

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Molekulárně genetické a biochemické studie vybraných dědičných
metabolických onemocnění, vývoj a aplikace nových metod**

Ing. Dita Mušálková

2016

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav dědičných metabolických poruch

Školitel: MUDr. Martin Hřebíček, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	4
Úvod	5
Cíle práce.....	5
Metody	6
Výsledky a diskuse.....	10
Izolace lysosomálních membrán z kultivovaných buněk	10
Ověření vlivu promotorových variant genu <i>HGSNAT</i>	12
Vývoj nových metod pro stanovení zešíkmení chromosomu X.....	13
Aplikace nových metod pro stanovení zešíkmení chromosomu X	18
Analýza poměrů XCI u dívky s velmi vzácnou manifestací MPS II.....	18
Analýza poměrů XCI v rodině s mutací v genu <i>HPRT1</i>	20
Analýza poměrů XCI v explantátu jater dívky s deficitem OTC	21
Závěr.....	26
Použitá literatura	28
Seznam publikací vztahujících se k dizertační práci.....	31
Seznam publikací, které se nevztahují k dizertační práci.....	31

Abstrakt

Dědičné poruchy metabolismu (DMP) jsou různorodou skupinou několika set různých onemocnění s relativně vysokou kumulativní incidencí (uvádí se až 1:600). U DMP dochází k hromadění substrátu a nedostatku produktu v určitých metabolických cestách, což je způsobeno deficitem enzymu, popř. jeho aktivátoru, nebo dysfunkcí transportního proteinu, avšak základní příčina je na úrovni DNA. Příčiny rozdílných fenotypových projevů u pacientů se stejným genotypem často nejsou známy.

V rámci své práce na Ústavu dědičných metabolických poruch, I.LF UK a VFN jsem se zabývala návrhem nových metod pro výzkum DMP a aplikací těchto metod u pacientů a jejich rodin. Vytvořila jsem postupy pro izolaci lysosomálních membrán, sloužící pro výzkum lysosomálních stádavých onemocnění, ale také obecných vlastností lysosomů. Dále jsem zavedla několik metodik pro stanovení poměru inaktivace chromosomu X, čímž se výrazně navýšilo procento žen, u kterých je možné tento parametr stanovit. Tyto metody nyní využíváme u heterozygotních žen s X-vázaným onemocněním, u nichž studujeme vliv X-inaktivace na fenotypové projevy onemocnění. Podrobněji je v této práci popsán případ dívky s manifestací mukopolysacharidosy typu II, dívky s deficitem enzymu OTC a rodiny s mutací v genu *HPRT1*.

Abstract

Inherited metabolic disorders (IMD) form a diverse group of several hundred different diseases with a relatively high cumulative incidence (stated up to 1:600). They are associated with accumulation of the substrates and lack of the products in specific metabolic pathways, which is caused by deficiency of the enzyme or its activator, or dysfunction of the transport protein. However, the underlying cause is at the DNA level. The grounds for different phenotype manifestation in patients with the same genotype are often not known.

During my work at the Institute of Inherited Metabolic Disorders, I designed several new methods for the research of IMD and applied them in the patients and their families. I created procedures for the isolation of lysosomal membranes that are used for the research of lysosomal storage disorders and general properties of lysosomes. Next, I introduced several novel assays for determination of the X-inactivation ratio, which led to a significant increase of informative women. Nowadays, we use these methods in heterozygous women with X-linked diseases in order to study the influence of X-inactivation on the manifestation of the diseases. The cases of a girl with mucopolysaccharidosis type II, a girl with OTC deficiency and a family with the mutation in *HPRT1* gene are described here in more details.

Úvod

Z patofyziologického hlediska mohou být dědičné metabolické poruchy (DMP) rozděleny na tři základní skupiny (Fernandes J. et al., 2008): DMP vedoucí k intoxikaci (např. poruchy cyklu močoviny), DMP postihující energetický metabolismus (např. mitochondriální poruchy) a DMP s komplexními molekulami, které postihují buněčné organely a zahrnují choroby s poruchou syntézy nebo katabolismu komplexních molekul. Do poslední skupiny spadají mimo jiné lysosomální střádavá onemocnění, heterogenní skupina zhruba 60 onemocnění, které lze na základě složení a morfologie střádaného materiálu rozdělit na glykogenosy, mukopolysacharidosy, glykoproteinosy, (sfingo)lipidosy a neuronální ceroidní lipofusinosy. Z hlediska dědičnosti převažuje u DMP autosomálně recesivní typ. U X-vázaných poruch (např. Fabryho choroba, mukopolysacharidosa typu II, deficit ornitintraskarbamylasy, Lesch-Nyhanův syndrom a jiné) je typické postižení hemizygotů. Klinická manifestace u heterozygotních žen je velmi rozmanitá a je ovlivněna inaktivací chromosomu X (X-inaktivací, XCI) nesoucího danou mutaci.

Cíle práce

Předmětem této práce bylo vytvořit nové metody pro studium dědičných metabolických poruch a tyto metody dále u vybraných onemocnění aplikovat.

Tato studie obsahuje následující pododdíly:

- A. Vytvoření jednoduché metody pro obohacení lysosomů/lysosomálních membrán za účelem výzkumu obecných vlastností lysosomů, jejich obsahu a lysosomálních proteinů, ale také změn probíhajících u lysosomálních střádavých onemocnění.
- B. Ověření, zda promotorové varianty rs4523300 a rs149596192 genu *HGSNAT*, kódujícího lysosomální membránový enzym, mají vliv na aktivitu enzymu měřenou v lymfocytech zdravých osob. Tyto varianty popsala ve své dizertační Eva Richtrová (Richtrová E., 2014) u šesti pacientů. Při analýze luciferasovou metodou měly významný dopad na expresi reportéru, a proto by potenciálně mohly mít patogenní vliv.
- C. Dokončení návrhu metod pro stanovení poměru inaktivace chromosomu X, práce započaté v diplomové práci (Mušálková D., 2011), a validace těchto metod na souboru sta vzorků. Alternativní metody, které nejsou založeny na dinukleotidových repeticích, jsou stále potřebné, a to jak v případech, kdy standardní metoda není použitelná, tak pro potvrzení jejích výsledků.
- D. Využití nových metod pro stanovení poměru X-inaktivace u žen heterozygotních pro X-vázaná onemocnění různé povahy, nejen lysosomální střádavá onemocnění. Podrobněji je zde popsán případ dívky s mukopolysacharidosou typu II, rodiny s mutací v genu *HPRT1* a dívky s deficitem enzymu OTC, která prošla transplantací jater.

Metody

Kultivace buněčných kultur

Buňky linií HEK293 nebo HeLa byly kultivovány v 75 cm² lahvích v komerčně dodávaném mediu DMEM (ThermoFisher Scientific) obohaceném o antibiotika a 10% FBS (PAA Laboratories). Kultivace byla prováděna v termostatu při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂.

Homogenizace buněčných linií

Buňky byly sesbírány škrábáním do pufru PBS a promyty v isotonickém TEA pufru (10 mM trietanolamin, 1 mM Na₂EDTA, 10 mM CH₃COOH, pH 7,2) s 250 mM sacharosou (Lach-Ner). Homogenizace buněk byla provedena ve skleněném homogenizátoru Dounce (Kimble Chase Kontes) při 4 °C. Homogenát byl centrifugován v centrifuze 4K15 (Sigma) 10 min při 1000 g, peleta byla znovu homogenizována a centrifugována. Supernatanty byly spojeny a centrifugovány 15 min při 11 000 g pro získání organelové pelety.

Lyze lysosomů

Organelová peleta byla resuspendována v pufru složeném z 10 mM HEPES (pH 7,2), 1 mM Na₂EDTA, 250 mM sacharosy a 20 mM methionin metylesteru (MME) (Sigma-Aldrich) a inkubována 15-60 min za stálého míchání v rotátoru Multi Bio RS-24 (Biosan) při pokojové teplotě. Poté byla suspenze přenesena na led a přidány inhibitory proteáz cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche). Suspenze po různých dlouhých inkubacích byly centrifugovány v centrifuze 4K15 (Sigma) 25 min při 25 000 g. V supernatantech a resuspendovaných peletách byly měřeny aktivity lysosomálních enzymů a na základě toho určena úroveň lyze.

Příprava lineárního a krokového sacharosového gradientu

Lineární sacharový gradient byl připraven z 15 ml 32,5% a 15 ml 55,5% sacharosy (v 10 mM HEPES pufru) v gradientovém mixeru (Sigma-Aldrich) za použití peristaltické pumpy Varioperpex II (LKB). Gradient byl převrstven organelovým koncentrátem, který byl vystaven působení MME. Krokový gradient byl připraven z 6 ml 41% nebo 35% sacharosy převrstvené 5 ml 20% sacharosy a 5 ml organelového koncentrátu. Gradienty byly centrifugovány přes noc při 112 700 g_{max} v ultracentrifuze Optima L-90K ve výkyvném rotoru SW32 nebo SW32.1 (Beckman-Coulter). Frakce byly sbírány od hladiny. U lineárního gradientu bylo odebráno 19 frakcí po 2 ml a u krokového 16 frakcí po 1 ml, nebo proužek z rozhraní 20/41% sacharosy. Frakce s nejvyšší aktivitou glukocerebrosidasy byly naředěny pufrům (10 mM Tris-HCl, pH 7,2) na desetinásobný objem a centrifugovány 2h při 250 000 g_{max} v ultracentrifuze Optima L-90K v rotoru 70 Ti. Peleta byla resuspendována a zmrazena.

Příprava lineárního gradientu z OptiPrepu

Lineární gradient z OptiPrepu (iodixanol, Sigma-Aldrich) byl připraven obdobně jako sacharový gradient. K tomu bylo použito 6 ml 22% roztoku a 6 ml 5% roztoku, které byly připraveny smícháním pracovního roztoku (50% w/v isotonický roztok iodixanolu) s pufrům (0,25 M sacharosa v HEPES/EDTA). Gradient byl převrstven 5 ml postnukleárního supernatantu, obsahujícího 4% iodixanol, a centrifugován 2 hodiny při 100 000 g. Frakce byly sbírány od hladiny (21 frakcí po 0,8 ml).

Měření změny pH pomocí akridinové oranže

Schopnost změny pH v závislosti na přidávku ATP byla u izolované frakce ověřena dle metody popsané v literatuře (Dell'Antone P., 1979; Moriyama Y. et al., 1982).

Sonikace vzorků a měření dalších parametrů

Vzorky pro měření enzymových aktivit byly sonikovány na přístroji Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (Cole-Parmer). Aktivity enzymů glukocerebrosidasy, hexosaminidasy, HGSNAT, sukcinátdehydrogenasy, alkalické a kyselé fosfatasy, katalasy a NADPH-cytochrom *c* reduktasy byly měřeny podle protokolů uvedených v literatuře (Graham J.M., 1993; Wenger D.A. a Williams C., 1991; Voznyi Ya.V. et al., 1993). Objemy činidel byly upraveny pro umožnění měření na mikrotitračních destičkách. Rozložení iodixanolu a sacharosy v gradientech bylo kontrolováno měřením refrakčních indexů na stolním optickém refraktometru.

Měření koncentrace proteinu

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody Bradfordové (Bradford M.M., 1976), popřípadě byla pro měření využita Hartree-Lowryho metoda (Hartree E.F., 1972). U vzorků pro SDS-PAGE byl použit infračervený spektrometr DirectDetect (Merck Millipore). Signál byl kvantifikován v oblasti 1600–1700 cm^{-1} .

SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Separací gel byl připraven smícháním 40% roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (Sigma-Aldrich), separačního pufru (1,5 M Tris base, 13,9 mM SDS, pH 8,8), 0,06% APS a 0,06% TEMED. Pro přípravu zaostřovacího gelu byl použit pufr o pH 6,8 obsahující 0,5 M Tris base a 13,9 mM SDS. Gel byl připevněn do aparatury MightySmall SE260 (Hofer). Vzorky (10 μg) byly smíchány s pufrem 6x SDS-PAGE (0,012% bromfenolová modř, 30% glycerol, 0,347 M SDS a popř. 6% β -merkaptoetanol). Elektroforéza probíhala v pufru (192 mM glycin, 25 mM Tris base, 3,47 mM SDS) při napětí 70 V, po 1 h zvýšeném na 120 V.

Western blot

Rozdělené vzorky byly blotovány na PVDF membránu Immobilon-P (Merck Millipore) v polosuché blotovací aparatuře (Biotec-Fischer). Blotovací papíry byly ekvilibrovány v blotovacím pufru (48 mM Tris base, 39 mM glycin, 0,037% SDS, 20% metanol, pH 9,2), membrána navíc 15 s v metanolu. Přenos proteinů na membránu probíhal 1h při konstantním proudu 1-2 mA/cm^2 . Poté byla membrána 1h blokována v pufru PBS-T (PBS s 0,05% TWEEN20) obsahujícím 3% BSA (Serva Electrophoresis) a promyta. Pro detekci byla použita králičí primární protilátka anti-LAMP1 (darováno Dr. Carlssonem, University of Umea, Švédsko), králičí protilátka anti-OTC (HPA000243) a myší protilátka anti-GAPDH (G8795) od Sigma-Aldrich a králičí protilátka anti-CPS1 (ab155083, Abcam). Membrána byla inkubována 1h s primární protilátkou v PBS-T s 1% BSA, promyta a inkubována 45 min s příslušnou sekundární protilátkou konjugovanou s enzymem HRP v PBS-T s 1% BSA. Po promytí membrány byl na blot aplikován chemiluminiscenční substrát SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) a signál detekován na přístroji ChemiGeniusQ za pomoci programu GeneSnap (SynGene). Pro vyhodnocení výsledků byl použit program GeneTools (SynGene). Všechny inkubace a promývání byly provedeny při pokojové teplotě a za stálého míchání na přístroji Orbital Shaker OS-20 (Biosan).

Příprava vzorků gDNA, RNA a cDNA

Genomová DNA byla izolována standardní fenol-chloroformovou extrakcí nebo s použitím QiaAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) dle přiloženého protokolu. RNA byla izolována za použití TRIzol (Invitrogen). Z izolované RNA byla podle standardního protokolu připravena cDNA pomocí reverzní transkriptasy SuperScript II. DNA a RNA z jater byla izolována pomocí soupravy AllPrep DNA/RNA/Protein Kit (Qiagen). Koncentrace a kvalita nukleových kyselin byla měřena na přístroji Nanodrop ND-1000 Spectrometer (Thermo Scientific).

