

RAPORT Z REALIZACJI BADAŃ W RAMACH PROJEKTU

Tytuł projektu: Zmiany w cytoszkielecie w komórkach MPS III oraz autofagia i zahamowanie syntezy glikozoaminoglikanów w leczeniu choroby Sanfilippo

WSTĘP

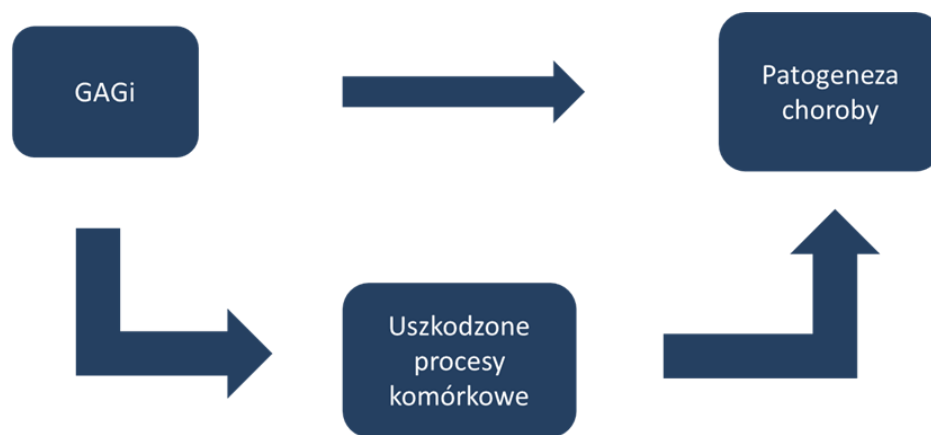
MUKOPOLISACHARYDOZY

Mukopolisacharydozy (MPS, ang. *mucopolysaccharydosis*) należą do chorób dziedzicznych, o postępującym charakterze, spowodowanych całkowitym brakiem lub szczątkową aktywnością enzymów lizosomalnych z grupy hydrolaz (w wyniku mutacji), które odpowiedzialne są za degradację glikozoaminoglikanów (GAG). Niezdegradowane GAG stopniowo akumulują się w lizosomach, powoli uszkadzając ich funkcje. GAG są to nierozgałęzione łańcuchy cukrowe, których główną rolą jest przyłączenie czynnika wzrostowego do jego receptora na powierzchni komórki oraz udział w sygnalizacji i rozwoju komórki [Iozzo V., 2001]. Ponadto, nadają elastyczność tkance łącznej. Działanie wspomnianych enzymów jest ze sobą ściśle związane, każdy z nich rozpoczyna swoją aktywność dopiero gdy poprzedni ją zakończy, dlatego w przypadku braku aktywności choćby jednego z nich, cały szlak przestaje funkcjonować prawidłowo. MPS dziedziczą się w sposób autosomalny recesywny z wyjątkiem MPS II (choroby Huntera), która jest sprzężona z chromosomem X. W zależności od typu choroba występuje z różną częstotliwością. MPS I jest wariantem schorzenia występującego najczęściej, ok. 1 na 88 000 żywych urodzeń, natomiast MPS VII 1 na 2 111 000 żywych urodzeń, MPS IX jest typem spotykanym najrzadziej, jak dotąd opisane zostały jedynie cztery przypadki na świecie [Muenzer J., 2011].

Wyróżnia się 11 typów i podtypów MPS, klasyfikowanych na podstawie częściowo lub całkowicie niefunkcjonującego enzymu. Występuje szereg objawów charakterystycznych dla wszystkich pacjentów z MPS, jednak wyróżnia się również symptomy typowe dla konkretnych typów. Wspólnymi objawami są: organomegalia, charakterystyczne rysy twarzy, zmiany w obrębie układu kostnego, a z upływem czasu również zmiany w obrębie układu oddechowego oraz sercowo-naczyniowego. W niektórych przypadkach może wystąpić upośledzenie słuchu

i wzroku. Natomiast upośledzenie umysłowe jest charakterystyczne dla MPS I, postaci ciężkich MPS II, wszystkich MPS III oraz MPS VII [Muenzer J., 2011].

Jeszcze do niedawna uważano, że spichrzanie GAG jest pierwotną i jedyną przyczyną MPS [Wraith J., 2013]. Ostatnie doniesienia literaturowe wykazały jednak zaburzenia wielu procesów komórkowych od których zależy prawidłowe ich funkcjonowanie. Możliwe więc, że to nie samo pojawienie się GAG, a zmniejszona wydajność kluczowych procesów molekularnych zachodzących w komórkach odpowiedzialna jest za patogenezę choroby (Ryc.1)



Ryc. 1. Patogeneza mukopolisacharydozy

CYTOSZKIELET KOMÓRKOWY

Cytoszkieleł jest siecią gęsto upakowanych włóknistych białek wśród których wyróżnić można różne rodzaje tworzonych włókien. Jeszcze do lat 80. XX wieku sądzono, że cytoszkieleł jest strukturą występującą wyłącznie u organizmów eukariotycznych. Teoria ta została przekreślona w roku 1992 oraz 1993, kiedy to u bakterii odkryto struktury homologiczne do aktyny [Bork P. i in., 1992] oraz obu podjednostek tubuliny (α -tubulina i β -tubulina) [de Boer P. i in., 1992; RayChaudhuri D. i in., 1992; Mukherjee A. i in., 1993; Yutin N. i in., 2012]. Pomimo tych odkryć nie można jednak sądzić, że cytoszkieleł organizmów eukariotycznych wywodzi się bezpośrednio od prokariotów, ponieważ po bardzo wnikliwych analizach stwierdzono znaczną różnorodność pełnionych funkcji oraz składników budujących cytoszkieleł pomiędzy komórkami prokariotycznymi i eukariotycznymi [Vesteg M. i in., 2008]. Główne białka budujące cytoszkieleł, czyli aktyna i tubulina, są charakterystyczne dla komórek

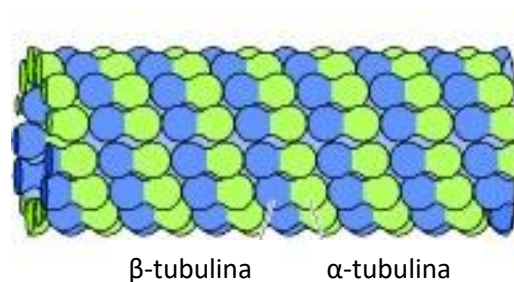
eukariotycznych i nie występują w komórkach prokariotycznych, jednak odkryto u bakterii homologii aktyny czyli białko MreB oraz tubuliny - białko FtsZ, występujące u wszystkich bakterii właściwych oraz niektórych archeanów [Carballido-López, R. i in., 2003]. Białko MreB pełni funkcję regulującą kształt komórki oraz segreguje część plazmidów bakteryjnych, natomiast białko FtsZ odgrywa bardzo istotną rolę w podziałach komórki bakteryjnej [Amos L. i in., 2004]. Biorąc pod uwagę, że jedynym podobieństwem białek cytoszkieletu w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych są struktura trójwymiarowa oraz podłużny sposób oddziaływania pomiędzy filamentami, można wnioskować, że pierwotną funkcją włókien cytoszkieletu u prokariotów było działanie jako „silniki liniowe”, czyli ich zdolność cytomotoryczna [Löwe J. i in., 2009]. W komórkach eukariotycznych funkcja ta została zdecydowanie rozbudowana poprzez ciągłą polimeryzację i depolimeryzację mikrotubul [McIntosh R. i in., 2010], a także dodanie kolejnych „silników”, czyli dynein, miozyn i kinezyn [Kull F. i in., 1996; Roberts A. i in., 2013; Cianfrocco M, i in., 2015], które wykorzystują energię powstałą w wyniku hydrolizy ATP [Wickstead B. i in., 2011]. Badania przeprowadzone w 2000 roku wskazują na to, że „silniki molekularne” kinezyny i dyneiny, odbrywają również bardzo kluczową rolę w dynamice polimeryzacji mikrotubul [Hunter A. i in., 2000].

