

Abstrakt

Lidské autoptické či bioptické vzorky tkání, myší modely a buněčné kultury různých typů představují nejčastější materiál při zkoumání buněčné patogeneze dědičných chorob. Tato dizertační práce je věnována všem uvedeným přístupům při studiu dvou X-vázaných lysosomálních onemocnění a to Fabryho choroby (FD, deficit α -galaktosidasy A, AGAL) a mukopolysacharidosy typu II (MPSII, deficit iduronát-2-sulfatasy, IDS).

Prvotním cílem práce byla analýza krevních lipidních B-antigenů s terminální α -galaktózou (B-GSL) v pankreatu pacientů s FD a krevní skupinou B (FD-B). B-GSLs představují vedle hlavního glykosfingolipidu (GSL), globotriaosylceramidu (Gb3Cer) další minoritní substrát AGAL. Deposita nedegradovaných B-GSL byla prokázána v autoptických vzorcích pankreatu FD-B pacientů a byla zde výrazně vyšší než u ostatních orgánů jako ledviny a plíce, kde se primárně ukládá Gb3Cer. Vysoká koncentrace lipidních i nelipidních B-antigenů byla u FD-B potvrzena především v exokrinních acinárních epiteliálních buňkách, doprovázená masivní akumulací ceroidu (sekundární znak lysosomálního strádání). Endokrinní část pankreatu zůstala na rozdíl od acinů zcela nepostížena ukládáním substrátů AGAL. Tento zajímavý fenomén buněčné biologie ukazuje, jak může specifická krevní skupina ovlivnit projevy nemoci v orgánech pacientů. Jelikož ledviny představují u FD jeden z nejpostiženějších orgánů, byla v další části práce studována distribuce vybraných GSLs a jejich molekulových typů (isoforem) v řezech ledvin u myšího modelu FD. Pomocí zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI) bylo identifikováno pět isoforem Gb3Cer zvýšených převážně v kůře ledvin s klesajícím trendem směrem k medule. Zvýšená pozitivita Gb3Cer byla dána zejména depozity v kortikálních tubulech. Tyto výsledky byly v souladu s histochemickými nálezy i s výsledky tandemové hmotnostní spektrometrie, ale MSI ukázala navíc další detaily molekulárního složení nedegradovaného Gb3Cer (i některých dalších lipidů).

Využití buněčných kultur získaných od pacientů představuje klasickou cestu studia chorob. Lidské primární kultury však mají omezení nejen v dostupnosti materiálu ale i v nesnadnosti získat buněčné typy relevantní pro chorobu. Tato omezení z velké části odstraňují indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC). Představují nový směr zkoumání buněčné patologie a patobiochemie dědičných chorob v průběhu časného vývoje a platformu pro testování terapeutických intervencí. Naším důležitým cílem proto bylo vytvoření iPSC linií vybraných lysosomálních chorob, které budou sloužit jako základ pro diferenciaci do vybraných, strádáním postižených, buněčných typů. V rámci této práce byly založeny iPSC linie FD (FD-iPSC) a MPSII (MPSII-iPSC).

Doposud jsou známy dva stavy iPSC lišící se zejména inaktivací X chromosomu (XCI) v samičích buňkách, označované jako primed (buňky po reprogramování s inaktivací jednoho z chromosomů X) a naíve (odvozené od primed iPSC, s oběma aktivními chromosomy). Změna kultivačního media u FD-iPSC a MPSII-iPSC, vedoucí k přechodu primed iPSC do jejich naíve stavu, vedla ke změně morfologie iPSC kolonií u obou nemocí, ale ke změně poměru XCI pouze u FD-iPSC klonu. Vzhledem k tomu že u MPS II dochází také k postižení CNS, byly připravené MPSII-iPSC linie následně diferencovány do směsi neurálních buněk.

Byla potvrzena zvýšená exprese lysosomálních markerů převážně v gliových buňkách a přítomnost abnormálních struktur bez ohraničující membrány. Akumulace glykosaminoglykanů (GAG) byla potvrzena ve směsi terminálně diferencovaných patientských neurálních buněk. Příklad rekombinantní IDS v kultivačním mediu měl pouze mírný preventivní efekt. Přetrvávající akumulace GAG je pravděpodobně dána jejich přítomností na plasmatické membráně, kde nemohou být degradovány rekombinantní IDS plně aktivované jen v kyselém prostředí lysosomů.

FD-iPSC linie byly diferencovány do spontánně bijících klastrů kardiomyocytů (CM). Důvodem k jejich přípravě jsou časté kardiomyopatie u pacientů s FD. U FD-CM byla detekována zvýšená koncentrace Gb3Cer i méně početná a dezorganizovaná fibrilární vlákna. Úspěšná internalizace komerčně dostupné rekombinantní AGAL byla potvrzena kolokalizací s lysosomálním markerem Cathepsinem D. Funkční CM budou dále používány k testování terapeutických postupů, např. pomocí farmakologických chaperonů. Dále jsme se zabývali otázkou, zda se na degradaci substrátů AGAL může podílet strukturně příbuzný enzym α -N-acetylgalaktosaminidasa (NAGA), jak upozorňovaly dřívější práce na kožních fibroblastech u FD. Naše metabolické experimenty s radioaktivními substráty na lidských buněčných iPSC modelech s vyřazeným genem pro AGAL, NAGA i obou genů zároveň, však spíše naznačují přítomnost jiné α -galaktosidasy účastnící se degradace B-GSL.