Vzorky genomové DNA pro validaci metod byla získány z lymfocytů periferní krve separovaných na vrstvě Ficoll-Paque (GE Healthcare). DNA byla získána od 100 zdravých dobrovolných dárců ve věku od 9 do 72 let (průměrný věk 36,5 let, medián 35 let), pěti mužských dobrovolníků a 18 členů pěti rodin. Všichni dárči byli českého původu. Studie byla povolena etickou komisí a ode všech zúčastněných byl získán informovaný souhlas.

Štěpení DNA a polymerázová řetězová reakce (PCR)

Analyzovaná DNA (200 ng) byla přes noc inkubována při 37 °C s 10 U metylačně senzitivního restrikčního enzymu a 1-3 U pomocného restrikčního enzymu (NEB) v příslušném pufru a s 100 µg/ml BSA pokud bylo potřeba. Stejně množství DNA bylo inkubováno paralelně pouze s pomocným enzymem. Enzymy byly inaktivovány inkubací 10 min při 95 °C a 30 ng DNA bylo následně amplifikováno pomocí PCR, přičemž jeden z primerů (Applied Biosystems) v každé sadě byl fluorescenčně značen. Reakce byly prováděny v objemu 10 µl a obsahovaly 1x PC2 pufr, 200 µM dNTPs, 0,3 µM primery, 10% DMSO, 240 mU KlenTaq1 (DNA Polymerase Technology) a 2,2 mU DeepVent polymerasy (NEB). Amplifikace probíhala v termocykleru C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad). Denaturace (94 °C 2 min) byla následována 35 cykly (94 °C 5 s, 68 °C 20-25 s) a finální extenzí (68 °C 30 min).

Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu

Agarosa (Serva Electrophoresis) byla rozpuštěna v TBE pufru (89 mM Tris, 112 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA) a po ztuhnutí pufrům přelita. Vzorky byly smíchány s 6x Loading dye (Thermo Scientific) a interkalační barvičkou GelRed (Biotium). Na gel byly nanášeny paralelně se standardem GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific) a elektroforéza probíhala při intenzitě ~10 V/cm. Vizualizace DNA byla provedena na UV transiluminátoru (Vilber Lourmat).

Kapilární elektroforéza

Produkty PCR byly zředěny vodou a smíchány s Hi-Di formamidem (Thermo Scientific) a standardem GeneScan 500ROX (Applied Biosystems) v poměru 0,5:9:0,5 (celkem 10 µl). Směsi byly separovány na sekvenátoru 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pro zpracování výsledků byl použit program GeneMapper software v4.1 (Applied Biosystems).

Určení poměru XCI pomocí nových metod

Vzorky gDNA byly amplifikovány pomocí pěti sad primerů pro identifikaci informativních vzorků, u kterých byl následně stanoven poměr XCI. Ten byl vypočten jako poměr ploch píků dvou alel analyzovaného polymorfního místa získaných u vzorku štěpeného pomocí metylačně senzitivního restrikčního enzymu *Hpa*II nebo *Hha*I. Tento mezivýsledek byl zkorigován poměrem ploch píků u neštěpeného vzorku. Poměr XCI byl vypočten

u heterozygotů, u kterých se produkty PCR lišily o dvě nebo více jednotek repetice. V každé sérii vzorků byl pro potvrzení úplného štěpení také zahrnut mužský vzorek. Výsledný poměr XCI byl průměrem dvou měření.

Určení poměru XCI s využitím oblasti genu *AR*

Konvenční metoda HUMARA byla provedena podle publikovaného protokolu (Racchi O. et al., 1998), přičemž jeden z primerů byl značen fluorescenční značkou HEX. Poměry XCI byly rovněž určovány pomocí metody AR-MSP (Kubota T. et al., 1999).

Určení poměru XCI na základě transkripčních metod – metoda SNaPshot

Pro metodu SNaPshot byly využity exonové jednobázové polymorfismy (SNP) v genech *ZNF75D* (rs1129093), *IDS* (rs11549009), *MAGED2* (rs1043031 a rs1043034) a *MED12* (rs5030619). Reakce byly provedeny dle protokolu výrobce (ABI PRISM SnaPshot Multiplex Kit, Applied Biosystems). Principem metody bylo provedení RT-PCR a hybridizace oligonukleotidových sond v těsné blízkosti SNP. Poté byly tyto sondy prodlouženy o jednu bázi připojením fluorescenčně značeného ddNTP na pozici zkoumaného SNP. Produkty reakce byly separovány pomocí kapilární elektroforézy a velikosti píků byly použity pro výpočet poměru exprese alel, který byl upraven podle kalibračních křivek.

Určení poměru XCI na základě sekvenování produktů RT-PCR

RT-PCR produkty byly analyzovány pomocí hlubokého sekvenování na přístroji MiSeq (Illumina). Pro rozlišení maternální a paternální alely bylo možné u pacientky s deficitem OTC využít jak mutaci c.583G>C v genu *OTC*, tak SNP c.137A>G (rs1800321). U pacientky s MPS II byla využita mutace c.1403G>A v genu *IDS* a SNP c.156A>T (rs12097) v genu *LAMP2*.

Statistická analýza

Statistická analýza (korelace, srovnávání metod) byla provedena za využití softwarového balíčku XLSTAT (Addinsoft). Shoda metod a opakovatelnost byla určena na základě Bland-Altmanovy metody (Bland J.M. a Altman D.G., 1986).

Ostatní metody

Jakékoli další metody využívané ostatními spolupracovníky na ÚDMP, resp. jejich specifické variace, jsou přehledně popsány v literatuře, která je připojena jako příloha k dizertační práci.

Výsledky a diskuse

Izolace lysosomálních membrán z kultivovaných buněk

Lysosomální membrány (LM) byly tradičně izolovány pomocí celé řady metod a jejich kombinací (diferenciální centrifugace, separace v denzitním gradientu aj.), přičemž se často využívala účelová změna vlastností určitých organel, popřípadě jejich lyze. Pro výzkum proteinů a lipidů LM jsme vyvinuli jednoduchou a časově nenáročnou metodu sloužící k obohacení LM z kultivovaných buněk linií HEK293 a HeLa (Mušálková D. et al., 2013).

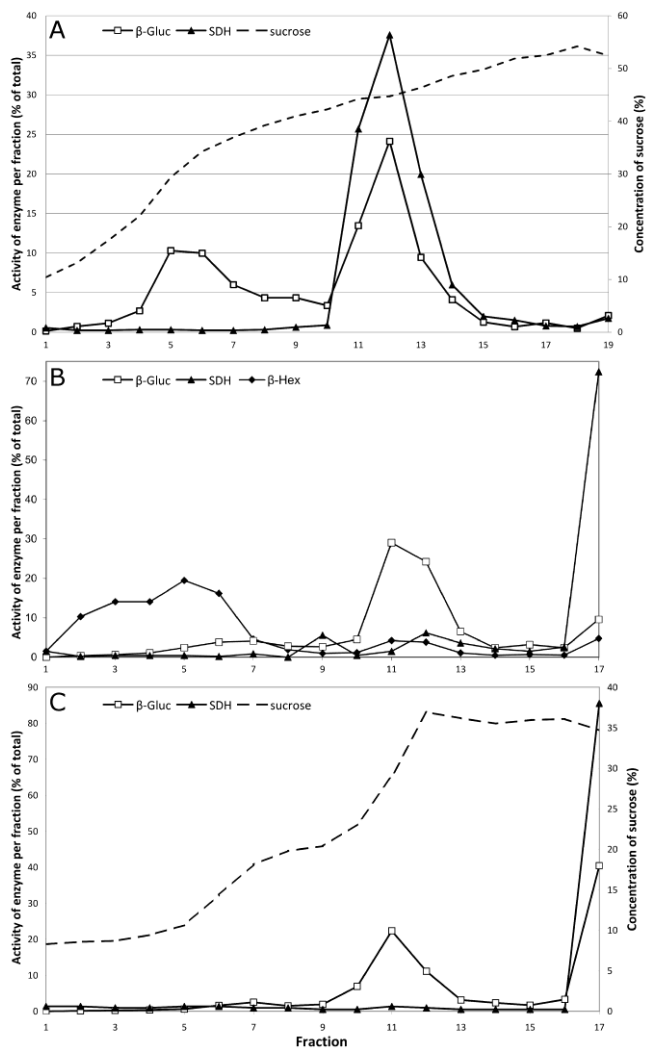
Organelový koncentrát jsme vystavili po dobu 45 min působení 20 mM metylesteru methioninu (MME), který se používá pro selektivní lyzi lysosomů (Goldman R. a Kaplan A., 1973; Schröder B. et al., 2007a). Metylestery určitých aminokyselin prostupují do lysosomu, kde jsou štěpeny pomocí hydrolas. Následně dochází k akumulaci volných aminokyselin a změna osmotického tlaku způsobí prasknutí lysosomu. Čas působení a koncentrace MME byly určeny na základě optimalizace a jsou výsledkem kompromisu mezi úrovní lyze lysosomů a proteolýzy. Pro obohacení LM jsme se nejdříve neúspěšně pokoušeli využít diferenciální centrifugaci a následně jsme se rozhodli provést separaci lyzátu na lineárním gradientu sacharosy o koncentraci 32,5-55,5 % (Schröder B. et al., 2007a). Pro sledování obohacení LM byla využita aktivita glukocerebrosidasy (β -Gluc), což je periferní enzym LM bez transmembránové domény, používaný jako marker LM (Schröder et al., 2007a,b). U lineárního gradientu bylo možné pozorovat dvě oblasti se zvýšenou aktivitou β -Gluc (obr. 1A), první v oblasti 30-41% sacharosy a druhá v oblasti okolo 45% sacharosy, kde se také, jak ukazuje aktivita sukcinátdehydrogenasy (SDH), vyskytovala drtivá většina mitochondrií. Následně jsme navrhli krokový gradient (lyzát/20% sacharosa/41% sacharosa), ale frakce z rozhraní 20%/41% sacharosy bohatá na β -Gluc obsahovala mitochondriální kontaminaci (obr. 1B). Tento problém byl prakticky eliminován při snížení koncentrace sacharosy ve spodní vrstvě z 41 % na 35 % (obr. 1C), což samozřejmě vedlo ke snížení výtěžku LM (resp. β -Gluc).

Frakce LM získaná z rozhraní 20%/35% sacharosy obsahovala vysoké množství proteinu LAMP1 a měla vysokou aktivitu β -Gluc (tab. 1). Specifická aktivita β -Gluc se při procesu zvýšila průměrně 15x (7-22x, 7 experimentů), promytí membrán pomocí 10 mM Tris pufru vedlo k dalšímu, zhruba dvojnásobnému zvýšení. Celkový výtěžek činil ~9 % počáteční celkové aktivity β -Gluc. Preparát promytých LM měl zřejmě zachovanou aktivitu multiproteinového komplexu vATPasové pumpy H^+ iontů, protože po přidavku ATP ke vzorku došlo k acidifikaci, která byla měřena jako změna absorbance akridinové oranže při 492 nm.

Tab. 1: Purifikace LM z buněčné linie HeLa, typický experiment.

Frakce	Protein		β -glukocerebrosidasa		
	Celkem (mg)	Výtěžek (%)	Výtěžek (%)	Specifická aktivita (nmol/mg/min)	Purifikační faktor
Homogenát (H)	49,5	100	100	1,31	1
Peleta z 1. centrifugace (jádra, buňky)	8,1	16,4	8,4	0,67	-
Postnukleární supernatant (PNS)	37,8	76,3	88,6	1,53	1,2
Peleta z 2. centrifugace (organely, OP)	9,7	19,6	77,1	5,17	3,9
Supernatant po stočení organel (OS)	21,3	43,1	11,2	0,34	-
Frakce LM (frakce 11)*	0,4	0,9	12	18,24	13,9
Promytá frakce LM	0,1	0,3	8,8	38,5	29,6

* Frakce 11 měla nejvyšší specifickou aktivitu β -Gluc v rámci sacharosového gradientu (viz obr. 1).



Obr. 1: Výsledek separace vzorku na lineárním sacharosovém gradientu (A) nebo krokovém gradientu se spodní vrstvou o koncentraci 41 % (B) nebo 35 % (C). Frakce byly sbírány od hladiny. V jednotlivých frakcích byla měřena aktivita glukocererobrosidasy (β -Gluc, marker LM), sukcinátdehydrogenasy (SDH, marker mitochondrii), a popř. β -hexosaminidasy (β -Hex, luminální lysosomální hydrolasa). Aktivita je vyjádřena v procentech celkové aktivity. Z refrakčních indexů byla dopočítána koncentrace sacharosy v procentech (na vedlejší ose). Na panelu (B) lze vidět, že většina aktivity luminálního enzymu β -hexosaminidasy byla detekována ve frakcích 2-6, odpovídajících oblasti, kam byl před centrifugací aplikován vzorek. To ukazuje, že po disrupci lysosomů pomocí MME došlo k vylití solubilního obsahu, který nepronikal do gradientu. Malé množství β -Hex bylo také detekováno ve frakcích 11 a 12 (spolu s β -Gluc), což může být způsobeno tím, že β -Hex přechodně asociuje s membránou nebo byla část β -Hex po prasknutí lysosomu a následném uzavření zachycena uvnitř LM.

Aktivity enzymů, které sloužily jako markery kontaminace jinými buněčnými součástmi, byly obecně nízké (méně než 1 % počáteční celkové aktivity), s výjimkou katalasy (2,6 %), což značí pro mírnou kontaminaci peroxisomy, a alkalické fosfatasy (marker plasmatické membrány). I vysoce purifikované preparáty LM avšak obsahují proteiny plasmatické membrány (Schröder B. et al., 2010). To není překvapivé, protože mezi těmito dvěma kompartmenty dochází skrze endocytosu a sekreční dráhu k početným interakcím (fúzí a oddělováním membránových váčků). Lysosomální lokalizace byla pozorována i u 5'-nukleotidasy (Wattiaux R. et al., 1978), dalšího markeru plasmatické membrány.

O obohacení preparátu LM odstraněním periferních membránových proteinů nebo slabě navázaných luminálních proteinů pomocí oplachů s vysokým obsahem solí (např. 0,1 M Na_2CO_3) jsme se nepokoušeli. Tento krok může být prospěšný, protože snižuje komplexitu vzorku a odstraňuje proteiny nespecificky adsorbované na membrány při frakcionaci. Na druhou stranu vede ke ztrátě asociovaných proteinů, které jsou důležité pro transport a interakce lysosomu.