Cytoszkielet w komórkach eukariotycznych pełni funkcje komórkowego „rusztowania”, zapewniając przestrzenną organizację komórki. Dzięki niemu możliwy jest również kontakt wnętrza komórki ze środowiskiem zewnętrznym oraz ruch organelli czy podziały komórkowe. Jest to możliwe, ponieważ cytoszkielet łączy aktywność wielu organelli komórkowych [Wickstead B. i in., 2011]. Dokładniej mówiąc można podzielić funkcje cytoszkieletu komórkowego na trzy kategorie: organizację przestrzenną wnętrza komórki, kontakt wnętrza komórki ze środowiskiem zewnętrznym oraz umożliwienie poruszanie się i zmianę kształtu [Fletcher A. i in., 2010]. Jest on zbudowany z: filamentów aktynowych (mikrofilamenty), mikrotubul oraz filamentów pośrednich, a każde z nich pełni odmienną rolę, umożliwiając mu pełnienie tak różnorodnych funkcji. Wszystkie trzy polimery są zorganizowane w sieć, która w zależności od potrzeb komórki, dostosowuje się do zmieniających się warunków otoczenia [Fletcher A. i in., 2010]. Organizacja sieci, którą tworzą polimery cytoszkieletowe jest nadzorowana przez kilka klas białek regulatorowych: czynniki nukleujące, białka zamykające, czynniki depolimeryzujące oraz czynniki odcinające. Czynniki sprzyjające nukleacji są odpowiedzialne za inicjację tworzenia się włókien, natomiast białka zamykające odpowiadają

za zakończenie wzrostu tego włókna. Czynniki depolimeryzujące i odcinające mają za zadanie rozkładać istniejące włókna. Tworzenie polimerów jest również kontrolowane przez środki stabilizujące i sieciujące białka [Fletcher A. i in., 2010]. Trzema najistotniejszymi różnicami spośród trzech składników cytoszkieletu są: sztywność ich włókien, dynamika gromadzenia się oraz rodzaj „silników molekularnych”, z którymi współpracują [Fletcher A. i in., 2010].

Mikrotubule

Jednymi z ważnych komponentów cytoszkieletu w komórce eukariotycznej są mikrotubule, które odgrywają ważne role w wielu procesach komórkowych [Dustin P., 1984 ; Bray D., 2001]. Zbudowane są one z białka globularnego zwanego tubuliną (Ryc. 2). Tworzy ona heterodimery złożone z dwóch podjednostek, czyli α -tubuliny i β -tubuliny. Obie podjednostki łączą się ze sobą przybierając kształt podłużnej rurki [Cooper G. i in., 2000]. Heterodimery tubuliny są ze sobą połączone w sposób nazywany „głowa-ogon” i tworzą one liniowe polimery, zwane protofilementami. W protofilamencie heterodimery są ułożone w sposób równoległy względem siebie, dokładnie w taki sam sposób są protofilamenty budujące mikrotubule [Horio T. i in., 2014]. Mikrotubule są najbardziej złożone ze wszystkich trzech polimerów budujących cytoszkielet, to właśnie one odpowiadają głównie za nadanie kształtu komórce, przekazywanie sygnałów oraz organizację cytoplazmy [Alfaro-Aco R. i in., 2015].



Ryc. 2. Budowa mikrotubul [Cooper G., 2000]

Dynamiczna niestabilność mikrotubul

Niezwykle istotną cechą cytoszkieletu tubulinowego jest jego dynamiczna niestabilność. Dzięki naprzemiennej polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul, która prowadzi do ich stabilizacji i destabilizacji, zapewniony zostaje ruch organelli wewnątrz

komórki zachodzący w zależności od zmieniających się warunków otoczenia [Fletcher A. i in., 2010]. Zjawisko to zostało po raz pierwszy opisano w 1984 roku [Mitchison T. i in., 1984a, b].

Polimeryzacja i depolimeryzacja mikrotubul następuje poprzez dodanie lub odjęcie podjednostki (α - lub β -tubuliny) z odpowiedniego końca mikrotubuli. Koniec który zakończony jest podjednostką α -tubuliny (koniec minus) jest budowany zdecydowanie wolniej niż koniec odsłaniający β -tubulinę (koniec plus) [Cote R. i in., 1981; Mitchison T., 1993]. Szybkość wzrostu oraz rozpadu mikrotubul z całą pewnością zależą od miejscowego stężenia dostępnych podjednostek tubuliny [Honda Y. i in., 2017]. Już w latach 80. XX wieku wykazane zostało, że obie podjednostki tubuliny współwystępują zarówno w czasie budowania jak i skracania mikrotubul oraz że ich stężenie podlega ciągłym zmianom, pomiędzy tymi dwoma fazami wzrostu, w sposób nieuporządkowany [Horio T. i in., 1986; Kirschner M. i in., 1986; Walker R. i in., 1988]. W warunkach sprzyjających budowaniu mikrotubul, ich wzrost następuje przez większość czasu, a dobudowywanie wszystkich mikrotubul odbywa się z podobną szybkością, która głównie zależy od stężenia podjednostek tubuliny w otoczeniu. Natomiast depolimeryzacja odbywa się z kilku krotnie wyższą szybkością i nie zależy bezpośrednio od stężenia podjednostek tubuliny. „Katastrofa”, czyli zmiana stanu budowania mikrotubul na ich kurczenie, odbywa się w sposób nieuporządkowany, następnie mikrotubule mogą, ale nie muszą ponownie wejść na drogę budowania [Horio T. i in., 2014]. Ostatnie obserwacje wykazały, że molekularny mechanizm polimeryzacji mikrotubul jest bardzo skomplikowany i nie można go rozpatrywać jedynie w ramach dodawania lub odejmowania podjednostek na końcach tubuliny. Świadczy o tym ciągła i losowa zmiana końców protofilamentów pomiędzy naprzemiennymi okresami powolnego wzrostu oraz szybkiego kurczenia się mikrotubul. Jednak z uwagi na to, że zaobserwowano ciągły wzrost mikrotubuli, można wnioskować, że zdecydowanie częściej podjednostki tubuliny są dodawane niż odłączane [Kerssemakers J. i in., 2006; Schek H. i in., 2007; Gardner M. i in., 2008].

