

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ÚSTAV DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH

Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie**



Autor: **Ing. Dita Mušálková**

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

**Molecular genetic and biochemical studies of selected inherited metabolic disorders,
development and applications of new methods**

Disertační práce

Vedoucí práce: **MUDr. Martin Hřebíček, Ph.D.**

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 13. 9. 2016

Dita Mušálková

Podpis

Identifikační záznam:

MUŠÁLKOVÁ, Dita. *Molekulárně genetické a biochemické studie vybraných dědičných metabolických onemocnění, vývoj a aplikace nových metod. [Molecular genetic and biochemical studies of selected inherited metabolic disorders, development and applications of new methods]*. Praha, 2016. 139 s., 7 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav dědičných metabolických poruch. Vedoucí práce Hřebíček, Martin.

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, 1.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 střídavých 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*.

Klíčová slova

lysosom, lysosomální membrána, gradientová centrifugace, inaktivace chromosomu X, metylace DNA, promotor, repetitivní oblasti, dědičná metabolická onemocnění, Hunterův syndrom, deficit OTC, Lesch-Nyhanův syndrom

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.

Keywords

lysosome, lysosomal membrane, gradient centrifugation, X chromosome inactivation, DNA methylation, promoter, repetitive regions, inherited metabolic disorders, Hunter syndrome, OTC deficiency, Lesch-Nyhan syndrome

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Martinu Hřebíčkoví, Ph.D. za odborné vedení mého doktorského studia a dále kolektivu Ústavu dědičných metabolických poruch, 1.LF UK a VFN za spolupráci, cenné rady a vytvoření přátelského pracovního prostředí. Také moc děkuji za podporu své rodině.

Tato práce byla finančně podpořena následujícími granty a projekty: GAUK No. 42314, IGA MZ NT 12239, IGA MZ NS 10342, PRVOUK-P24/LF1/3 a SVV 260256/2016.

Obsah

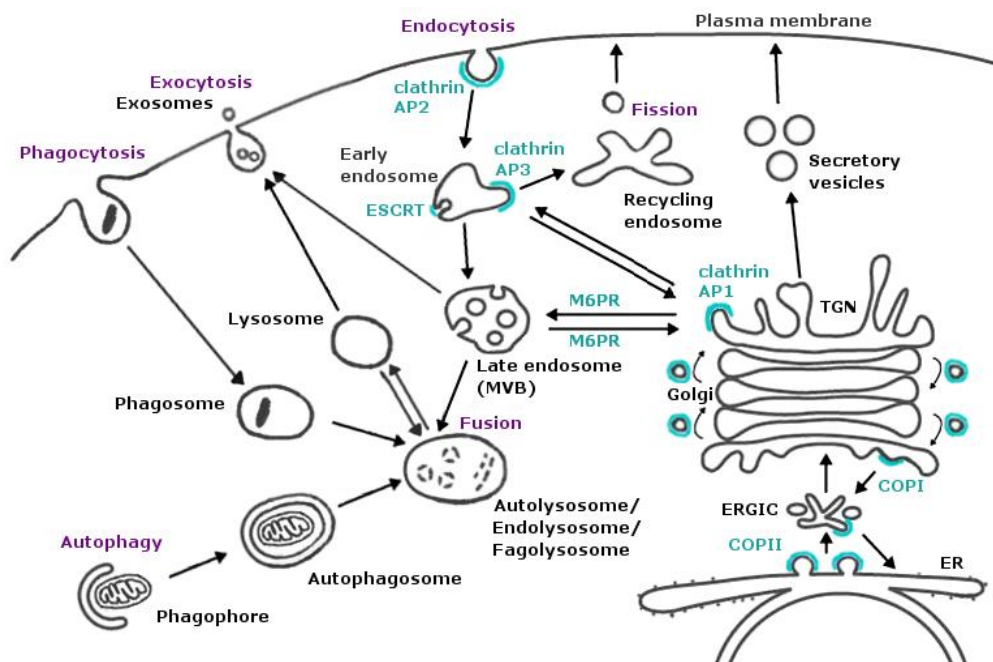
1	Úvod.....	8
1.1	Lysosom.....	8
1.1.1	Izolace lysosomů a lysosomálních membrán	10
1.1.2	Lysosomální střídavá onemocnění.....	12
1.2	Inaktivace chromosomu X.....	14
1.2.1	Inaktivní chromosom X a jeho typické vlastnosti	14
1.2.2	Ustanovení inaktivace chromosomu X.....	16
1.2.3	Geny unikající inaktivaci chromosomu X.....	18
1.2.4	Zešikmení inaktivace chromosomu X.....	20
1.2.5	Poměr XCI a mosaicismus v různých tkáních.....	22
1.2.6	X-vázaná onemocnění	25
1.2.7	Metody stanovení poměru XCI	28
2	Cíle	32
3	Metody	33
3.1	Metody použité pro izolaci lysosomů a lysosomálních membrán.....	33
3.1.1	Kultivace buněčných kultur.....	33
3.1.2	Homogenizace buněčných linií	33
3.1.3	Lyze lysosomů.....	33
3.1.4	Příprava lineárního a krokového sacharosového gradientu.....	34
3.1.5	Příprava lineárního gradientu z OptiPrepu	34
3.1.6	Měření refrakčních indexů.....	34
3.1.7	Měření změny pH pomocí akridinové oranže	34
3.1.8	Sonikace vzorků	35
3.1.9	Měření koncentrace proteinu	35
3.1.10	Měření aktivity glukocerebrosidasy a hexosaminidasy.....	35
3.1.11	Měření aktivity sukcinátdehydrogenasy.....	35
3.1.12	Měření aktivity alkalické a kyselý fosfatasy.....	36
3.1.13	Měření aktivity katalasy	36
3.1.14	Měření aktivity NADPH-cytochrom <i>c</i> reductasy.....	37
3.1.15	SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE).....	37
3.1.16	Western blot.....	37
3.2	Metody použité pro studii vlivu promotorových variant <i>HGSNAT</i>	38
3.2.1	Měření aktivity enzymu HGSNAT	38
3.2.2	Měření koncentrace proteinu	38
3.3	Metody použité pro stanovení poměru inaktivace chromosomu X	39
3.3.1	Příprava vzorků gDNA, RNA a cDNA	39
3.3.2	Bioinformatické studie a návrh primerů.....	39
3.3.3	Štěpení DNA a polymerázová řetězová reakce (PCR).....	39
3.3.4	Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu.....	40
3.3.5	Kapilární elektroforéza.....	41
3.3.6	Selekce primerů a určení poměru XCI pomocí nových metod	41
3.3.7	Určení poměru XCI s využitím oblasti genu <i>AR</i>	42