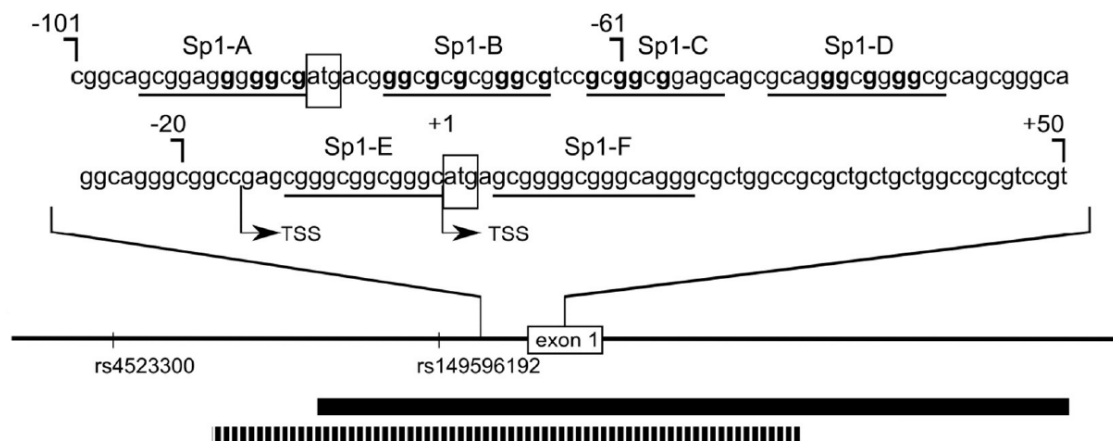
Ačkoli naše metoda neposkytuje LM o vysoké čistotě, výsledné obohacení je porovnatelné s metodou izolace magnetickou chromatografií (Diettrich O. et al., 1998). Výhodou naší metody je, že nevyžaduje nefyziologickou zátěž endosomálně-lysosomálního systému magnetickými částicemi (nebo detergenty), které vedou ke vzniku abnormálních buněk.

Metoda je robustní a velmi účinná při eliminaci mitochondriální kontaminace. Výsledky obohacení a výtěžnosti jsou velmi podobné u obou vyzkoušených buněčných linií HEK293 a HeLa, což naznačuje, že by mohla být adaptována i pro jiné typy buněk. Pro studium lokalizace látek v rámci různých buněčných kompartmentů je nicméně vhodnější využívat např. gradient vytvořený z iodixanolu, který umožňuje jemnější rozdělení organel. Tento gradient může být převrstven přímo postnukleárním supernatantem, čímž se s výhodou vyhneme resuspendaci pelety organelového koncentrátu. To je krok, který se musí provádět velice jemně, protože lysosomy obsahují velké množství degradativních enzymů.

Ověření vlivu promotorových variant genu *HGSNAT*

Acetyl-CoA:α-glukosaminid *N*-acetyltransferasa (dále jen *N*-acetyltransferasa, HGSNAT, EC 2.3.1.78) je lysosomální transmembránový enzym, který katalyzuje acetylaci glukosaminidových zbytků v heparansulfátu, důležitý mezikrok při jeho degradaci. Deficit enzymu způsobuje Sanfilippův syndrom typu IIIC (mukopolysacharidosu typu IIIC, MPS IIIC, OMIM #252930). Enzym je kódován genem *HGSNAT* lokalizovaným na chromosomu 8. U *HGSNAT* byly identifikovány dva potenciální iniciační kodony (Hrebicek M. et al., 2006).

V nedávném článku (Richtrova E. et al., 2016) jsme charakterizovali promotor genu *HGSNAT* jako promotor s divergentní iniciací transkripce, nemetylovaným CpG ostrůvkem a bez přítomnosti TATA (a CAAT) boxu. Pomocí metody 5'RACE byly identifikovány dva hlavní začátky transkripce (TSS) v pozici +1 a -15 (počítáno od downstream ATG), a transkripty tak obsahují pouze downstream ATG. Klíčové regulační elementy jsou obsaženy v úseku o délce 1054 bp nad exonem 1. Silné regulační elementy jsou zřejmě lokalizovány v oblasti -1073/-716 a -101/-20, kam se, jak jsme potvrdili, váže transkripční faktor Sp1 (souhrnně v obr. 2).



Obr. 2: Schéma promotorové oblasti genu *HGSNAT* a exonu a intronu 1 (chr8:42994700-42996700; GRCh37/hg19). Vyznačeny jsou pozice dvou variant, rs4523300 a rs149596192. CpG ostrůvek je vyznačen tlustou černou čarou, nemetylovaný úsek ověřený bisulfitovým sekvenováním čárkovanou čarou. Nahoře je rozepsána sekvence oblasti obklopující začátky transkripce TSS (-101/+50) a podtržením vyznačena predikovaná vazebná místa pro faktor Sp1. Nukleotidy mutované při funkční analýze jsou vyznačeny tučným písmem, dva potenciální iniciační kodony, downstream a upstream ATG, rámečkem.

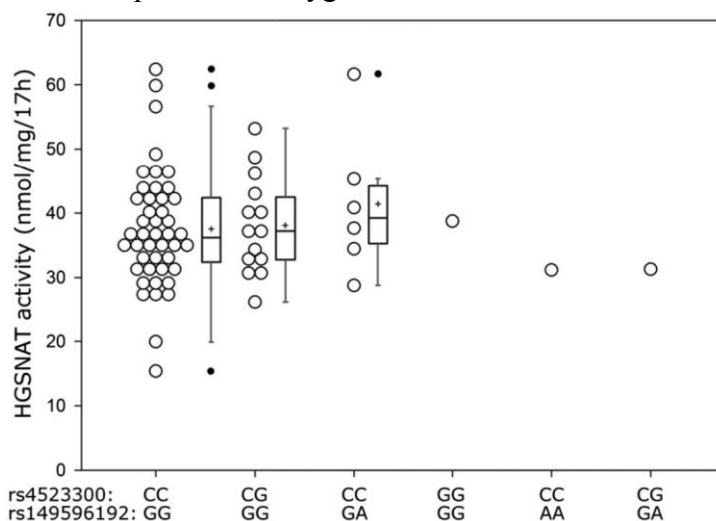
Geny kódující lysosomální proteiny mají často promotory bez TATA boxu a nemetylovaný CpG ostrůvek a takové promotory jsou obvykle asociovány s konstitutivní expresí (Zhu J. et al., 2008). Předpokládá se, že u eukaryotických promotorů bez TATA boxu je vazba RNA polymerasy II a komplexu TFIID, a tudíž iniciace transkripce, umožněna faktorem Sp1, pro

něhož bývají 40-80 bp nad začátkem transkripce lokalizována mnohonásobná vazebná místa (Smale S.T. a Kanadoge J.T., 2003). Vzájemné působení těchto míst není plně pochopeno.

Úplný výčet predikovaných vazebných míst pro transkripční faktory (p -value $< 10^{-6}$) lze nalézt v dodatku ke článku. Mezi potenciální vazebná místa s nižším skóre (p -value $> 10^{-4}$) pak spadá i motiv CLEAR v oblasti -737/-742 a -867/-873, což je vazebné místo pro TFEB, hlavní regulátor biogeneze lysosomu a autofagie (Sardiello M. et al., 2009; Settembre C. et al., 2011). Tato vazebná místa ale pravděpodobně neslouží k vazbě TFEB. Velice málo opravdových motivů CLEAR leží více než 300 bp nad TSS a Palmieri a kol. při využití řady technik nepotvrdili vazbu TFEB na promotor *HGSNAT* (Palmieri M. et al., 2011).

U pěti z 23 pacientů s MPS IIIC v našem souboru byla nalezena promotorová varianta rs4523300 (4 heterozygotně, 1 homozygotně) a u jednoho pacienta vzácná varianta rs149596192 (heterozygotně). Kvůli jejich potenciálně patogennímu dopadu byla provedena analýza těchto variant pomocí luciferasového reportérového systému, která ukázala, že obě varianty vedou k významnému snížení exprese reportéru ($p < 0,05$), a to na 68 % u rs4523300 a 59 % u rs149596192. Bioinformatická studie nepredikovala, že by tyto záměny vedly k inaktivaci vazebného místa pro transkripční faktory.

Následně jsme se zabývali analýzou aktivity *N*-acetyltransferasy v bílých krvinkách u zdravých osob nesoucích tyto varianty. U 100 kontrolních vzorků byla provedena genotypizace pomocí metody PCR-RFLP a u 68 z nich byla změřena aktivita *N*-acetyltransferasy (obr. 3). Jednotlivé skupiny tvořilo 77 homozygotů pro WT alely (u 45 změřena aktivita), 14 heterozygotů u rs4523300, 6 heterozygotů u rs149596192, 1 homozygot u každé varianty a 1 osoba, která nesla heterozygotně obě varianty. Při porovnání skupin nebyl nalezen významný rozdíl. To není úplně překvapivé, protože u zdravých kontrol existuje značná variace v aktivitě *N*-acetyltransferasy. Je možné, že varianty mají pouze částečný vliv na regulaci *N*-acetyltransferasy *in vivo*, a je obtížné odhalit jejich příspěvek, obzvláště pak u heterozygotů.

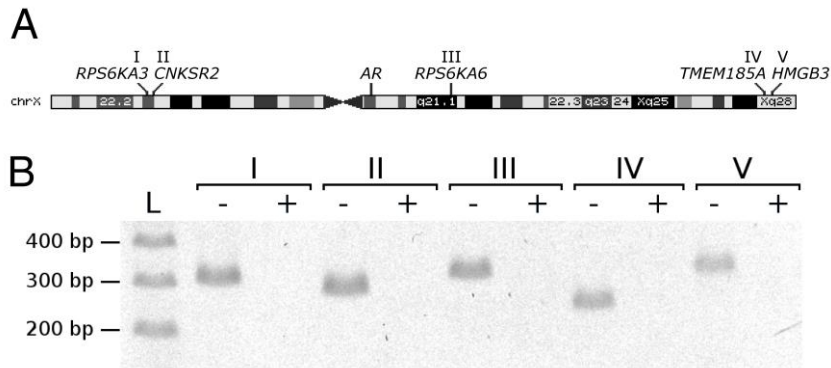


Obr. 3: Aktivita *N*-acetyltransferasy u 68 kontrolních osob, který byly na základě genotypu rozděleny do 6 skupin. Výsledky u prvních tří skupin jsou doplněny o krabicový diagram, jehož hranice jsou vymezeny 25. a 75. percentilem (rozmezí IQR), centrální linie ukazuje medián, symbol „+“ ukazuje průměr souboru. Vousy sahají do vzdálenosti minimální a maximální hodnoty v rámci rozmezí 1,5 násobku rozmezí IQR. Odlehlé hodnoty jsou znázorněny jako jednotlivé body (s výplní).

Vývoj nových metod pro stanovení zešíkmení chromosomu X

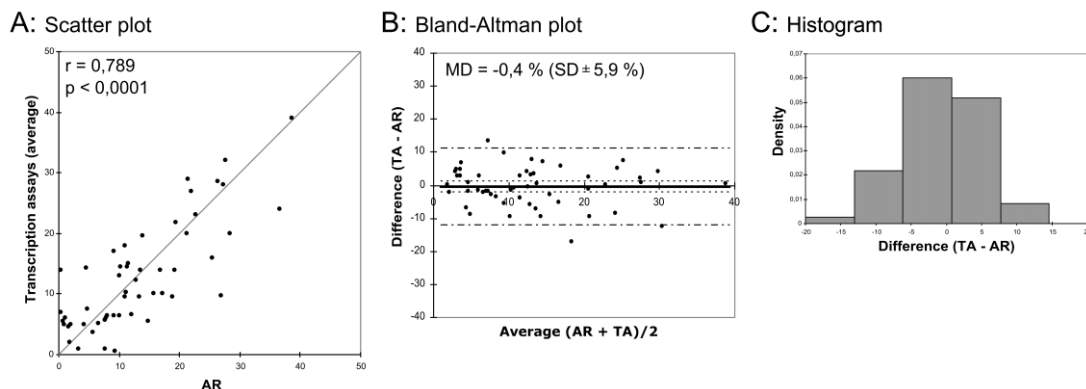
Podrobnosti výběru oblastí vhodných pro návrh metody pro stanovení poměru inaktivace chromosomu X jsou uvedeny v diplomové práci (Mušálková D., 2011). Na základě selekce bylo vybráno 5 párů primerů, u kterých byly optimalizovány podmínky štěpení DNA a PCR

amplifikace. Takto byly navrženy metody I, II, III, IV a V, využívající oblasti genů *RPS6KA3*, *CNKS2*, *RPS6KA6*, *TMEM185A* a *HMGB3* (obr. 4A). Žádná ze studovaných oblastí nebyla amplifikována pomocí PCR u mužské gDNA, která byla v předchozím kroku štěpena pomocí metylačně senzitivního restriktivního enzymu (obr. 4B). Tyto oblasti tudíž nejsou metylované u aktivního chromosomu X.



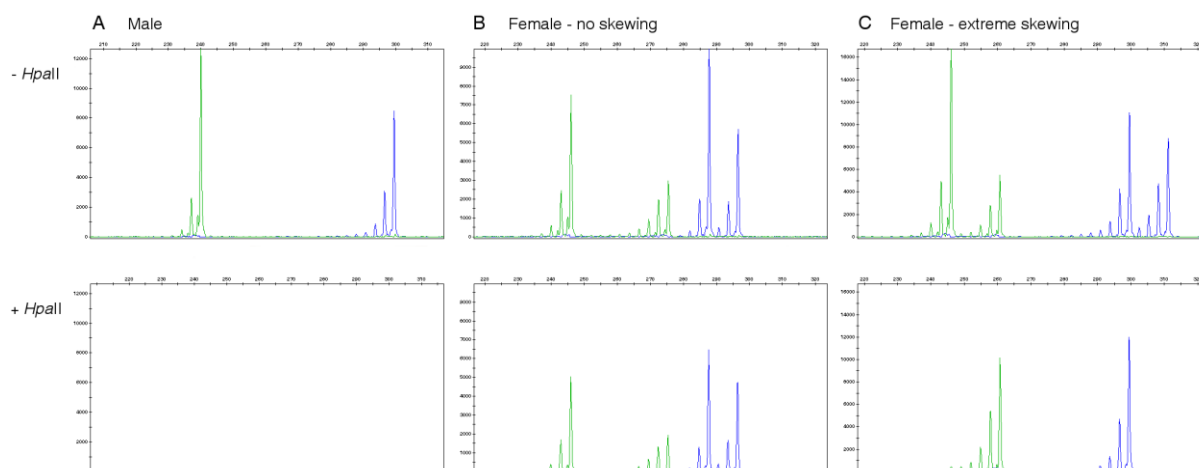
Obr. 4: (A) Pozice oblastí (genů), které byly vybrány pro návrh metod (adaptováno z UCSC Genome Browser). (B) Repräsentativní výsledky jednotlivých metod u vzorků mužské gDNA. Symboly +, - značí, zda byla gDNA před amplifikací štěpena pomocí metylačně senzitivního restriktivního enzymu (*HpaII/HhaI*), či ne. L, standard.