Obecnie uważa się, że stabilność mikrotubul zależy głównie od stabilności „czapeczki” GTP-tubuliny na końcach mikrotubuli. Nowe podjednostki GTP-tubuliny są osadzone w dobudowywanym łańcuchu, następnie ulegają hydrolizie do GDP-tubuliny i tworzą rdzeń GDP-tubuliny, który jest stabilizowany na końcu przez „czapeczkę” GTP-tubuliny. Jeśli „czapeczka” GTP zostanie zgubiona, na przykład na skutek hydrolizy, zostanie odkryty wewnętrzny rdzeń GDP, co prowadzi do zwijania się protofilamentu [Schek T. i in., 2007].

Odślonięcie rdzenia GDP prowadzi do „katastrofy”, a wznowienie wzrostu nazywane jest „ratowaniem” [Carlier M. i in., 1987; O’Brien E. i in., 1987; Drechsel D. i in., 1994; Caplow M. i in., 1996]. Mechanizm „ratowania” po depolimeryzacji jest jeszcze bardzo słabo zbadany. Badania przeprowadzone w 1990 roku sugerują, że pojedyncza cząsteczka GTP-tubuliny jest w stanie doprowadzić do ponownego wzrostu mikrotubuli i dodawania kolejnych cząsteczek GTP-tubuliny [Bayley P. i in., 1990]. Bardzo zaskakujące okazały się badania pokazujące, że resztki GTP-tubuliny mogą znajdować się w starych częściach mikrotubuli, pomiędzy GDP-tubuliną [Dimitrov A. i in., 2008]. Sugeruje się, że to właśnie one są odpowiedzialne za „ratowanie” łańcucha po depolimeryzacji i powrót do polimeryzacji.

Białka towarzyszące mikrotubulom

Mikrotubule bardzo łatwo tworzą interakcje z innymi białkami. Niektóre z nich rozcinają mikrotubule, inne zwiększają szybkość depolimeryzacji. Wyróżnia się również specyficzny rodzaj białek, współdziałających z mikrotubulami poprzez zwiększanie ich stabilności. Są to tak zwane białka towarzyszące mikrotubulom (MAP, *ang. microtubule-associated proteins*) [Hamada T., 2007; Gardiner J., 2013]. MAP stabilizują łańcuch mikrotubuli przez zapobieganie rozpadu podjednostek oraz promują przyłączanie nowych podjednostek i wzrost mikrotubuli [Horio T. i in., 2014]. Opisano wiele białek towarzyszących, ich funkcje różnią się w zależności od typu komórek. Najlepiej poznanymi białkami MAP są: MAP-1, MAP-2 i tau, w komórkach neuronalnych oraz MAP-4 w komórkach nieneuronalnych kręgowców. W komórkach nerwowych MAP znajdują się zarówno w dendrytach jak i aksonach. Jednak w obu tych strukturach występują różne białka towarzyszące: w aksonach znaleźć można białko tau, natomiast w dendrytach MAP-2 [Cooper G., 2000].

Mikrofilamenty

Eukariotyczna aktyna należy do dużej i zróżnicowanej rodziny białek ATPaz, do której zaliczają się również białka opiekuńcze Hsp 70 oraz kilka klas kinaz cukrowych [Flaherty K. i in., 1991; Bork P. i in., 1992]. Włókna aktynowe składają się z dwóch polimerów zwiniętych w prawoskrętną helisę. Podlegają one również dynamicznej niestabilności, jednak jest ona zdecydowanie mniej gwałtowna niż w przypadku mikrotubul [Mitchison T., 1992]. Cytoszkieleł

aktynowy, jako struktura zdecydowanie większa od innych, ma możliwość wpływania na kształt komórki tylko poprzez rozbudowywanie oraz modyfikację swoich włókien. Ta właściwość pozwala komórce na przyjmowanie wielu kształtów, a co więcej na ich bardzo szybką zmianę [Lodish H. i in., 2000].

Zarówno aktyna jak i tubulina mają swoje bakteryjne homologe, jednak zdecydowanie lepiej poznane jest bakteryjne białko FtsZ, czyli homolog tubuliny. Właściwości homologu aktyny MreB nie są jeszcze znane [van den Ent C. i in., 2001]. Sugeruje się jednak, że sposób składania włókien znacznie różni się w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych, przy podobieństwie strukturalnym [Esue O. i in., 2005].

Filamenty pośrednie

Filamenty pośrednie (IF, *ang. intermediate filaments*) u eukariota są bardzo odmienne w strukturze oraz biochemii od mikrotubul i mikrofilamentów. Filamenty te są podłużnymi dimerami, które nachodzą na siebie. Są zdecydowanie najtrwalsze ze wszystkich trzech składników budujących cytoszkielet, przez co ich główną funkcją jest ochrona komórki przed uszkodzeniami mechanicznymi. U kręgowców wyróżnia się około 50 różnych białek IF, które ogólnie można zakwalifikować do sześciu grup, przyporządkowywanych na podstawie ich sekwencji aminokwasowej [Cooper G., 2000]. Bardzo interesujące okazały się badania stwierdzające, że filamenty pośrednie zostały zidentyfikowane jedynie w królestwie zwierząt [Erber A. i in., 1998].

Dotychczasowe informacje na temat zmian w cytoszkielecie tubulinowym w mukopolisacharydach

Jak dotąd nie przeprowadzono jeszcze kompleksowej oceny stanu cytoszkieletu we wszystkich typach MPS. Jedyne tego typu badania przeprowadzono w ciągu ostatnich lat w Stanach Zjednoczonych, jednak dotyczyły one tylko MPS typu I i polegały na porównaniu proteomu myszy z MPS I oraz myszy zdrowych. Analizy te ujawniły, że aż 50 białek ma zmienioną ekspresję u myszy z MPS I w stosunku do myszy zdrowych. Białka te są zaangażowane w wiele różnych procesów biologicznych. Są to między innymi szlaki metabolizmu komórkowego, obniżenie poziomu białka GLS (glutaminaza), które katalizuje pierwszą reakcję w szlaku katabolizmu nerkowego glutaminy; neurotransmisja, w której

wykazano obniżenie poziomu kilku białek zaangażowanych w neuroprzebieżność, np. białka DPYLS2, które bierze udział w rozwoju i polaryzacji neuronów. Niezwykle ważna jest również homeostaza jonowa, w przypadku której wykazano duże zmiany w poziomach ekspresji genów różnych białek biorących udział w jej utrzymaniu, co jest niebezpieczne, ponieważ zaburzenia w transporcie jonów mogą doprowadzić do zmiany pH wewnątrz lizosomu, a skutkować to może zaburzeniami w funkcjonowaniu hydrolaz lizosomalnych. Zmiany wykazano również w poziomach białek związanych z funkcjonowaniem i strukturą cytoszkieletu, a konkretnie w przypadku dwóch białek związanych z cytoszkieletem aktynowym: ACTA1 i ACTN4 oraz białka kodującego jedną z podjednostek β -tubuliny TUBB4B, a także kilka białek związanych z reorganizacją cytoszkieletu aktynowego. Ponadto wykazano, że poziom białka SIRT2 reguluje stopień acetylacji α -tubuliny, co pośrednio może wpływać na dynamikę mikrotubul [Zhang L. i in., 2014]. Utrzymanie homeostazy cytoszkieletu jest bardzo istotne dla poprawnego funkcjonowania transportu pęcherzykowego, który bierze udział w takich szlakach jak autofagia czy endocytoza [Kamal A. i in., 2000]. Zmiany w obrębie cytoszkieletu mogą mieć więc globalny wpływ na komórkę.

