

Flawonoidy to ponad 8 000 związków, podzielonych ze względu na strukturę chemiczną na 6 grup. Na szczególną uwagę zasługują właściwości przeciwnowotworowe flawonoidów, korelowane z korzystnym wpływem na układ sercowo – naczyniowy. W badaniach klinicznych wykazano również, że spożycie flawonoidów spożywanych wraz z pokarmem, wpływa na zmniejszenie ryzyka śmierci z powodu choroby wieńcowej serca. Spośród licznych parametrów, wnikliwie studiowane są przeciwnowotworowe właściwości tych związków.

Genisteina (5,7-dihydroksi-3-(4-hydroksyfenylo)-4H-1-benzopiran-4-on), spotykana w wielu roślinach izoflawon z grupy flawonoidów, znalazła szczególne zastosowanie w terapii mukopolisacharydoz (MPS). Mukopolisacharydozy stanowią grupę rzadkich, wrodzonych chorób metabolicznych należących do lizosomalnych chorób spichrzeniowych (LChS, ang. Lysosomal Storage Disorders, LSDs). Lizosomalne choroby spichrzeniowe, to grupa schorzeń, u podstawy których leży dysfunkcja jednego z enzymów lizosomalnych, wynikiem czego jest gromadzenie niezdegradowanych substancji. Przyczyną występowania LChS, a wśród nich mukopolisacharydoz, jest obecność mutacji w specyficznym genie, czego następstwem jest znaczny niedobór lub brak aktywnego enzymu, białka funkcjonalnego białka. Wynikiem tego jest gromadzenie się w lizosomach złogów substratów, które w normalnych warunkach ulegają rozkładowi. Wspólnymi objawami dla wielu chorób spichrzeniowych są nieprawidłowości w funkcjonowaniu serca, układu oddechowego, kości, stawów oraz w niektórych przypadkach centralnego układu nerwowego. Mukopolisacharydozy charakteryzują się wysoką heterogennością obrazu klinicznego, przy postępującej akumulacji glikoaminoglikanów (GAG), określanej niegdyś jako mukopolisacharydy. Na podstawie szeregu badań, zaobserwowano, że genisteina hamuje biosyntezę GAG i wpływa na zmniejszenie ich spichrzenia w lizosomach fibroblastów pochodzących od pacjentów cierpiących na MPS I, MPS II, MPS IIIA oraz MPS IIIB. Istotną cechą genisteiny jest to, że jako substancja niskociepnotopna, ma zdolność przenikania bariery krew – mózg. Implikuje to teoretyczną zdolność do łagodzenia objawów MPS ze strony ośrodkowego układu nerwowego.

Celem niniejszego projektu jest przeprowadzenie transkryptomowego profilowania genomu z zastosowaniem mikromacierzy DNA. Umożliwi to ocenę wpływu substancji biologicznie czynnych, w tym wypadku wybranych związków z grupy flawonoidów – genisteiny i kemferolu oraz ich mieszaniny, na ekspresję genów fibroblastów pochodzących od myszy dotkniętej MPS I. Mikromacierze stanowią jedno z najnowocześniejszych narzędzi biologii molekularnej, pozwalające na uzyskanie informacji o profilu ekspresji wszystkich poznanych dotychczas genów. Dzięki poznaniu profilu ekspresji genów, w obecności różnych stężeń badanych związków, możliwa będzie ocena ich wpływu na metabolizm badanej linii komórkowej *in vitro* a w szczególności na przemiany glikoaminoglikanów oraz gospodarkę lizosomalną. Pozwoli to poznać i stworzyć sieci zależności pomiędzy analizowanymi genami oraz wysnuć hipotezy o roli tych elementów dla metabolizmu komórki.

Przeprowadzona, w ramach wcześniejszych badań, analiza danych uzyskanych dzięki zastosowaniu mikromacierzy DNA, ujawniła wpływ genisteiny na obniżenie poziomu ekspresji genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy GAG. Co ciekawe, zaobserwowano również wpływ izoflawonu na podwyższenie poziomu ekspresji genów kodujących białka lizosomalne, w tym enzymy degradacji GAG. Wynika z tego, że rola genisteiny nie ogranicza się jedynie do modulowania biosyntezy, ale również degradacji glikoaminoglikanów. Kontynuacją badań stanowiła analiza mikromacierzowa wpływu kolejnych flawonoidów – kemferolu i daidzeiny oraz odpowiednio ich mieszanin z genisteiną, na profil ekspresji genów ludzkich fibroblastów. Analiza porównawcza profilu ekspresji genów kodujących wybrane białka lizosomalne, w tym hydrolazy, wykazała znaczące podobieństwo pomiędzy wpływem na ekspresję genisteiny (izoflawonoidu) i kemferolu (flawonolu). Bardzo obiecujące wydają się wyniki wskazujące na znaczące podwyższenie ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm lizosomu po zastosowaniu mieszaniny kemferolu i genisteiny. Poznanie globalnego profilu ekspresji genów ludzkich fibroblastów pod wpływem działania wybranych flawonoidów umożliwiło przygotowanie map oddziaływania i zależności pod wpływem działania związków. Widoczna zmiana aktywności genów komórek eksponowanych na flawonoidy, w wielu przypadkach daje nadzieję na możliwość terapeutycznego zastosowania tych substancji w terapii szeregu schorzeń. Ze względu na szacunkowy charakter danych uzyskanych dzięki analizie mikromacierzowej, poziom ekspresji wybranych genów zweryfikowano z zastosowaniem ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) – najdokładniejszej metody oceny poziomu ekspresji genów. Podwyższenie pod wpływem działania flawonoidów ekspresji genów defektywnych w przypadku poszczególnych chorób lizosomalnych, związane jest z modulacją przez genisteinę poziomu ekspresji czynnika biogenezy lizosomów - czynnika transkrypcyjnego EB, TFEB (ang. EB transcription factor) oraz zwiększenie wydajności translokacji wspomnianego czynnika z cytoplazmy do jądra. Skutkuje to w konsekwencji podniesienie ekspresji wielu genów kodujących białka lizosomalne, w tym hydrolazy. Wpływ genisteiny i innych flawonoidów na zwiększenie udziału procesów degradacji w funkcjonowaniu lizosomów może mieć szczególne znaczenie u pacjentów obciążonych mutacjami skutkującymi obniżeniem ilości dostępnego w komórce enzymu.

Wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania flawonoidów w modelu *in vitro* ma niezwykle znaczenie ze względu na szerokie spektrum zastosowania tych związków. Istotne jest zarówno poznanie potencjalnego działania korzystnego, jak i ewentualnego toksycznego na metabolizm komórki. Przygotowanie map genów o ekspresji modulowanej pod działaniem flawonoidów pozwala porównać i określić najbardziej korzystne mieszaniny i stężenia testowanych substancji. Stanowi to niezbędne uzupełnienie panelu badań oraz podstawę do wyjaśnienia różnic w działaniu flawonoidów obserwowanych w przypadku hodowli ludzkich komórek *in vitro*, zwierzęcych modeli MPS oraz terapii eksperymentalnych z udziałem pacjentów dotkniętych tymi chorobami.