Nové metody byly dále validovány porovnáním jejich výsledků s výsledky standardní metody AR-MSP. Metoda AR-MSP je technicky náročnější varianta metody HUMARA založená na metylačně specifickém PCR, ale její výhodou je, že v každém vzorku je stanoven poměr XCI nejen na základě inaktivních chromosomů X, ale i komplementární poměr u aktivních chromosomů X. Správnost výsledků metody AR-MSP jsme potvrdili srovnáním s konvenční metodou HUMARA a s transkripčními metodami. Při srovnání výsledků u 18 vzorků byla pozorována velmi vysoká korelace mezi AR-MSP a metodou HUMARA ($r = 0,926$, $p < 0,001$). Průměrný rozdíl (MD) mezi metodami byl 0,5 % a standardní odchylka (SD) $\pm 7,9$ %. Při srovnání s transkripčními metodami (TA) byla také nalezena vysoká korelace a dobrá shoda výsledků (obr. 5). Proto byly pro další použití výsledky metody AR-MSP považovány za referenční a byly využity pro validaci nových metod.



Obr. 5: Srovnání výsledků získaných pomocí transkripčních metod (TA) a metody AR-MSP (AR). (A) X-Y graf, zobrazena přímka $y = x$, Pearsonův korelační koeficient (r) a pravděpodobnost (p). (B) Bland-Altmanův graf, zobrazen je průměr rozdílů (plná přímka), jeho 95% konfidenční interval (tečkované přímky), 95% limity shody (přímky se střídajícími se čárkami a body), hodnota průměru rozdílů (MD) a směrodatné odchylky (SD). (C) Histogram pro hodnocení normality distribuce.

Pro tyto účely byl použit soubor 100 kontrolních vzorků ženské gDNA získaných z krve. Metoda I byla informativní u 13 vzorků, II u 18, III u 24, IV u 61 a metoda V u 55 vzorků. Metoda HUMARA/AR-MSP byla ve srovnání s tím využitelná u 67 vzorků. Repräsentativní výsledky metod IV a V jsou uvedeny na obrázku (obr. 6).



Obr. 6: Výsledky fragmentační analýzy – metoda IV (zeleně) a V (modře). Neštěpené (- *HpaII*) a štěpené (+ *HpaII*) vzorky byly amplifikovány s příslušnými primery a vzniklé produkty PCR u sady IV a V byly před separací kapilární elektroforézou smíchány. Analýza výsledků byla provedena pomocí softwaru GeneMapper. (A) Mužská DNA. Ve srovnání s neštěpeným vzorkem, u kterého vzniká vždy jen jeden produkt, u štěpeného vzorku nedochází k amplifikaci. (B) Ženská DNA. Výsledky analýzy u ženy s náhodnou inaktivací chromosomu X ukazují podobný poměr produktů u štěpené a neštěpené DNA. (C) Ženská DNA. Výsledky analýzy u ženy s extrémním zešíkmením XCI ukazují, že jedna alela přítomná u neštěpeného vzorku chybí u štěpeného vzorku.

Měření poměru XCI jednotlivými metodami bylo u každého vzorku provedeno dvakrát a na základě toho byl stanoven koeficient opakovatelnosti, který reprezentuje maximální rozdíl dvou opakovaných měření (s 95% pravděpodobností). Pro jednotlivé metody měl koeficient hodnotu: 8,6 % u AR-MSP, 3,6 % u metody HUMARA, 6,6 % u metody I, 3,6 % u metody II, 7,0 % u metody III, 8,1 % u metody IV a 12,9 % u metody V, což potvrdilo, že jednotlivé metody poskytují konzistentní výsledky. Pouze metoda V je méně opakovatelná než referenční metoda AR-MSP.

Výsledky poměru XCI naměřené v rámci našeho souboru ($n = 86$) odpovídají výsledkům naměřeným u dospělých žen ($n = 415$) v rámci větší studie (Amos-Landgraf J.M. et al., 2006). Z následující tabulky (tab. 2) lze vyčíst, že mezi studii není významný rozdíl v procentuálním zastoupení žen s vysokým zešíkmením XCI.

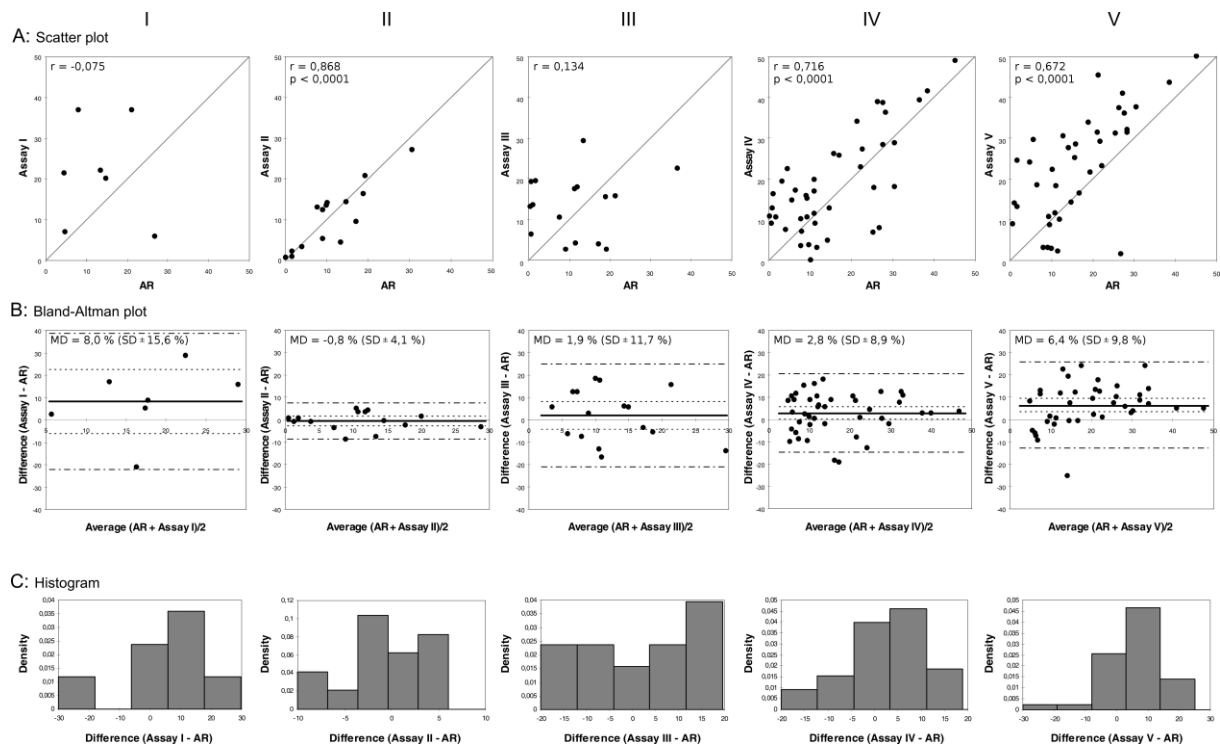
Tab. 2: Procento žen s vysokým poměrem XCI.

Poměr XCI	> 80:20	> 90:10	> 95:5
naše studie	17,4 %	4,7 %	2,3 %
Amos-Landgraf et al., 2006	14,2 %	3,6 %	1,7 %

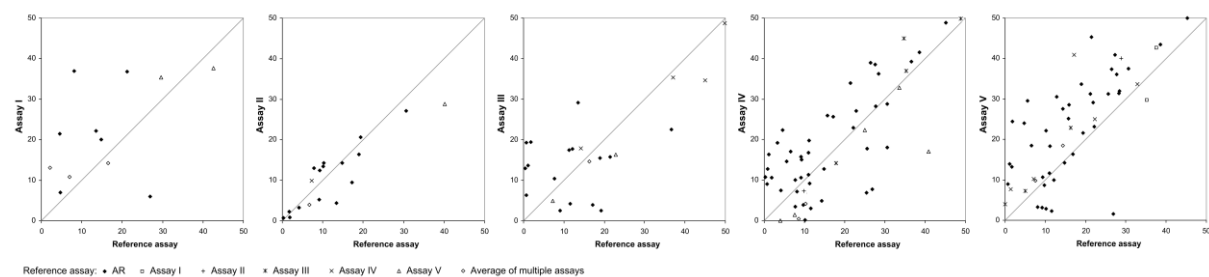
Nové metody byly dále srovnávány s referenční metodou. Protože je založena na rozdílné metylaci v promotorové oblasti genu *AR*, jsou její výsledky pouze aproximací skutečné hodnoty poměru XCI. V takovémto případě srovnávání podobných nepřímých metod je vhodné použít metodu Blanda a Altmana (Bland J.M. a Altman D.G., 1986). Na obr. 7 je uvedeno srovnání X-Y grafů, Bland-Altmanových grafů a také histogramy pro posouzení normality. Na obr. 8 je uvedeno srovnání nejen s AR-MSP, ale také s ostatními novými metodami, pokud AR-MSP nebylo u daného vzorku informativní. Protože nebylo jisté, zda jsou alely jednotlivých STR oblastí *in cis* nebo *in trans*, jsou výsledky uvedeny ve škále 0–50 %, kde 0 % odpovídá stejné expresi obou alel a 50 % odpovídá expresi výlučně jedné alely.

Kvůli malé informativnosti metody I bylo možné s AR-MSP srovnat výsledky pouze u sedmi vzorků a ty nekorelovaly ($r = -0,075$). U pěti vzorků bylo možné porovnat výsledky s ostatní-

mi novými metodami a toto srovnání naopak ukazovalo velmi dobrou shodu. V každém případě šlo ale o malý počet vzorků. Obdobných výsledků bylo dosaženo i u metody III. Ta byla více informativní, ale nebylo možné srovnat s metodou AR-MSP výsledky u vzorků s vysokým zešikmením XCI, čímž toto srovnání utrpělo ($r = 0,134$). U metody II byla pozorována vysoká korelace s AR-MSP ($r = 0,868$, $p < 0,001$). Průměr rozdílů byl $-0,8 \%$ ($SD \pm 4,1 \%$). Korelace u metody IV byla také vysoká ($r = 0,716$, $p < 0,001$), průměr rozdílů $2,8 \%$ ($SD \pm 8,9 \%$). U metody V byla pozorována střední úroveň korelace ($r = 0,672$, $p < 0,001$), průměr rozdílů $6,4 \%$ ($SD \pm 9,8 \%$). V kontrastu s ostatními metodami konfidenční interval pro průměr rozdílů neobsahoval nulu, z čehož vyplývá, že u této metody může existovat tzv. vychýlení měření. Histogramy rozdílů jsou na tomto místě více relevantní u metody IV a V, u kterých je naměřeno více dat a naznačují normální distribuci.



Obr. 7: Srovnání výsledků získaných pomocí jednotlivých metod a metody AR-MSP (AR). Každé metodě je věnován jeden sloupec. (A) X-Y graf, zobrazena přímka $y = x$, Pearsonův korelační koeficient (r) a pravděpodobnost (p). (B) Bland-Altmanův graf, zobrazen je průměr rozdílů (plná přímka), jeho 95% konfidenční interval (tečkované přímky), 95% limity shody (přímky se střídajícími se čárkami a body), hodnota průměru rozdílů (MD) a směrodatné odchylky (SD). (C) Histogram rozdílů pro hodnocení normality distribuce.



Obr. 8: Srovnání výsledků získaných pomocí jednotlivých metod a metody AR-MSP (AR). Jestliže AR-MSP nebylo u vzorku informativní, bylo srovnání provedeno s jinou novou metodou, popřípadě s průměrem více metod, pokud byl k dispozici. Symboly metod uvedeny v legendě.

Na základě těchto výsledků můžeme shrnout, že nejlepší shodu s referenční metodou AR-MSP vykazuje metoda II, která má velmi nízkou směrodatnou odchylku rozdílů měření, a proto úzké 95% limity shody (vypočtené jako průměr $\pm 1,96 \cdot SD$). Bohužel tato metoda často není použitelná, kvůli málo polymorfní STR oblasti (informativnost 18 %). Na druhou stranu metody IV a V mají STR oblasti mnohem variabilnější, ale trpí širšími 95% limity shody. Proto se musí očekávat určitá míra neshody při použití těchto metod. Na základě našich dat se nedá přímo podpořit používání metody I a III. Je třeba poznamenat, že v literatuře se takto zevrubné srovnávání při zavádění nových metod nepoužívá, takže naše výsledky přináší i představu o tom, nakolik se výsledky poměru XCI mohou běžně lišit.

Měření poměru XCI pomocí metody AR-MSP/HUMARA v kombinaci s metodami II, IV a V vede k významnému zvýšení počtu vzorků, u kterých lze tento poměr stanovit, a to z 67 % na 96 %. Navíc je možné u 69 % vzorků provést stanovení pomocí dvou a více metod, a tím se zvyšuje spolehlivost výsledku. Protože byla demonstrována dobrá shoda s referenční metodou, dají se tyto metody používat pro vyšetření vzorků, u kterých je metoda HUMARA neinformativní, nicméně u metody V bylo pozorováno pozitivní vychýlení měření, což znamená, že u této metody mohou být výsledky mírně nadhodnoceny. Bland a Altman (Bland J.M. a Altman D.G., 1986) v takovém případě navrhuje možnost hodnotu vychýlení (zde 6,4 %) od výsledku odečíst. To je možné, protože je splněna podmínka, aby vychýlení bylo konstantní v celé škále hodnot.