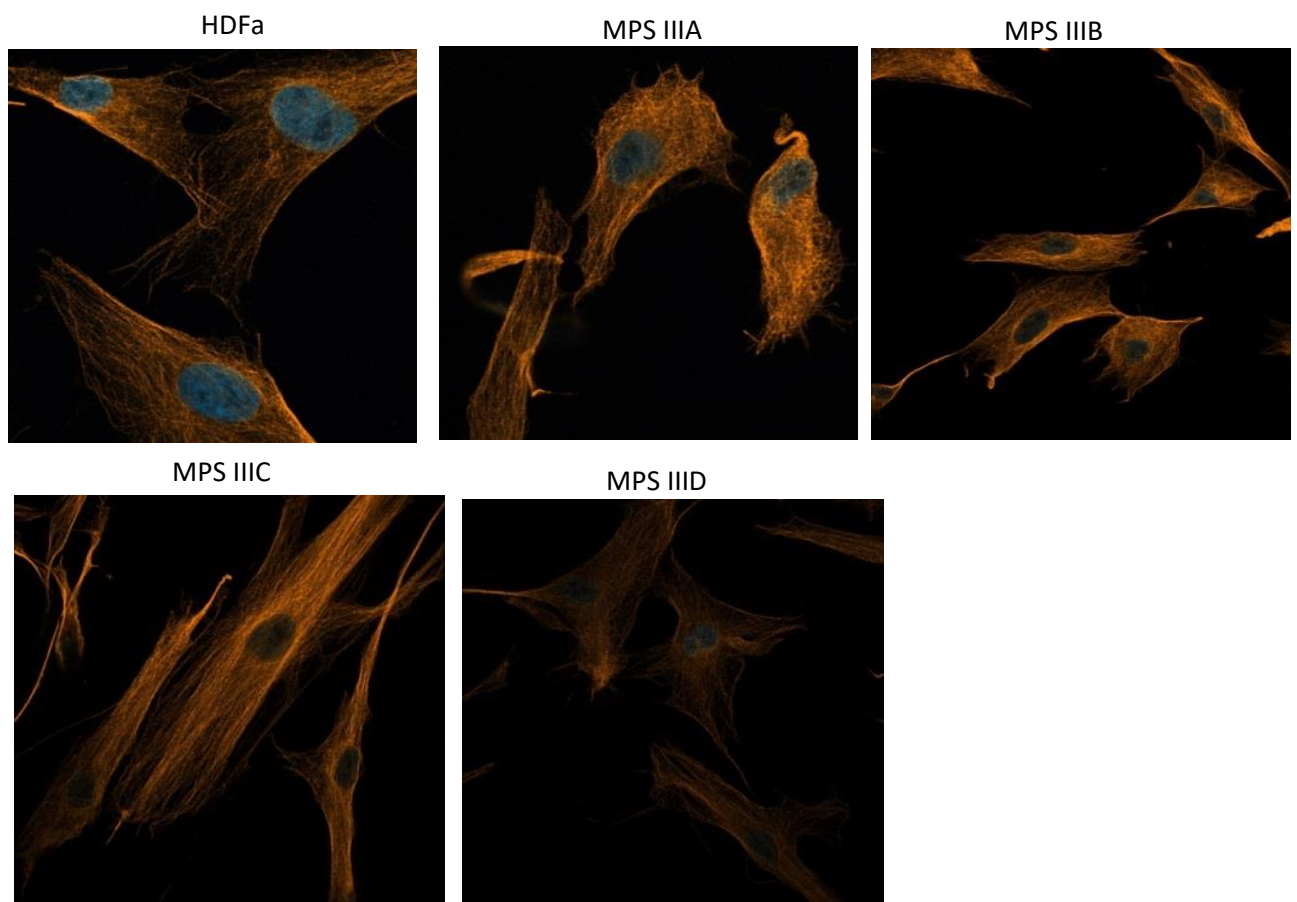
WYNIKI BADAŃ

Zmiany w morfologii cytoszkieletu α -tubulinowego w komórkach MPS

Jedną z metod pozwalającą na określenie zmian w morfologii cytoszkieletu tubulinowego jest mikroskopowa ocena jego organizacji w komórce. Doświadczenie tego typu wskazać może na zmiany nie tylko w intensywności fluorescencji wybarwionych mikrotubul, ale również pokazać ich zwiększoną lub zmniejszoną stabilizację w komórkach pacjentów (w stosunku do komórek zdrowych).

Komórki reprezentujące poszczególne typy MPS oraz komórki zdrowe (linia HDFa) pasażowano na szkiełka nakrywkowe na płytce 12-dołkowej w ilości $0,4 \times 10^5$ i hodowano przez 24 godziny w 37°C przy 5% wysyceniu CO_2 . Do wybarwienia cytoszkieletu α -tubulinowego zastosowano technikę immunofluorescencyjną. Przygotowane preparaty oglądano pod mikroskopem konfokalnym typu Zeiss LSM 800 z detektorem wysokiej rozdzielczości typu

Airyscan. Uzyskane wyniki (Ryc. 3) pokazują wyraźne różnice w morfologii mikrotubul, nie tylko pomiędzy komórkami pobranymi od osób z MPS, a komórkami kontrolnymi, ale także w obrębie poszczególnych typów/podtypów MPS. W odniesieniu do komórek kontrolnych w przypadku MPS IIIC mikrotubule są nadmiernie ustabilizowane, co uwidocznione zostało jako długie i gęsto pojawiające się włókna o intensywnej fluorescencji. Natomiast w MPS IIID występuje znaczna destabilizacja i zanik cytoszkieletu. Komórki IIIA i IIIB nie wykazują odstępstw od komórek kontrolnych



Ryc. 3. Różnice w morfologii cytoszkieletu tubulinowego pomiędzy komórkami pobranymi od pacjentów z chorobą Sanfilippo oraz komórkami kontrolnymi linii HDFa. Mikrotubule barwione były przy pomocy techniki immunofluorescencyjnej z użyciem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko białku α -tubulinie. Obrazy mikroskopowe uzyskane zostały przy pomocy mikroskopu konfokalnego typu Zeiss LSM 800 z detektorem wysokiej rozdzielczości typu Airyscan. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne zdjęcia dla każdej linii komórkowej.

