of applied genetics* vol. 63,3 (2022): 475-495. doi:10.1007/s13353-022-00703-1
2. Wiśniewska, Karolina et al. "The Role of Gene Expression Dysregulation in the Pathogenesis of Mucopolysaccharidosis: A Comparative Analysis of Shared and Specific Molecular Markers in Neuronopathic and Non-Neuronopathic Types of the Disease." *International journal of molecular sciences* vol. 25,24 13447. 15 Dec. 2024, doi:10.3390/ijms252413447
3. Wiśniewska, Karolina et al. "Cellular Organelle-Related Transcriptomic Profile Abnormalities in Neuronopathic Types of Mucopolysaccharidosis: A Comparison with Other Neurodegenerative Diseases." *Current issues in molecular biology* vol. 46,3 2678-2700. 21 Mar. 2024, doi:10.3390/cimb46030169
4. Wiśniewska, Karolina et al. "Differences in gene expression patterns, revealed by RNA-seq analysis, between various Sanfilippo and Morquio disease subtypes." *Gene* vol. 812 (2022): 146090. doi:10.1016/j.gene.2021.146090
5. Wiśniewska, Karolina et al. "Shared Gene Expression Dysregulation Across Subtypes of Sanfilippo and Morquio Diseases: The Role of PFN1 in Regulating Glycosaminoglycan Levels." *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* vol. 29,12 (2024): 415. doi:10.31083/j.fbl2912415
6. Wiśniewska, Karolina et al. "Comprehensive evaluation of pathogenic protein accumulation in fibroblasts from all subtypes of Sanfilippo disease patients." *Biochemical and biophysical research communications* vol. 733 (2024): 150718. doi:10.1016/j.bbrc.2024.150718
7. Wiśniewska, Karolina et al. "Behavioural disorders and sleep problems in Sanfilippo syndrome: overlaps with some other conditions and importance indications." *European child & adolescent psychiatry* vol. 34,6 (2025): 1795-1816. doi:10.1007/s00787-025-02661-5