Zajímavým výsledkem u našeho souboru byla diskrepance u jednoho ze vzorků, který poskytoval významně odlišné výsledky u metod založených na metylaci v oblasti genu *AR* (26,9 %) a u našich nových metod I, IV a V i transkripčních metod (~6,9 %). Tuto diskrepanci lze pozorovat i v grafech (obr. 7 a 5), kde se jedná o bod nejvzdálenější od průměru rozdílu metod u Bland-Altmanových grafů. Podobné případy jsou popsány v literatuře (Beever C. et al., 2003; Bertelsen B. et al., 2011) a může k nim docházet, jestliže metylace studované oblasti nekoreluje s inaktivací chromosomu X.

Do určité míry může ke vzniku diskrepancí také přispívat přítomnost tzv. stutter píků. Nové metody jsou tudíž velmi užitečné nejen pro měření u vzorků, u kterých je oblast genu *AR* neinformativní, ale také pro potvrzení výsledků. Metoda HUMARA je považována za zlatý standard pro měření poměru XCI a je zdaleka nejpoužívanější metodou v této oblasti. Její výsledky obecně souhlasí s X-inaktivací, ale existují námitky proti tomu, aby se bez výhrady používala jako pravý poměr XCI. Swierczek a kol. (Swierczek S.I. et al., 2012) zjistili, že alelická exprese genu *AR* nekoreluje úplně s výsledky metody HUMARA. Podle autorů je to způsobeno tím, že metoda HUMARA nevyužívá metylace DNA přímo v promotoru genu *AR* ale v prvním exonu. Na druhou stranu, Mossner a kol. (Mossner M. et al., 2013) upozornili na možné technické problémy v provedení předchozí studie. Tato problematika ještě není uzavřená a je potřeba zdůraznit, že obě studie se zabývaly souborem zhruba třiceti vzorků. Spekulace, kterou navrhl Swierczek a kol. by mohla dobře vysvětlit diskrepanci u vzorku z našeho souboru zmíněného výše.

Při zpětném porovnání s nejnovějšími poznatky získanými na základě metylace DNA analyzované ve 27 tkáních různých žen (Cotton A.M. et al., 2015) můžeme geny využívané našimi metodami zařadit mezi stabilně inaktivované napříč všemi tkáněmi, zatímco gen *AR* byl u 8 tkání klasifikován jako gen s variabilním únikem.

Výhodou našich nových metod je to, že jsou všechny založeny na trinukleotidových repetitcích, u kterých je obecně menší riziko zkreslení výsledků kvůli tzv. stutter píkům než u metod s dinukleotidovými repeticemi. Při kombinaci metody II, IV a V s metodou HUMARA je třeba vytvořit pouze dvě restriční směsi na jeden vzorek a produkty PCR jednotlivých metod lze před separací pomocí kapilární elektroforézy smíchat díky různému značení primerů a různé velikosti výsledných produktů.

Aplikace nových metod pro stanovení zešikmení chromosomu X

Hlavní výhoda našich nových metod spočívá v možnosti měření poměru XCI u vysokého procenta vzorků, u kterých metoda HUMARA není informativní. Metody jsou robustní a vhodné pro rutinní analýzu, nicméně z důvodů popsaných v předchozí kapitole je vhodné používat jejich kombinaci, popřípadě výsledky metody HUMARA doplňovat jinou metodou. Naše metody pro měření poměru XCI byly využity v rámci projektů, které jsou popsány níže.

Analýza poměrů XCI u dívky s velmi vzácnou manifestací MPS II

Mukopolysacharidosa typu II (MPS II, Hunterův syndrom, OMIM #309900) je progresivní multisystémové postižení, které je způsobeno deficitem lysosomální hydrolasy, iduronát-2-sulfatasy (IDS, I2S, EC 3.1.6.13), kódované genem *IDS* v oblasti Xq27-Xq28. Tento enzym katalyzuje první krok v degradaci heparansulfátu a dermatansulfátu a jeho deficit vede ke stádání glykosaminoglykanů v mnoha tkáních a orgánech. Drtivá většina pacientů jsou muži a v literatuře nalezneme pouze omezené množství symptomatických žen (~17 případů). Jedna z těchto žen měla defektní obě alely *IDS*. U zbývajících pacientek byla příčinou onemocnění kombinace jedné mutované (poškozené) alely *IDS* a vysokého zešikmení XCI s preferenční inaktivací zdravé alely, což bylo v některých případech způsobeno strukturální abnormalitou. Mutovaná alela je často zděděna od matky s vyrovnaným poměrem X-inaktivace.

V nedávném článku (Řeboun M. et al., 2016) jsme popsali první případ dívky s manifestací MPS II v České republice. Holčička se narodila v roce 2010 zdravým, nepřibuzným rodičům původem z Ukrajiny a její počáteční vývoj byl normální. Ve věku dvou let byly pozorovány první potíže a ve věku tří let byla zaznamenána mírná mentální retardace, mírná hepatosplenomegalie, hrubé rysy obličeje, hyperplazie dásní a jiné příznaky a změny odhalené rentgenovým vyšetřením skeletu. V moči byla nalezena nadměrná exkrece heparansulfátu a dermatansulfátu (60,5-65,7 g/mol kreatininu; kontroly < 15,5 g/mol). V leukocytech a séru byla naměřena výrazně snížená aktivita enzymu IDS, zatímco aktivity celé řady dalších lysosomálních enzymů byly v kontrolním rozmezí. Dívka je nyní na enzymové substituční terapii, exkrece glykosaminoglykanů se snížila na hodnotu 19,5-22,5 g/mol kreatininu, ale problémy s řečí přetrvávají a rozvoj motorických schopností je opožděný.

Při vyšetření genu *IDS* byla nalezena heterozygotní mutace c.1403G>A (p.Arg468Gln). Tato mutace je rekurentní (Brusius-Facchin A.C. et al., 2014) a má závažné dopady na enzymovou aktivitu a procesování proteinu IDS (Sukegawa-Hayasaka K. et al., 2006). U rodičů ani mutace, ani somatický mosaicismus nebyly nalezeny, germinální mosaicismus vyloučit nelze. Žádné další patogenní změny při vyšetření možnosti rekombinace mezi genem a pseudogenem a při analýze delecí/duplikací metodou MLPA nebyly u pacientky nalezeny. Vyšetření metylace v oblasti genu *AR* ukázalo u pacientky extrémní zešikmení jak

v leukocytech získaných z krve, tak u bukalních stěrů (tab. 3). Maternální alela byla téměř kompletně inaktivována. Stejný výsledek byl nalezen při vyšetření genu *CNKS2*. Při vyšetření transkriptů hlubokým sekvenováním byla u genu *LAMP2* nalezena zdánlivá homozygita pro paternální alelu c.156A a u genu *IDS* exkluzivní exprese mutované alely.

Tab. 3: Analýza transkriptů genu *IDS* a inaktivace chromosomu X ve třech oblastech.

Vzorek	Metylačně sensitivní metoda		Analýza transkriptu	
	<i>AR</i> Xq12 (%)	<i>CNSKR2</i> Xp22.12 (%)	<i>LAMP2</i> Xq24 A:T (%)	<i>IDS</i> Xq28 G:A (%)
Proband (leukocyty)	98:2	99:1	100:0	0,5:99,5
Proband (bukální stěry)	96:4	n.d.	n.d.	n.d.
Matka (leukocyty)	n.i.	70:30	n.d.	n.d.

n.d. neměřeno; n.i. neinformativní marker

Z izolovaných mononukleárních buněk periferní krve byly připraveny dvě iPSC buněčné linie. Analýza poměru XCI u těchto dvou linií, které byly kultivovány za běžných podmínek ukázala stejný výsledek jako u leukocytů (preferenční inaktivaci maternální alely, poměr 98:2). Při využití podmínek, které by měly vést k vytvoření iPSC s vyšším pluripotenčním potenciálem (naïve iPSC) a resetování X-inaktivace (Gafni O. et al., 2013), nedošlo ke změně poměru XCI. Pro tento výsledek existují tři vysvětlení: 1) chromosom X zůstal inaktivní a nedošlo k resetování X-inaktivace, 2) k resetování došlo, ale chromosom X není posléze inaktivován náhodně, 3) část buněk dosáhla reprogramovaného stavu, kdy jsou oba chromosomy X v buňce aktivní, to ale nelze metylačně sensitivní metodou odhalit. Nicméně u linie získané od heterozygotní ženy s Fabryho chorobou, došlo k posunu z poměru 97:3 na poměr 80:20. Tyto linie mohou být v budoucnu velmi užitečné nejen pro výzkum patogeneze onemocnění a testování různých terapeutických přístupů, ale také pro výzkum obecných mechanismů inaktivace chromosomu X a příčin vedoucích k extrémnímu zešikmení.

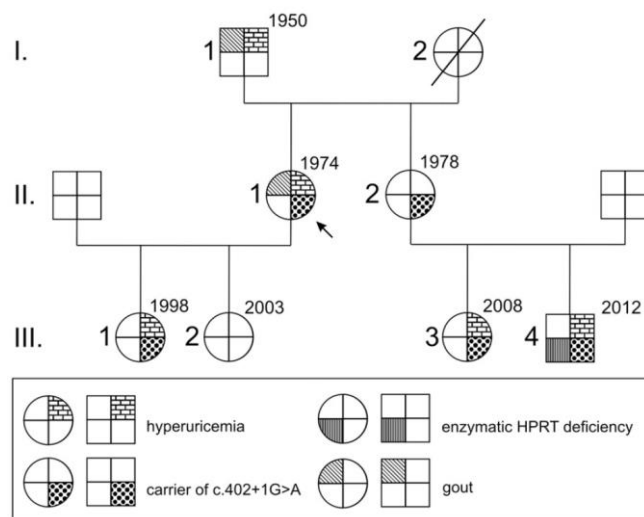
Extrémní zešikmení (> 95:5) ve prospěch aktivní mutované alely je velmi častým jevem u symptomatických pacientek s MPS II (zatímco jejich taktéž heterozygotní matky mají náhodný poměr XCI). U pacientek je v souladu s tím nalezena velmi nízká aktivita enzymu IDS, srovnatelná s hemizygotními muži. MPS II se tak významně liší od Fabryho choroby, jiného X-vázaného lysosomálního onemocnění, kde u většiny heterozygotních žen se střední úrovní enzymové aktivity dochází k vývoji symptomů, ačkoli později než u hemizygotních mužů. Podle předpokladu (Conzelmann E. a Sandhof K., 1983) by úroveň enzymové aktivity vyšší než cca 10 % měla být dostatečná pro normální degradaci substrátu. Avšak u X-vázaných onemocnění je situace jiná, protože zde existují okrsky deficitních buněk, kde je chromosom X bez mutace inaktivován. Absence symptomů u většiny heterozygotních žen s mutací v genu *IDS* může být vysvětlena velmi nízkým prahem postačujícím pro degradaci substrátu nebo vyšším příjmem externího enzymu do deficitních buněk. Otázkou, zda jsou tyto ženy opravdu asymptomatické se zabývala studie (L.L. de Camargo Pinto et al., 2010), která nenašla ani slabé známky onemocnění. Menší studie (E. Guillén-Navarro et al., 2013) v rozporu s tím prosazuje, že i u žen s poměrem XCI > 75:25 ve prospěch aktivní mutované alely může docházet k progresivní, mírné klinické manifestaci. Výsledky této studie jsou ale limitované např. tím, že nestanovili, která alela je inaktivovaná, a měření provedli pouze u DNA získané z krve.

Naše výsledky v kombinaci s informacemi v literatuře ukazují, že vyšetření poměru XCI u MPS II má prognostickou hodnotu a mělo by se využívat. Při nalezení extrémního zešíkmení X-inaktivace ve prospěch aktivního mutovaného chromosomu X, což je zřejmě asociováno s vysokým rizikem vývoje symptomů, by brzké zavedení enzymové substituční terapie mohlo být prospěšné.

Analýza poměrů XCI v rodině s mutací v genu *HPRT1*

Deficit hypoxantin-guaninfosforibosyltransferasy (HPRT/HGPRT) je vrozenou poruchou purinového metabolismu, u které rozpoznáváme odlišné formy onemocnění. Enzym HPRT (EC 2.4.2.8) je kódován genem *HPRT1* v oblasti Xq26.2 a má centrální roli ve zpětném využití produktů katabolismu purinových nukleotidů. Částečný deficit enzymu (> 8 % aktivity), také známý jako Kelley-Seegmillerův syndrom (OMIM #300323), je obvykle asociován s nadprodukcí purinů hypoxantinu a xantinu, která vede ke zvýšené syntéze kyseliny močové (hyperurikémii, dně, urolitiase a nefrolitiase). Klinická manifestace může do různé míry zahrnovat neurologické poruchy (varianty Lesch-Nyhanova syndromu) a u klasického Lesch-Nyhanova syndromu (OMIM #300322; < 1,5 % aktivity) typické sebepoškozující chování. Heterozygotní ženy bývají asymptomatické. Diagnostika žen na základě biochemických údajů a enzymových aktivit je nespolehlivá, což značně komplikuje situaci, není-li identifikována mutace v genu *HPRT1*.

My jsme měli příležitost studovat klinické, biochemické a molekulárně genetické charakteristiky u české rodiny s hyperurikémií a mutací v genu *HPRT1* (Kostalova E. et al., 2015). Rodokmen této rodiny a další údaje jsou zobrazeny na obr. 9.



Obr. 9: Rodokmen rodiny. Ve výšečích je vyznačeno, zda se u jednotlivých osob vyskytuje hyperurikémie, dna, či deficit enzymu HPRT v erythrocytech a zda je přítomna sestřihová mutace c.402+1G>A v genu *HPRT1*.