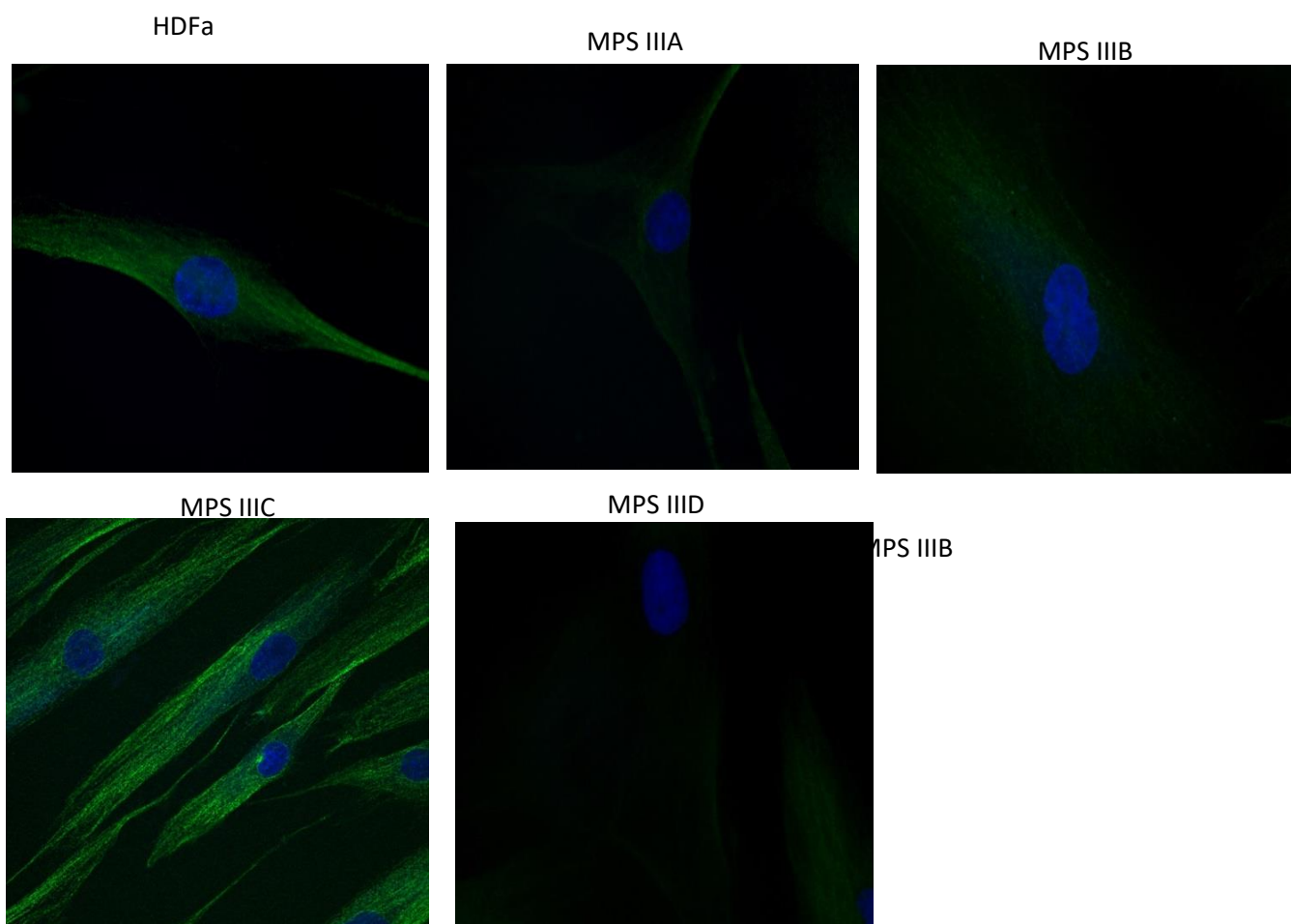
Zmiany w morfologii cytoszkieletu β -tubulinowego w komórkach MPS

Białko tubulina składa się z naprzemiennie ułożonych α -tubuliny i β -tubuliny, dlatego aby w pełni móc zrozumieć zmiany zachodzące w komórkach pobranych od pacjentów z MPS konieczne jest wykonanie szczegółowych analiz dla obu podjednostek budujących mikrotubule. Pierwszymi rozważaniami jakie należy podjąć w przypadku tego typu badań są: czy poziom białka jest zmieniony oraz czy zmiany dotyczą cytoszkieletu. Równoległe do analizy poziomu białka α -tubuliny oraz morfologii cytoszkieletu α -tubulinowego wykonano te same pomiary dla β -tubuliny.

Komórki pochodzące od pacjentów z chorobą Sanfilippo oraz od osób zdrowych (linii HDFa) pasażowano na szkiełkach nakrywkowych na płytce 12-dołkowej w ilości $0,4 \times 10^5$ w każdym dołku i inkubowano w temperaturze 37°C i 5% wysyceniu CO_2 przez 24 godziny. Do zobrazowania cytoszkieletu β -tubulinowego wykorzystano technikę immunofluorescencyjną. Przygotowane preparaty oglądano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego typu Leica CTR 4000. Tak jak w przypadku cytoszkieletu α -tubulinowego, w cytoszkielecie β -tubulinowym można zaobserwować zmiany w stosunku do komórek kontrolnych, ale również pomiędzy poszczególnymi typami/podtypami MPS (Ryc. 4). Również w tym przypadku mikrotubule w komórkach MPS IIIC wykazują bardzo intensywną fluorescencję oraz są bardzo długie, co wskazuje na ich nadmierną stabilizację. W przypadku MPS IIIA, IIIB cytoszkielet jest zdecydowanie mniej widoczny niż w komórkach kontrolnych, a w przypadku MPS IIID dochodzi nawet do jego zaniku.

Zmiany w organizacji mikrotubul

Przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej bądź konfokalnej można zobrazować pojedynczo morfologię α -tubuliny lub β -tubuliny, jednak nie dostarcza to ogólnej informacji o morfologii czy strukturze całej mikrotubuli ani o tym co dzieje się w jej pobliżu. Istotne jest również czy struktury wewnątrzkomórkowe nie układają się w specyficzny sposób, charakterystyczny dla danego typu choroby. Taki obraz pozwala uzyskać właśnie mikroskopia elektronowa, która nie tylko zobrazuje morfologię i organizację cytoszkieletu tubulinowego, ale również to czy w jego pobliżu nie zachodzą charakterystyczne, specyficzne zmiany.