Dříve popsaná sestřihová mutace c.402+1G>A v genu *HPRT1* (Jinnah H.A. et al., 2000; Fu R. et al., 2014) byla v této rodině nalezena u jednoho chlapce a čtyř žen. Tři z těchto žen (II.1, III.1, III.3) měly hyperurikémii a normální exkreci purinů v moči, jedna (II.2) měla normální hodnoty urikémie. U ženy II.1 se navíc od věku 33 let vyvinulo několik dnavých záchvatů a je denně léčena 200 mg allopurinolu. Její synovec (III.4) s Lesch-Nyhanovým syndromem měl neurologické symptomy, hyperurikémii, hyperurikosurii, zvýšenou exkreci hypoxantinu a xantinu v moči a velmi nízkou aktivitu HPRT v erythrocytech. Pacient I.1 je léčen pro

hyperurikémii a dnu od věku 53 let. Přesnější biochemická, klinická a genetická data jsou shrnuta v našem článku, kde jsou uvedeny i nalezené polymorfismy (rs1165165, rs2231142, rs16890979) urátových transportérů (*SLC17A3*, *ABCG2* a *SLC2A9*) asociované s hyperurikémií. Tyto variace a jejich segregace ale nevysvětlily rozdíly pozorované ve zkoumané rodině. Pro možné vysvětlení rozdílu mezi ženami II.1 a II.2 bylo provedeno měření poměru XCI pomocí našich metylačních metod (Musalkova D. et al., 2015). Standardní metoda HUMARA nebyla využitelná. Původ jednotlivých alel bylo možné rozlišit na základě analýzy otcovy (I.1) genomové DNA. Při analýze poměru XCI byly amplifikovány PCR produkty, jejichž velikost naznačovala, že u chromosomu X došlo při meiotickém dělení k rekombinaci úseků DNA. Tyto výsledky byly zpřesněny pomocí analýzy 12 STR markerů (souprava Investigator Argus X-12, Qiagen) na chromosomu X a potvrdily specifitu našich metod.

Výsledky stanovení ukázaly extrémní zešikmení ($SD \pm 0,1 \%$) u genomové DNA izolované z leukocytů, tzn. poměr 0,4:99,6 u ženy II.1 a 1,5:98,5 až 0,2:99,8 u ženy II.2, s preferenčně aktivní paternální WT alelou. Stejný výsledek byl nalezen i u dívky III.3 a naznačoval možné sekundární zešikmení v krvi způsobené selekcí buněk s aktivním chromosomem X bez mutace v genu *HPRT1*. K tomuto jevu může docházet, pokud má daná mutace v genu *HPRT1* závažný dopad na aktivitu enzymu (Migeon B.R., 2014), což je v tomto případě splněno. Selektivní tlak působí i proti $HPRT^-$ prekurzorům erytrocytů a má za následek, že naměřená hodnota aktivity HPRT v periferní krvi spadá do normálního rozmezí (Hakoda M. et al., 1995).

Stanovení bylo tudíž doplněno u genomové DNA izolované z moči a/nebo bukalních stěrů. U pacientky II.2 a její dcery III.3 byla nalezena náhodná inaktivace (rozmezí 49:51 až 45:55), zatímco u pacientky II.1 bylo nalezeno mírné zešikmení ve prospěch aktivní paternální alely (poměr 22:78). Příčina významného rozdílu pozorovaného mezi oběma sestrami proto zůstává otevřenou otázkou.

Hodnoty urikémie jsou ovlivněny mnoha faktory, jak genetickými, tak environmentálními, a hyperurikémie může být výsledkem zvýšené produkce a/nebo neúčinné renální exkrece kyseliny močové. Proto vyvstává otázka, zda v této rodině hyperurikémie u žen souvisí s přítomností mutace v genu *HPRT1*. Nicméně u tří dalších nepříbuzných asymptomatických heterozygotních žen z rodin s deficitem HPRT (viz článek Kostalova E. et al., 2015) byla také nalezena hyperurikémie a normální exkrece purinů. Deficit HPRT se zřejmě může prezentovat jako hyperurikémie a/nebo dna jak u mužů, tak i u heterozygotních žen a tato možnost, ačkoli vzácná, by měla být u žen s hyperurikémií a normální exkrecí purinů zvažována.

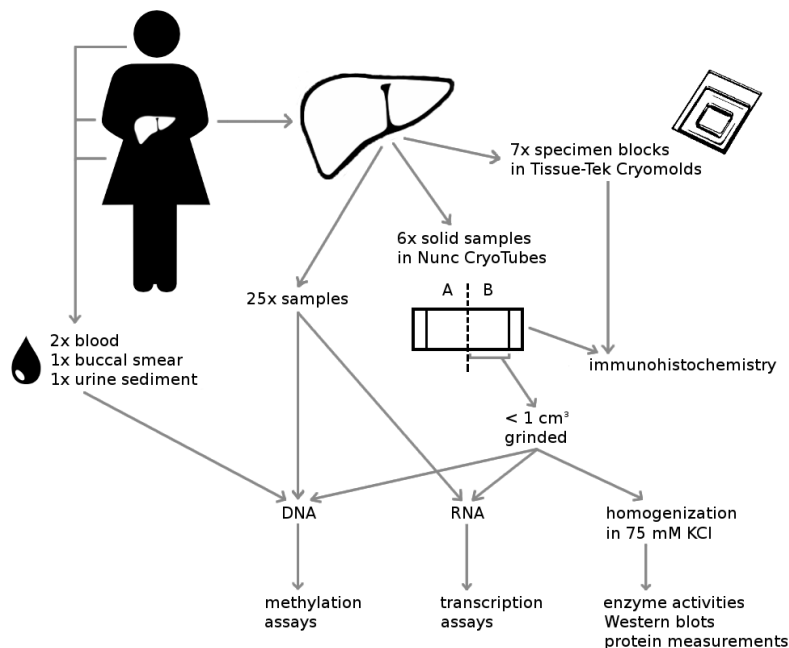
Analýza poměrů XCI v explantátu jater dívky s deficitem OTC

Deficit OTC (OMIM #311250) je nejčastější dědičná porucha močovinného cyklu. Gen *OTC* je lokalizován v oblasti Xp21.1 a podléhá inaktivaci. Exprimován je výlučně v jaterních hepatocytech (a střevní mukóze) a kóduje ornititranskarbamylasu (OTC, E.C. 2.1.3.3.), enzym mitochondriální matrix, který katalyzuje reakci mezi karbamylfosfátem a ornitinem za vzniku citrulinu a fosfátu. Deficit OTC je asociován se závažnou hyperamonémií, která může vést až k edému mozku a smrti. Může se projevovat jako neonatální onemocnění (skoro výhradně u chlapců) nebo postneonatální onemocnění (částečný deficit) kdykoli během

života. Opakované epizody hyperamonémie u pacientů s částečně zachovanou aktivitou enzymu mohou vést ke kognitivnímu postižení. Hyperamonemická krize může být navozena různými stresory. Onemocnění je dlouhodobě léčeno dietou. Akutní epizody hyperamonémie vyžadují agresivní léčbu snižující koncentraci amoniaku a zajištění kalorického příjmu pro prevenci katabolismu. U pacientů se špatnou metabolickou kompenzací na dietě je možno zvážit transplantaci jater. Klinické symptomy u heterozygotních žen jsou velmi variabilní, jak co se týče nástupu onemocnění, tak jeho závažnosti, a souvisí s genotypem a poměrem X-inaktivace v játrech (Yorifuji T. et al., 1998). Část žen zůstává asymptomatická.

My jsme měli možnost detailně studovat poměry XCI a další parametry u dívky s klinickou manifestací deficitu OTC. U pacientky bylo zjištěno, že nese heterozygotně rekurentní missense mutaci c.583G>C (p.G195R) v exonu 6, kterou sdělila od matky (popsáno v Storkanova G. et al., 2013). Mutace p.G195R mění vysoce konzervovanou aminokyselinu v ornitin-vazebné doméne, což vede k významné redukci aktivity i množství proteinu (Kogo T. et al., 1998). U chlapců je asociována s neonatální formou onemocnění a vyskytla se také u dvou dívek se závažnými problémy (Choi J.H. et al., 2015; Kim G.H. et al., 2006; Tuchman M. et al., 1994).

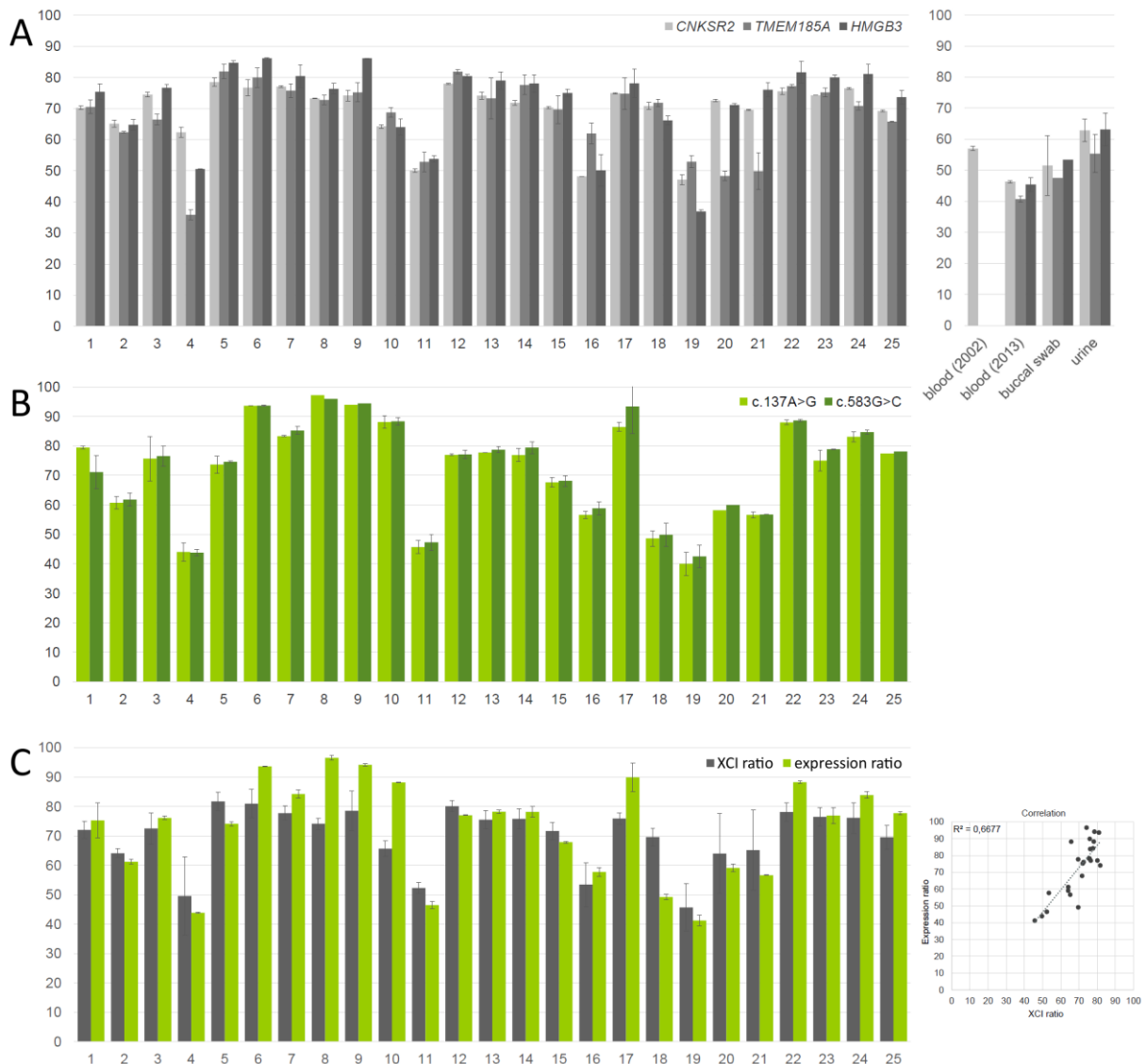
Naše pacientka podstoupila ve věku 14 let úspěšnou transplantaci jater, která byla provedena kvůli zhoršující se metabolické kontrole a zvýšené frekvenci hyperamonemických příhod (2-3 ročně) během puberty. Z explantátu jater pacientky byla izolována řada vzorků (viz obr. 10), které byly využity pro studium vlivu X-inaktivace na projevy onemocnění.



Obr. 10: Schéma zpracování vzorků izolovaných z jater a jiných tkání pacientky.

V první řadě bylo zkoumáno 25 kousků (~1 cm³), které byly odebírány postupně z jedné strany jater na druhou podél střední linie, a vzhledem k jejich velikosti by měly reprezentovat velké množství malých ostrůvků deficitních i normálních buněk (De Hoon B. et al., 2015). Z těchto 25 kousků byla simultánně izolována DNA a RNA, které byly využity pro stanovení poměrů XCI na základě metylace DNA a poměrů alel transkriptů genu *OTC*. Dále bylo izolováno 6 kousků (~2 cm³), které byly rozděleny na dvě části (A a B) a využity nejen pro stanovení poměrů XCI a alel transkriptů, ale i pro stanovení množství a aktivity enzymu *OTC*.

Z těchto vzorků byla před rozdrcením (v kapalném dusíku) také odebrána menší část pro provedení imunohistochemických analýz. Tyto analýzy byly prováděny také v 7 vzorcích zmrazených v roztoku Tissue-Tek O.C.T. a parafinových řezech (neukázáno na obrázku). Pro analýzu poměrů XCI pomocí metod využívajících metylaci DNA nebylo možné využít metodu HUMARA, protože nebyla informativní, ale všechny tři naše publikované metody *CNKSR2*, *TMEM185A* a *HMGB3* (Musalkova D. et al., 2015) byly použitelné. Průměrný poměr XCI v játrech stanovený u sady 25 vzorků se pohyboval v rozmezí 46:54 až 82:18 (průměr 70:30) s preferenčně aktivním chromosomem X nesoucím mutaci (obr. 11A).



Obr. 11: Srovnání výsledků poměru XCI a exprese alel ve 25 vzorcích získaných z jater (číslováno 1 až 25). (A) Podíl buněk (v %) s aktivním chromosomem X nesoucím mutaci – určeno pomocí tří metod na základě metylace DNA. Výsledky jsou pro srovnání uvedeny i u 2 vzorků krve (rok odběru 2002 a 2013) a vzorku bukalního stěru a močového sedimentu. U vzorku bukalního stěru byla analýza metodou *TMEM185A* a *HMGB3* provedena pouze jednou kvůli malému množství vzorku. U vzorku krve (z roku 2002) byla ze stejného důvodu využita pouze metoda *CNKSR2*. (B) Podíl cDNA (v %) nesoucí mutaci c.583G>C či SNP c.137A>G – určeno na základě sekvenování RT-PCR produktů na přístroji MiSeq (Illumina). U vzorků 8, 9, 20 a 25 bylo stanovení z technických důvodů provedeno pouze jednou. (C) Porovnání průměru předchozích výsledků získaných u vzorků DNA (poměry XCI) a RNA (poměry exprese alel), doplněno o X-Y graf.