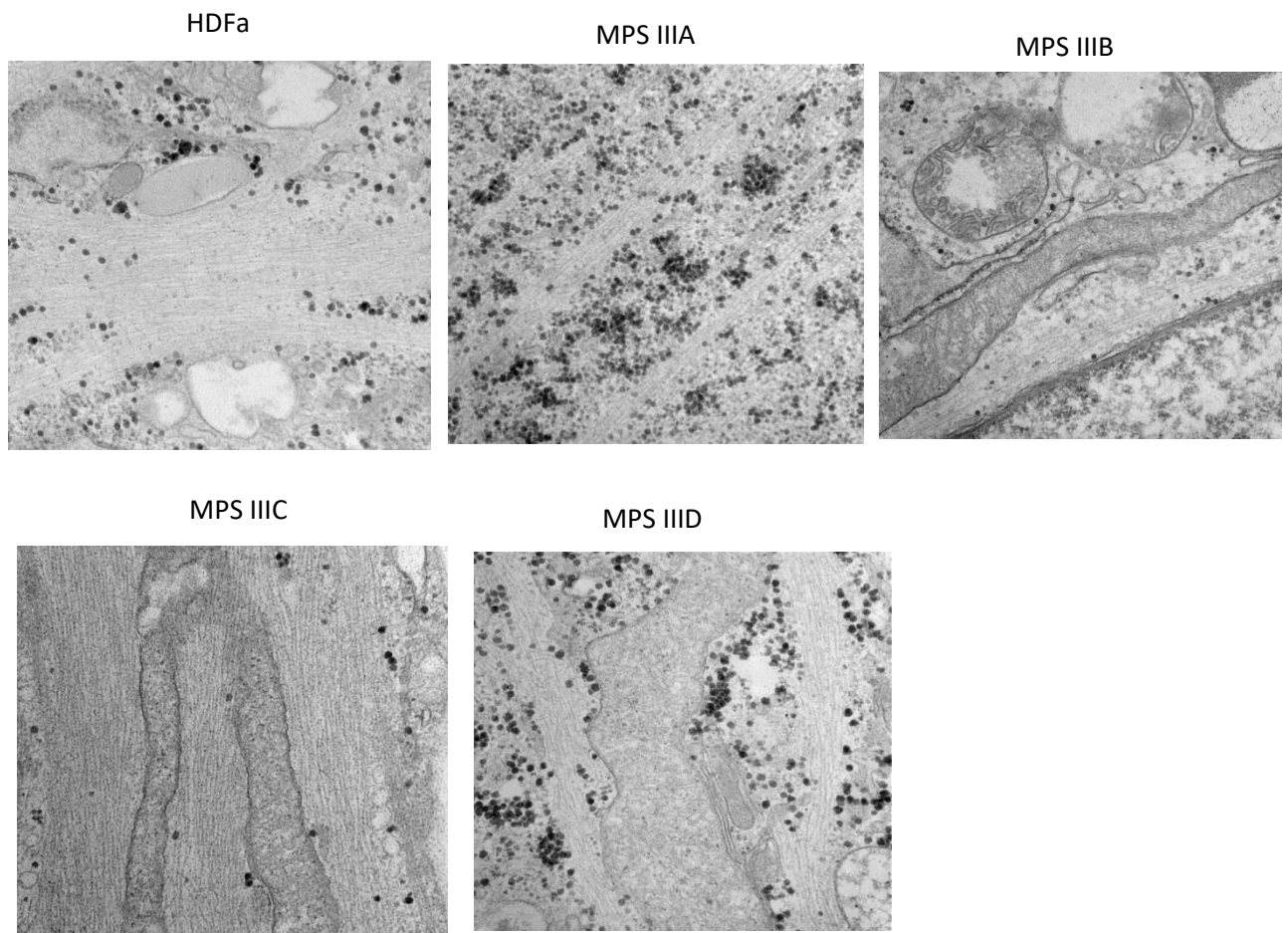


Ryc. 4. Różnice w morfologii cytoszkieletu tubulinowego pomiędzy komórkami pobranymi od pacjentów z chorobą Sanfilippo oraz komórkami kontrolnymi linii HDFa. Mikrotubule barwione były przy pomocy techniki immunofluorescencyjnej z użyciem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko białku β -tubulinie. Obrazy mikroskopowe uzyskane zostały przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego typu Leica CTR 4000. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne zdjęcia dla każdej linii komórkowej.

Komórki wszystkich podtypów Sanfilippo oraz komórki kontrolne linii HDFa pasażowano na płytkę 12-dołkową i inkubowano przez 24-godziny w temperaturze 37°C i 5% wysyceniu CO₂ w ilości 1 x 10⁵. Przed sporządzeniem preparatów utrwalano oraz odwadniano komórki, następnie preparaty oglądano przy użyciu mikroskopu elektronowego typu Nikon Eclipses 800.

Uzyskane wyniki pokazują z jednej strony zmiany w ilości pokazanych na zdjęciach mikrotubul, a z drugiej strony zmiany w długości tworzonych przez nie włókien tak samo jak

ich kształt (Ryc. 5). Szczególne zmiany zauważalne są w przypadku MPS IIIB gdzie mikrotubul jest znacznie mniej i są dużo krótsze, z wyglądem przypominającym „pourywane nici”. Obraz wskazujący na zmniejszoną ilość mikrotubul charakterystyczny jest również dla typów MPS IIIA, IIID. Z drugiej strony, w przypadku MPS IIIC daje się zauważyć bardzo rozbudowana sieć mikrotubul, które w dodatku wyglądają na bardzo „usztynnione”.

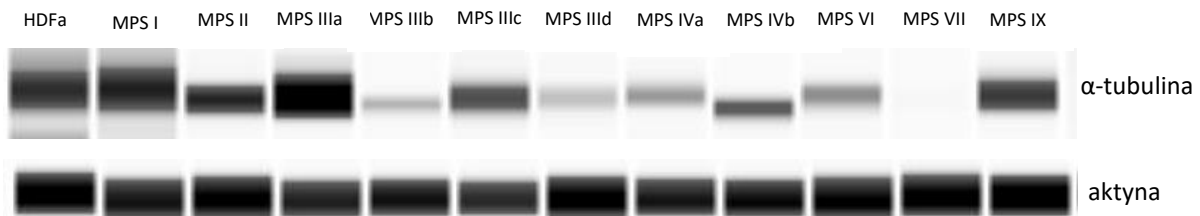


Ryc. 5. Różnice w morfologii cytoszkieletu tubulinowego pomiędzy komórkami pobranymi od pacjentów z chorobą Sanfilippo i komórkami kontrolnymi linii HDFa. Komórki zostały utrwalone przy użyciu aldehydu glutarowego, a następnie odwodnione poprzez płukanie alkoholem etylowym o wzrastających stężeniach. Obrazy mikroskopowe zostały uzyskane przy pomocy mikroskopu elektronowego typu Nikon Eclipse 800. Procedura doświadczalna została wykonana z 3-krotnym powtórzeniem.

Zmiany w poziomie α -tubuliny w komórkach MPS

Sama morfologia cytoszkieletu tubulinowego nie przynosi informacji, czy poziom tubuliny, która go buduje jest *de facto* zwiększony bądź obniżony. Można by sugerować, że zaobserwowane w mikroskopie konfokalnym zmiany w intensywności fluorescencji mikrotubul przynoszą pewne informacje na ten temat jednak wyniki takie są bardzo często trudne w interpretacji z powodu zbyt wielu czynników, które mogą na tą intensywność wpłynąć podczas samej procedury barwienia immunofluorescencyjnego. Aby odpowiedzieć na pytanie czy za zmiany w stabilizacji mikrotubul odpowiadają zmiany w poziomie α -tubuliny konieczna była ich analiza z zastosowaniem techniki Western-blotting.

Komórki wszystkich linii III oraz HDFa pasażowano na płytce o średnicy 10 cm w ilości 6×10^5 i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C , przy 5% wysyceniu CO_2 . Immunodetekcję α -tubuliny przeprowadzono z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu Wes firmy Protein Simple. Uzyskane wyniki (Ryc. 6) wskazują na wyraźny spadek poziomu α -tubuliny w przypadku MPS IIIB, IIID. Natomiast podwyższony poziom białka obserwuje się tylko w przypadku jednej linii - MPS IIIA. Poziom α -tubuliny w linii IIIC nie odbiegał od komórek kontrolnych.

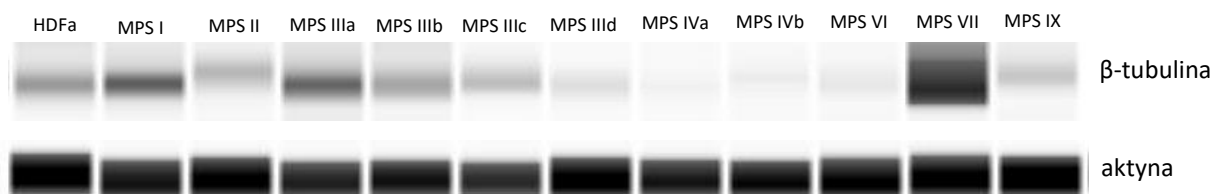


Ryc. 6. Poziom α -tubuliny w komórkach pobranych od pacjentów z chorobą Sanfilippo oraz komórkach kontrolnych linii HDFa. Immunodetekcję białka przeprowadzono przy pomocy techniki Western-blotting z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu Wes firmy Protein Simple z użyciem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko α -tubulinie. Na rycinie przedstawiono reprezentatywny wynik.

Zmiany w poziomie β -tubuliny w komórkach MPS

Jak już wspomniano mikrotubule zbudowane są z heterodimerów na które składają się α -tubulina i β -tubulina. Dlatego kolejnym etapem badań było określenie poziomu β -tubuliny w badanych komórkach.

Komórki wszystkich linii MPS III i komórki pobrane od osoby zdrowej (linii HDFa) pasażowano na płytki o średnicy 10 cm i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i 5% wysyceniu CO₂. Immunodetekcję β-tubuliny przeprowadzono przy użyciu zautomatyzowanego systemu do detekcji białek Wes firmy Protein Simple. Przedstawione wyniki (Ryc. 7) pokazują wzrost poziomu białka β-tubuliny w przypadku MPS IIIA, natomiast obniżony w MPS IIIC, IIID. W MPS IIIB poziom białka β-tubuliny nie odbiegał od komórek kontrolnych.



Ryc. 7. Poziom β-tubuliny w komórkach pobranych od pacjentów z chorobą Sanfilippo oraz kontrolnych linii HDFa. Immunodetekcję białka przeprowadzono przy pomocy techniki Western-blotting z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu Wes firmy Protein Simple z użyciem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko β-tubulinie. Na rycinie przedstawiono reprezentatywny wynik.

Badania transkryptomyczne techniką RNA-seq

Obniżony lub też podwyższony poziom białka tubuliny nie dostarcza nam informacji na temat przyczyny tej zmiany, tak samo jak zmieniona morfologia cytoszkieletu. Pomimo dostępnego obrazu mikroskopowego oraz znajomości poziomu białka nadal nie jest do końca jasne czy problem powstaje na poziomie transkrypcji, translacji czy może na jeszcze innym etapie. Dotychczas przedstawione badania obrazowały poziom lub morfologię białka. Dodatkowo obraz mikroskopowy nie zawsze był zgodny z otrzymywanym poziomem tubuliny co jeszcze bardziej skłania do dalszych poszukiwań.

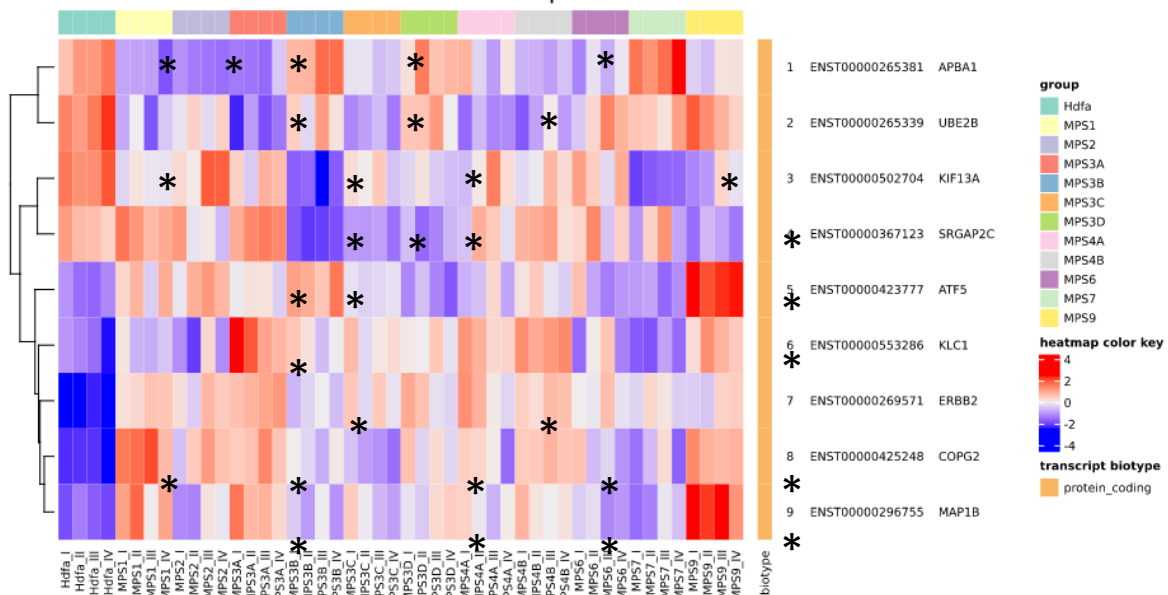
Oczywistym jest, że kolejnym krokiem w poszukiwaniu przyczyny ukazanych zmian będzie analiza na poziomie mRNA. Komórki wszystkich linii MPS III i HDFa pasażowano w ilości 5×10^5 na płytki o średnicy 10 cm i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C i 5% wysyceniu CO₂. Następnego dnia materiał w postaci RNA wyizolowany został przy użyciu zestawu do izolacji RNA firmy Qiagen, a następnie wysłany do analiz transkryptomycznych metodą RNA-seq wykonywanych przez firmę OpenExom. Wstępna analiza informatyczna uzyskanych wyników wykonana została przez firmę Intelliseq. Analizy zostały przeprowadzone

przy poziomie istotności $FDR < 10^{-6}$ w celu określenia liczby genów o większym współczynniku krotności zmiany w poziomach mRNA.

Przeprowadzone analizy metodą RNA-seq w obrębie procesów związanych z funkcjonowaniem mikrotubul (GO:0007017 – ‘microtubule-based process’ według bazy danych QuickGo) wykazały istotne statystycznie zmiany (obniżenie lub podwyższenie) w ekspresji łącznie 9 genów we wszystkich typach MPS w stosunku do komórek kontrolnych przy dobranym poziomie istotności 10^{-6} (Tabela 1, Ryc. 8).

Tabela 1. Łączna liczba genów związanych z procesami, w które zaangażowane są mikrotubule, o obniżonej lub podwyższonej ekspresji w danym typie MPS w stosunku do komórek kontrolnych (linii HDFa) przy dobranym poziomie istotności 10^{-6} .

	Obniżenie/podwyższenie ekspresji genów w komórkach MPS w stosunku do HDFa										
	I	II	IIIA	IIIB	IIIC	IIID	IVA	IVB	VI	VII	IX
Liczba genów o obniżonej ekspresji	2	1	2	2	3	2	1	1	0	1	1
Liczba genów o podwyższonej ekspresji	1	0	4	2	0	2	1	2	0	0	4
Razem	3	1	6	4	3	4	2	3	0	1	5



Ryc. 8. Mapa ciepła (ang. *heat-map*) wskazująca na zmiany w ekspresji genów związanych z funkcjonowaniem mikrotubul przy dobranym poziomie istotności 10^{-6} , ukazująca stopień zmiany ekspresji (obniżenie – kolor niebieski lub podwyższenie – kolor czerwony) danego genu pomiędzy dowolną parą linii komórkowych wykorzystywanych w pracy (* - zmiana istotna statystycznie).