Výsledky jednotlivých metod spolu velmi dobře korelovaly až na vzorky 4, 20 a 21, kde metoda *TMEM185A* opakovaně podávala nižší výsledek. Výsledky poměrů XCI také vysoce korelovaly s poměry alel transkriptů ($r = 0,82$, $p < 0,0001$, obr. 11C), které se pohybovaly okolo stejného průměru, ale v širším rozmezí 41:59 až 96:4 (průměr 73:27, obr. 11B).

Poměry alel transkriptů byly stanoveny na základě sekvenování RT-PCR produktů a alely byly odlišeny nejen na základě mutace c.583G>C v exonu 6, ale i na základě SNP c.137A>G v exonu 2 (rs1800321, p.K46R). Velmi vysoká korelace ($r = 0,99$, $p < 0,0001$) obou stanovení není překvapivá, protože obě varianty se nacházely na stejném produktu PCR. Bohužel ostatní metody využívající polymorfismy v jiných genech (*LAMP2*, *IDS*) nebylo možné z důvodu homozygotního stavu využít, takže nelze říci, zda byly hodnoty ovlivněny stabilitou transkriptu.

V souhrnu byla v této části analýzy demonstrována značná intraorgánová variace v X-inaktivaci, a také značný rozdíl mezi poměrem stanoveným v krvi a průměrem u jater. To ukazuje, že výsledek stanovený na základě biopsie nemusí odpovídat průměru jater a neměl by být považován za reprezentativní část celku, což potvrzuje i praxe (Grünert S.C. et al., 2013; Ricciuti F.C. et al., 1976). Zřejmě ani stanovení poměru XCI v krvi nemusí být vhodná náhrada. U pacientky byl poměr XCI naměřený v krvi 57:43 a 44:56 (obr. 11A), což odpovídá dolní hranici rozmezí v játrech (obdobně v Yorifuji T. et al., 1998). Navíc poměr XCI stanovený v krvi matky pacientky, která je asymptomatická, činí 62:38 ve prospěch aktivní mutované alely, a je tudíž srovnatelný s poměrem u dcery.

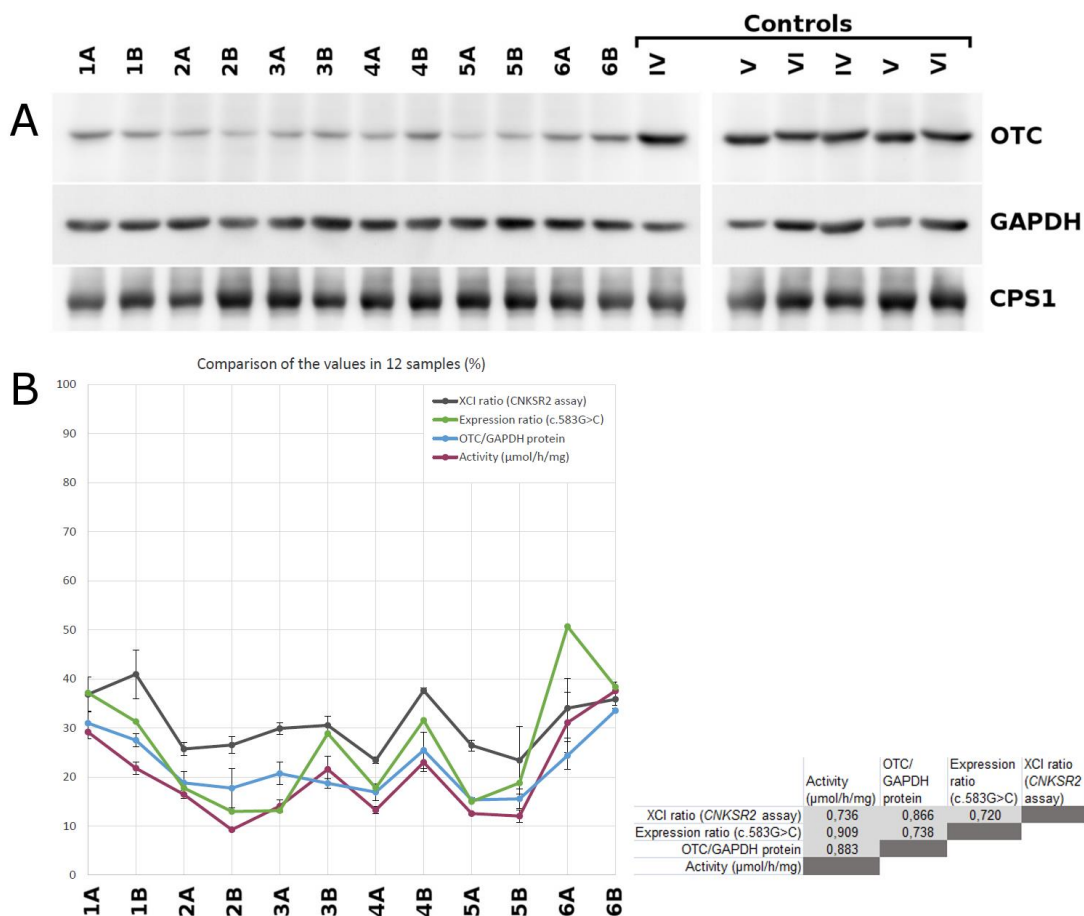
Poměry XCI a exprese alel byly analyzovány také u dalších dvanácti vzorků, které byly rozebrány a využity pro stanovení množství proteinu OTC metodou Western blot (obr. 12A) a aktivity enzymu OTC. Poměry XCI se v této sadě vzorků pohybovaly v užším rozmezí 59:41 až 77:23 (průměr 69:31), ale i přes takto malé rozdíly bylo možné pozorovat, že tyto hodnoty korelují s množstvím proteinu i s aktivitou (obr. 12B, $p < 0,01$). Nicméně při porovnání se zdravými kontrolami dostáváme, že zatímco by na základě metylace DNA mělo mít 30 % buněk aktivní chromosom X bez mutace, průměrné množství proteinu OTC (vztaženo ku GAPDH) je 20 % a průměrná aktivita také. Stanovení u RNA bude ještě zopakováno, nicméně hodnoty se zřejmě pohybují okolo 25 %.

Pro detekci proteinu OTC byla použita dobře charakterizovaná polyklonální králičí IgG protilátka (HPA000243), která specificky reagovala s jaterní tkání a zřejmě detekuje jen WT protein. Pozorované rozdíly v absolutních hodnotách mohou být ovlivněny řadou faktorů, například různým skladováním vzorků pacientky a kontrol a různou patologií (stavem) tkáně. Také je třeba mít na mysli, že kromě hepatocytů obsahuje jaterní tkáň i jiné typy buněk: buňky endotelu, Kupfferovy buňky, hvězdčicovité Itovy buňky, NK T-lymfocyty a cholangiocyty. Hepatocyty tvoří cca 80 % objemu jaterní tkáně, ale jen 60 % počtu buněk, a při stanovení poměru XCI je využita DNA i z těchto, v tomto případě nerelevantních zdrojů, zatímco ostatní stanovení se týkala specificky OTC (RNA, protein, aktivita).

Naše výsledky jsou obdobné jako v publikaci (Yorifuji T. et al., 1998), kde našli intraorgánovou variaci poměru XCI v rozmezí 59,2 až 81,8 % ve prospěch aktivního chromosomu X nesoucího mutaci ($n = 5$). Nicméně, náš soubor je obsáhlejší a charakterizovaný na více úrovních, proto jsou výsledky spolehlivější. Zatímco Yorifuji a kol. na sadě 4 vzorků demonstroval velmi vysokou korelaci poměru XCI s aktivitou enzymu ($r = 0,996$), u naší sady

vzorků byla korelace těchto parametrů nižší ($r = 0,736$).

Výsledky v rámci dvojic A-B byly velmi podobné, až na pár 4A-4B, což demonstruje, že i u vzorků odebraných v těsné blízkosti můžeme nalézt značné rozdíly. V rámci celé sady 6 párů, ale rozdíly nejsou statisticky významné (párový t-test, hladina významnosti $\alpha = 0,05$).



Obr. 12: Srovnání výsledků u vzorků jater získaných od pacientky s deficitem OTC (označeno 1A až 6B) a 3 kontrol (IV, V, VI). (A) Reprezentativní výsledky Western blotu – detekce proteinu OTC, GAPDH a CPS1. Kontrola IV byla použita pro sjednocení výsledků ze dvou gelů. Byla nanesena na první gel společně se vzorky 1A až 6B od pacientky, i na druhý gel, kde se nacházely kontroly V a VI. (B) Srovnání výsledků u 12 vzorků získaných od pacientky. Poměr XCI byl naměřen pomocí metody *CNKSR2* a ukazuje podíl buněk (v %) s aktivním chromosomem X bez mutace v genu *OTC* (šedá barva). Analýza exprese ukazuje podíl RNA (v %) bez mutace c.583G>C (zelená barva). Množství proteinu OTC/GAPDH detekované na Western blotu (modrá barva) a aktivita enzymu OTC (bordó) jsou udány v % (porovnáno se 100 % u kontroly IV). Vpravo od grafu jsou zobrazeny hodnoty korelačních koeficientů.

Po stránce histopatologické byla pro játra charakteristická fokální glykogenosa, steatosa a mírná fibrosa. Ostře ohraničené ostrůvky glykogenosy se nacházely i v oblastech, ve kterých je produkován enzym OTC a nesouvisí bezprostředně s mosaicismem X-inaktivace. Tento jev se navíc vyskytuje i u chlapců s tímto onemocněním a u dalších onemocnění, která nejsou X-vázaná, jako je deficit karbamylfosfátsyntetasy (CPS1) a argininosukcinátlyasy (ASL), nebo syndrom HHH (hyperamonémie, hyperornitinémie a homocitrulinurie) a LPI (intolerance bílkovin s lysinurií) (Badizadegan K. a Perez-Atayde A.R., 1997; Yaplıto-Lee J. et al., 2013; Carpentieri D. et al., 2015). Společně mají tato onemocnění to, že se jedná o poruchy produkce močoviny, ať už přímo o deficit enzymu močovinného cyklu, nebo poruchu transportu ornitinu. Mechanismus vzniku fokální glykogenosy není znám, ale v literatuře se

spekuluje, že na akumulaci má vliv specifická strava pacientů (Yaplito-Lee J. et al., 2013; Miles L. et al., 2005).

Tyto výsledky zatím nebyly publikovány a budou dále rozšířeny, hlavně v oblasti imunohistochemické analýzy. Bude následovat podrobné zkoumání zonace jaterních lalůček, lokalizace ostrůvků glykogenu, kvantifikace podílu OTC⁺ a OTC⁻ oblastí a dalších parametrů, včetně celkového množství glykogenu.

Mosaicismus X-inaktivace je ovlivněn počtem zakládajících buněk a migrací buněk během vývoje a může generovat funkční diverzitu, která je náhodná a specifická pro každého jednotlivce (Wu H. et al., 2014). Wu a kol. uvedli hypotézu, že u orgánu jakým jsou játra, kde velká část buněk vykonává stejnou funkci, nemusí hrát nehomogenita X-inaktivace roli a důležitý je spíše celkový poměr buněk s aktivním chromosomem nesoucím mutaci a bez mutace. Při překročení určité hranice, která je závislá na onemocnění a typu tkáně (a zřejmě charakteru mutace) dochází k dysfunkci. U námi studované pacientky jsme nenašli extrémní, ale spíše mírné zešíkmení X-inaktivace. Průměrný poměr XCI v játrech se pohyboval okolo hodnoty 70:30 ve prospěch aktivního chromosomu X nesoucího mutaci a průměrná aktivita okolo 20 % hodnoty kontrol a tyto hodnoty bohužel u pacientky na dietní léčbě nestačily po nástupu puberty k udržení metabolické kompenzace a vedly k opakovaným episodám hyperamonémie.

Závěr

Pro účely výzkumu dědičných metabolických onemocnění jsem navrhla několik metod. Po vyzkoušení více přístupů jsem zavedla jednoduchý, robustní postup, jak obohatit lysosomální membrány z kultivovaných buněk na krokovém sacharosovém gradientu (Mušálková D. et al., 2013), což je metoda, která nyní slouží nejen ke zkoumání obecných vlastností lysosomů, ale také změn probíhajících u lysosomálních střádavých onemocnění.

Do této skupiny onemocnění patří mimo jiné mukopolysacharidosa typu IIIC, která je způsobena mutacemi v genu *HGSNAT*, kódujícím lysosomální membránový enzym. Naše kolegyně Eva Richtrová ve své dizertační práci (Richtrová E., 2014) popsala u šesti pacientů s mukopolysacharidosou typu IIIC promotorové varianty rs4523300 a rs149596192. Při provedení luciferasové reportérové metody jsme zjistili, že tyto varianty mají významný vliv na expresi, a proto jsem ověřovala, zda mají také vliv na aktivitu enzymu měřenou v lymfocytech zdravých osob. Při rozřazení skupiny dle genotypu ale nebyly nalezeny rozdíly v enzymové aktivitě (Richtrova E. et al., 2016).

Dále jsem navrhla a ověřila několik jednoduchých metod pro stanovení zešíkmení inaktivace chromosomu X (Musalkova D. et al., 2015), které jsou založeny na rozdílné metylaci DNA v promotorových oblastech genů u aktivního a inaktivního chromosomu X. V důsledku inaktivace chromosomu X jsou ženy mosaikou dvou buněčných populací. Výzkumem distribuce této mosaiky a poměru XCI se můžeme dovědět více o efektu X-inaktivace na klinickou manifestaci X-vázaných onemocnění, a to nám může pomoci identifikovat ženy s pravděpodobnou vyšší zátěží.

Naše nové metody byly využity v řadě projektů, z nichž podrobněji je v této práci popsáno využití u dívky s velmi vzácnou manifestací mukopolysacharidosy typu II (Řeboun M. et al., 2016). Jedná se o první případ dívky s touto chorobou v České republice, u níž klinická

manifestace koresponduje se závažnou formou syndromu, tak jak se projevuje u chlapců. Příčinou onemocnění je zřejmě extrémní zešíkmení X-inaktivace (poměr XCI téměř 100:0), které vede k expresi mutované alely, zatímco zdravá alela je v drtivé většině buněk inaktivována. Z buněk izolovaných z krve byly vytvořeny iPSC buňky, které budou sloužit jako buněčný model při budoucím výzkumu patogeneze a léčby MPS II.