LITERATURA:

Alfaro-Aco R., Petry S. (2015) Building the microtubule cytoskeleton piece by piece. *J Biol Chem.* 290(28):17154–17162.

Amos L., van den Ent F., Löwe J. (2004) Structural/functional homology between the bacterial and eukaryotic cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* 16(1):24-31.

Bayley P., Schilstra M., Martin S. (1990) Microtubule dynamic instability: numerical simulation of microtubule transition properties using a Lateral Cap model. *J Cell Sci.* 95 (Pt 1):33-48.

Bork P., Sander C., Valencia A. (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(16):7290-4.

Bray D. (2000) *Cell Movements in: Molecules to Motility.* Garland Science. Nowy Jork.

Caplow M., Shanks J. (1996) Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol Biol Cell.* 7(4):663-75.

Carrier M., Didry D., Pantaloni D. (1987) Microtubule elongation and guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. Role of guanine nucleotides in microtubule dynamics. *Biochemistry.* 26(14):4428-37.

Cianfrocco M., DeSantis M., Leschziner A., Reck-Peterson S. (2015) Mechanism and Regulation of Cytoplasmic Dynein. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 31: 83–108.

Cooper GM. (2000) *Microtubules w: The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Cote R., Borisy G. (1981) Head-to-tail polymerization of microtubules in vitro. *J Mol Biol.* 150(4):577-99.

Dimitrov A., Quesnoit M., Moutel S., Cantaloube I., Poüs C., Perez F. (2008) Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science.* 322(5906):1353-6.

Drechsel D., Kirschner M. (1994) The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Curr Biol.* 4(12):1053-61.

Dustin P. (1984) Springer, Berlin, Heidelberg.

Erber A., Riemer D., Bovenschulte M., Weber K. (1998) Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J Mol Evol.* 47(6):751-62.

Esue O., Cordero M., Wirtz D., Tseng Y. (2005) The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J Biol Chem.* 280(4):2628-35.

Flaherty K., McKay D., Kabsch W., Holmes K. (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(11):5041-5.

Fletcher A., Mullins R. (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463(7280): 485–492.

Gardiner J. (2013) The evolution and diversification of plant microtubule-associated proteins. *Plant J.* 75(2):219-29.

Gardner M., Hunt A., Goodson H., Odde D. (2008) Microtubule assembly dynamics: new insights at the nanoscale. *Curr Opin Cell Biol.* 20(1):64-70.

Hamada T. (2007) Microtubule-associated proteins in higher plants. *J Plant Res.* 120(1):79-98.

Honda Y., Tsuchiya K., Sumiyoshi E., Haruta N., Sugimoto A. (2017) Tubulin isotype substitution revealed that isotype combination modulates microtubule dynamics in *C. elegans* embryos. *J Cell Sci.* 130(9):1652-1661.

Horio T., Hotani H. (1986) Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature.* 321(6070):605-7.

Horio T., Murata T. (2014) The role of dynamic instability in microtubule organization. *Front Plant Sci.* 5:511.

Hunter A., Wordeman L. (2000) How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J Cell Sci.* 113 Pt 24:4379-89.

Iozzo V., San Antonio J. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest.* 1; 108(3): 349–355.

Kamal A., Goldstein L. (2000) Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 12(4):503-8.

Kerssemakers J., Munteanu E., Laan L., Noetzel T., Janson M., Dogterom M. (2006) Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature.* 442(7103):709-12.

Kirschner M., Mitchison T. (1986) Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell.* 45(3):329-42.

Kull F., Sablin E., Lau R., Fletterick R., Vale R. (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature.* 380(6574):550-5.

Lodish H., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000) *The Actin Cytoskeleton in: Molecular Cell Biology.* 4th edition. W. H. Freeman. New York.

Löwe J., Amos L. (2009) Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(2):323-9.

Mitchison T. (1992) Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol Biol Cell.* 3(12):1309-15.

Mitchison T. (1993) Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science.* 261(5124):1044-7.

Mitchison T., Kirschner M. (1984a) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312(5991):237-42.

Mitchison T., Kirschner M. (1984b) Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature.* 312(5991):232-7.

Muenzer J., (2011) Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 50 Suppl 5:v4-12.

Mukherjee A., Dai K., Lutkenhaus J. (1993) Escherichia coli cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(3):1053-7.

O'Brien E., Voter W., Erickson H. (1987) GTP hydrolysis during microtubule assembly. *Biochemistry.* 26(13):4148-56.

RayChaudhuri D., Park J. (1992) Escherichia coli cell-division gene ftsZ encodes a novel GTP-binding protein. *Nature.* 359(6392):251-4.

Roberts A., Kon T., Knight P., Sutoh K., Burgess S. (2013) Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(11):713-26.

Schek H., Gardner M., Cheng J., Odde D., Hunt A. (2007) Microtubule assembly dynamics at the nanoscale. *Curr Biol.* 17(17):1445-55.

Vesteg M., Krajcovic J. (2008) On the origin of eukaryotic cytoskeleton. *Riv Biol.* 101(1):109-18.

Walker R., O'Brien E., Pryer N., Soboeiro M., Voter W., Erickson H., Salmon E. (1988) Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol.* 107(4):1437-48.

Wickstead B., Gull K. (2011) The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 194(4): 513–525.

Wraith J. (2013) Mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *Handb Clin Neurol.* 113:1723-9.

Yutin N., Koonin E. (2012) Archaeal origin of tubulin. *Biol Direct.* 7:10.

Zhang L., Hou X., Ma R., Moley K., Schedl T., Wang Q. (2014) Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. *FASEB J.* 28(3):1435-45.

WNIOSEK KOŃCOWY I PROŚBA O PRZEDŁUŻENIE REALIZACJI PROJEKTU

DO 31 GRUDNIA 2022 R.

W ramach przeprowadzonych prac uzyskano interesujące wyniki, wskazujące na istotne zmiany w cytoszkielecie komórek pochodzących od pacjentów z chorobą Sanfilippo.

Analizy związane z autofagią oraz hamowaniem syntezy glikoaminoglikanów zostały opisane w załączonym manuskrypcie, który został wysłany do międzynarodowego czasopisma naukowego (fakt finansowania badań przez Fundację Sanfilippo został wskazany w tym artykule). Należy oczekiwać, że dodatkowe prace będą musiały być wykonane po uzyskaniu opinii recenzentów (Uwaga – manuskrypt ten zawiera również wyniki badań innego projektu finansowanego przez Fundację Sanfilippo, pt. „Wpływ eksperymentalnej terapii z użyciem kurkuminy, kapsaicyny i resweratrolu na zmiany behawioralne, poziom GAG oraz obwodowe i ośrodkowe procesy zapalne w mysim modelu mukopolisacharydozy IIIB”).

Na podstawie powyższego, zwracam się z prośbą o przygotowanie aneksu do umowy, umożliwiającego przedłużenie realizacji tego projektu do 31 grudnia 2022 r.



prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

Gdańsk, 9 stycznia 2022 r.