Další využití našich metod se týkalo rodiny s mutací v genu *HPRT1* (Kostalova E. et al., 2015), kde se na základě poměru XCI a jiných parametrů nepodařilo vysvětlit rozdíly pozorované mezi ženami. Sestřihová mutace c.402+1G>A v genu *HPRT1* má v této rodině závažný vliv na poměr XCI naměřený v krvi a zřejmě zde dochází k selekci buněk s aktivním chromosomem X bez mutace.

Třetím projektem byla studie poměrů XCI v explantovaných játrech dívky s deficitem OTC, která kvůli vysoké frekvenci hyperamonemických příhod podstoupila transplantaci. Zde jsem popsala intraorgánovou variaci v X-inaktivaci a značný rozdíl mezi poměrem stanoveným v krvi a průměrem u jater. Demonstrovala jsem, že naměřené poměry XCI korelují s expresí, množstvím proteinu a aktivitou enzymu OTC. Průměrný poměr XCI v játrech byl 70:30 ve prospěch aktivní mutované alely a průměrná aktivita v porovnání s kontrolami byla 20 %. Tato hodnota bohužel nestačila pro udržení dlouhodobé metabolické kompenzace po nástupu puberty.

Vzhledem k našim zkušenostem doporučujeme při stanovení poměru X-inaktivace používat nejen kombinaci více metod, ale dělat analýzu pokud možno ve více tkáních, nejen v krvi, ale i např. buňkách slinivky, vlasových váčcích nebo močových buňkách. V dnešní době máme i díky naší práci, ale také novým metodickým přístupům, po ruce celou řadu metod jak poměr XCI studovat. Pokoušet se vysvětlit fenotypovou variaci na základě jednoho parametru je ale samozřejmě příliš ambiciózní.

Použitá literatura

- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF. 2006. X chromosome–inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 79:493-499.
- Badizadegan K, Perez-Atayde AR. 1997. Focal glycogenosis of the liver in disorders of ureagenesis: its occurrence and diagnostic significance. *Hepatology* 26:365-373.
- Beever C, Lai BP, Baldry SE, Peñaherrera MS, Jiang R, Robinson WP, Brown CJ. 2003. Methylation of ZNF261 as an assay for determining X chromosome inactivation patterns. *Am J Med Genet A* 120A:439-441.
- Bertelsen B, Tümer Z, Ravn K. 2011. Three new loci for determining X chromosome inactivation patterns. *J Mol Diagn* 13:537-540.
- Bland JM, Altman DG. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1:307-310.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brusius-Facchin AC, Schwartz IV, Zimmer C, Ribeiro MG, Acosta AX, Horovitz D, Monlleó IL, Fontes MI, Fett-Conte A, Sobrinho RP, Duarte AR, Boy R, Mabe P, Ascurra M, de Michelena M, Tylee KL, Besley GT, Garretton MC, Giugliani R, Leistner-Segal S. 2014. Mucopolysaccharidosis type II: identification of 30 novel mutations among Latin American patients. *Mol Genet Metab* 111:133-138.
- Carpentieri D, Barnhart MF, Aleck K, Miloh T, deMello T. 2015. Lysinuric protein intolerance in a family of Mexican ancestry with a novel SLC7A7 gene deletion. Case report and review of the literature. *Mol Genet Metab Reports* 2:47-50.
- Choi JH, Lee BH, Kim JH, Kim GH, Kim YM, Cho J, Cheon CK, Ko JM, Lee JH, Yoo HW. 2015. Clinical outcomes and the mutation spectrum of the *OTC* gene in patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *J Hum Genet* 60:501-507.
- Conzelmann E, Sandhoff K. 1983. Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci* 6:58-71.
- Cotton AM, Price EM, Jones MJ, Balaton BP, Kobor MS, Brown CJ. 2015. Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 24:1528-1539.
- De Camargo Pinto LL, Maluf SW, Leistner-Segal S, Zimmer da Silva C, Brusius-Facchin A, Burin MG, Brustolin S, Llerena J, Moraes L, Vedolin L, Schuch A, Giugliani R, Schwartz IV. 2010. Are MPS II heterozygotes actually asymptomatic? A study based on clinical and biochemical data, X-inactivation analysis and imaging evaluations. *Am J Med Genet A* 155:50-57.
- De Hoon B, Monkhorst K, Riegman P, Laven JSE, Gribnau J. 2015. Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. *J Med Genet* 52:784-790.
- Dell'Antone P. 1979. Evidence for an ATP-driven "proton pump" in rat liver lysosomes by basic dyes uptake. *Biochem Biophys Res Commun* 86:180-189.
- Dietrich O, Mills K, Johnson AW, Hasilik A, Winchester BG. 1998. Application of magnetic chromatography to the isolation of lysosomes from fibroblasts of patients with lysosomal storage disorders. *FEBS Lett* 441:369-372.
- Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH. 2008. Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch. Praha, Triton, 607 pp.
- Fu R, Ceballos-Picot I, Torres RJ, Larovere LE, Yamada Y, Nguyen KV, Hegde M, Visser JE, Schretlen DJ, Nyhan WL, Puig JG, O'Neill PJ, Jinnah HA; Lesch-Nyhan Disease International Study Group. 2014. Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. *Brain* 137:1282-303.
- Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. 2013. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504:282-286.
- Goldman R, Kaplan A. 1973. Rupture of rat liver lysosomes mediated by L-amino acid esters. *Biochim Biophys Acta* 318:205-216.
- Graham JM. 1993. The identification of subcellular fractions from mammalian cells. In: Biomembrane protocols: I. isolation and analysis, *Methods In Molecular Biology* 19, eds. Graham JM, Higgins J S. Totowa, Humana Press. pp. 1-18.
- Grünert SC, Villavicencio-Lorini P, Wermuth B, Lehnert W, Sass JO, Schwab KO. 2013. Ornithine transcarbamylase deficiency combined with type 1 diabetes mellitus – a challenge in clinical and dietary

- management. *J Diabetes Metab Disord* 12:37.
- Guillén-Navarro E, Domingo-Jiménez MR, Alcalde-Martín C, Cancho-Candela R, Couce ML, Galán-Gómez E, Alonso-Luengo O. 2013. Clinical manifestations in female carriers of mucopolysaccharidosis type II: a Spanish cross-sectional study. *Orphanet J Rare Dis* 8:92.
- Hakoda M, Hirai Y, Akiyama M, Yamanaka H, Terai C, Kamatani N, Kashiwazaki S. 1995. Selection against blood cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in Lesch-Nyhan heterozygotes occurs at the level of multipotent stem cells. *Hum Genet* 96:674-680.
- Hartree EF. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427.
- Hrebicek M, Mrazova L, Seyrantepe V, Durand S, Roslin NM, Noskova L, Hartmannova H, Ivanek R, Cizkova A, Poupetova H, Sikora J, Urinovska J, Stranecky V, Zeman J, Lepage P, Roquis D, Verner A, Ausseil J, Beesley CE, Maire I, Poorthuis BJ, van de Kamp J, van Diggelen OP, Wevers RA, Hudson TJ, Fujiwara TM, Majewski J, Morgan K, Kmoch S, Pshezhetsky AV. 2006. Mutations in TMEM76 cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Am J Hum Genet* 79:807-819.
- Jinnah HA, De Gregorio L, Harris JC, Nyhan WL, O'Neill JP. 2000. The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *Mutat Res* 463:309-326.
- Kim GH, Choi JH, Lee HH, Park S, Kim SS, Yoo HW. 2006. Identification of novel mutations in the human ornithine transcarbamylase (*OTC*) gene of Korean patients with OTC deficiency and transient expression of the mutant proteins in vitro. *Hum Mutat* 27:1159.
- Kogo T, Satoh Y, Kanazawa M, Yamamoto S, Takayanagi M, Ohtake A, Mori M, Niimi H. 1998. Expression analysis of two mutant human ornithine transcarbamylases in COS-7 cells. *J Hum Genet* 43:54-58.
- Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, Kojima M, Wakui K, Shimadzu M, Fukushima Y. 1999. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet* 104:49-55.
- Migeon BR. 2007 (2nd edition 2014). *Females are mosaics: X inactivation and sex differences in disease*. New York, Oxford University Press. 307 pp.
- Miles L, Heubi JE, Bove KE. 2005. Hepatocyte glycogen accumulation in patients undergoing dietary management of urea cycle defects mimics storage disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 40:471-476.
- Moriyama Y, Takano T, Ohkuma S. 1982. Acridine orange as a fluorescent probe for lysosomal proton pump. *J Biochem* 92:1333-1336.
- Mossner M, Nolte F, Hütter G, Reins J, Klaumünzer M, Nowak V, Obländer J, Ackermann K, Will S, Röhl H, Neumann U, Neumann M, Hopfer O, Baldus CD, Hofmann WK, Nowak D. 2013. Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. *J Med Genet* 50:108-117.
- Mušálková D. 2011. Návrh metody pro stanovení zešikmení X-inaktivace. Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, Ballabio A. 2011. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet* 20:3852-3866.
- Racchi O, Mangerini R, Rapezzi D, Rolfo M, Gaetani GF, Ferraris AM. 1998. X chromosome inactivation patterns in normal females. *Blood Cells Mol Dis* 24:439-447.
- Ricciuti F, Gelehrter TD, Rosenberg LE. 1976. X-chromosome inactivation in human liver: confirmation of X-linkage of ornithine transcarbamylase. *Am J Hum Genet* 28:332-338.
- Richtrová E. 2014. Charakterizace promotorových oblastí genů HGSNAT a GBA, a příspěvek ke studiu patogeneze MPS IIIC a Gaucherovy choroby. Dizertační práce. 1.LF UK v Praze.
- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325:473-477.
- Schröder B, Elsässer H, Schmidt B, Hasilik A. 2007a. Characterisation of lipofuscin-like lysosomal inclusion bodies from human placenta. *FEBS Lett* 581:102-108.
- Schröder B, Wrocklage C, Pan C, Jäger R, Kösters B, Schäfer H, Elsässer H, Mann M, Hasilik A. 2007b. Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic* 8:1676-1686.
- Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A, Saftig P. 2010. The proteome of lysosomes. *Proteomics* 10:4053-4076.
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A. 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332:1429-1433.
- Smale ST, Kadonaga JT. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72:449-479.
- Storkanova G, Vlaskova H, Chuzhanova N, Zeman J, Stranecky V, Majer F, Peskova K, Luksan O, Jirsa M, Hrebicek M, Dvorakova L. 2013. Ornithine carbamoyltransferase deficiency: molecular characterization of

- 29 families. *Clin Genet* 84:552-559.
- Sukegawa-Hayasaka K, Kato Z, Nakamura H, Tomatsu S, Fukao T, Kuwata K, Orii T, Kondo N. 2006. Effect of Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: enzymatic activity, protein processing and structural analysis. *J Inher Metab Dis* 29:755-761.
- Swierczek SI, Piterkova L, Jelinek J, Agarwal N, Hammoud S, Wilson A, Hickman K, Parker CJ, Cairns BR, Prchal JT. 2012. Methylation of *AR* locus does not always reflect X chromosome inactivation state. *Blood* 119:e100-e109.
- Tuchman M, Plante RJ, McCann MT, Qureshi AA. 1994. Seven new mutations in the human ornithine transcarbamylase gene. *Hum Mutat* 4:57-60.
- Voznyi Ya V, Karpova EA, Dudukina TV, Tsvetkova IV, Boer AM, Janse HC, van Diggelen OP. 1993. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease C (MPS III C). *J Inher Metab Dis* 16:465-472.
- Wattiaux R, Wattiaux-De Coninck S, Ronveaux-dupal MF, Dubois F. 1978. Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J Cell Biol* 78:349-368.
- Wenger DA, Williams C. 1991. Screening for lysosomal disorders. In: *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual*, ed. Hommes FA. New York, Wiley-Liss, pp. 587-617.
- Wu H, Luo J, Yu H, Rattner A, Mo A, Wang Y, Smallwood PM, Erlanger B, Wheelan SJ, Nathans J. 2014. Cellular resolution maps of X chromosome inactivation: implications for neural development, function, and disease. *Neuron* 81:103-119.
- Yaplito-Lee J, Chow CW, Boneh A. 2013. Histopathological findings in livers of patients with urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* 108:161-165.
- Yorifuji T, Muroi J, Uematsu A, Tanaka K, Kiwaki K, Endo F, Matsuda I, Nagasaka H, Furusho K. 1998. X-inactivation pattern in the liver of a manifesting female with ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. *Clin Genet* 54:349-353.
- Zhu J, He F, Hu S, Yu J. 2008. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 24:481-484.

Seznam publikací vztahujících se k dizertační práci

Mušálková D., Lukáš J., Majer F., Hřebíček O., Svobodová E., Kuchař L., Honzíkova J., Hůlková H., Ledvinová J., Hřebíček M.: Rapid isolation of lysosomal membranes from cultured cells. *Folia Biologica* 59:41-46 (2013); IF 1,219

Musalkova D., Minks J., Storkanova G., Dvorakova L., Hrebicek M.: Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 54:210-216 (2015); IF 2,646

Kostalova E., Pavelka K., Vlaskova H., **Musalkova D.**, Stiburkova B.: Hyperuricemia and gout due to deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in female carriers: New insight to differential diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 440:214-217 (2015); IF 2,824

Řeboun M., Rybová J., Dobrovolný R., Včelák J., Veselková T., Štorkánová G., **Mušálková D.**, Hřebíček M., Ledvinová J., Mágner M., Zeman J., Pešková K., Dvořáková L.: X chromosome inactivation analysis in different cell types and induced pluripotent stem cells elucidates the disease mechanism in a rare case of mucopolysaccharidosis type II in a female. *Folia Biologica* 62:82-89 (2016); IF 0,833

Richtrova E., Mrazova L.S., **Musalkova D.**, Luksan O., Stolnaya L., Minks J., Lukas J., Dvorakova L., Jirsa M., Hrebicek M.: *HGSNAT* has a TATA-less promoter with multiple starts of transcription. *Gene* 592:36-42 (2016); IF 2,319

Seznam publikací, které se nevztahují k dizertační práci

Musalkova D.: Farmakogenetika a farmakogenomika aneb Farmakoterapie šitá na míru, *Bioprosp* 20:57-60 (2010); bez IF