3.3.8	Určení poměru XCI na základě transkripčních metod – metoda SNaPshot.....	43
3.3.9	Určení poměru XCI na základě sekvenování produktů RT-PCR.....	43
3.3.10	Analýza polymorfismů pomocí soupravy Investigator Argus X-12	43
3.3.11	SDS-PAGE a Western blot.....	44
3.3.12	Měření aktivity enzymu OTC.....	44
3.3.13	Statistická analýza	44
3.4	Ostatní metody	45
4	Výsledky a diskuse.....	46
4.1	Izolace lysosomálních membrán z kultivovaných buněk	46
4.2	Ověření vlivu promotorových variant genu <i>HGSNAT</i>	50
4.3	Vývoj nových metod pro stanovení zešikmení chromosomu X.....	54
4.4	Aplikace nových metod pro stanovení zešikmení chromosomu X.....	60
4.4.1	Analýza poměrů XCI u dívky s velmi vzácnou manifestací MPS II	60
4.4.2	Analýza poměrů XCI v rodině s mutací v genu <i>HPRT1</i>	64
4.4.3	Analýza poměrů XCI v explantátu jater dívky s deficitem OTC	67
5	Závěr.....	75
6	Seznam zkratk	77
7	Použitá literatura	79
8	Seznam publikací a prezentací	101
8.1	Seznam publikací vztahujících se k dizertační práci	101
8.2	Seznam publikací, které se nevztahují k dizertační práci	101
8.3	Seznam ústních prezentací	101
8.4	Seznam posterových sdělení	102
9	Přílohy	103
	Mušálková D. et al., 2013.....	104
	Musalkova D. et al., 2015.....	110
	Kostalova E. et al., 2015.....	117
	Řeboun M. et al., 2016.....	122
	Richtrova E. et al., 2016.....	130
	Tab. S1.....	137
	Tab. S2.....	139

1 Úvod

1.1 Lysosom

Termín lysosom byl poprvé použit Christianem de Duve (de Duve C. et al., 1955) a měl odrazet roli této organely coby hlavního místa intracelulárního štěpení (lyze) makromolekul za účelem znovuvyužití jejich stavebních jednotek. Lysosom je součástí endosomálně-lysosomálního systému, který hraje kritickou roli v celé řadě buněčných procesů, včetně sekrece, signalizace, reparace a recyklace membrán, metabolismu železa, apoptózy a obratu makromolekul a látek vstřebaných endocytosou, fagocytosou nebo autofagií (viz obr. 1). Lysosom je tudíž klíčovým regulátorem buněčné homeostázy a nachází se na rozcestí mnoha buněčných pochodů, jejichž narušení má závažný dopad na zdraví jedince (Settembre C. et al., 2013; Appelqvist H. et al., 2013; Saftig P. a Klumperman J., 2009).



Obr. 1: Endosomálně-lysosomální systém (ELS) a jeho interakce s biosyntetickou dráhou. Lysosomální proteiny jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu (ER) a transportovány skrze ERGIC (ER-Golgi intermediate department) a Golgiho aparát do *trans*-Golgiho sítě (TGN), odkud se mohou dostat do sekrečních váčků nebo přímo do ELS. Nejlépe popsáním způsobem transportu do ELS je clathrin-dependentní transport lysosomálních hydrolas modifikovaných manosa-6-fosfátem, který je rozpoznáván receptory M6PR v *trans*-Golgiho síti. Materiál pro degradaci se do lysosomů dostává z různých zdrojů, z procesu autofagie, fagocytosy či endocytosy. Endocytická dráha začíná zformováním ranných (early) endosomů, kde je materiál tříděn a může být buď zadržen, nebo transportován přes recyklující endosomy zpět k buněčnému povrchu. Činností proteinů ESCRT vznikají v endosomu intraluminální váčky (ILV). V ranném endosomu klesá pH a postupně je transformován do pozdního (late) endosomu, neboli multivezikulárního tělíska (MVB), které fúzuje s lysosomem a dochází k degradaci materiálu. Enzymy se poté znovu zakoncentrují v novém lysosomu. Lysosom a pozdní endosom mohou také fúzovat s plasmatickou membránou, přičemž dochází k uvolnění ILV, které jsou dále nazývány exosomy. Na obrázku je zobrazen clathrin-dependentní typ endocytosy, na kterém se podílí adaptorový protein AP2. Na tvorbě a fúzování váčků ve zázorněném systému se účastní celá řada dalších proteinů: AP1, AP3, COPI, COPII, ale také např. Rab, v-SNARE a t-SNARE proteiny a mnohé další (neukázáno).

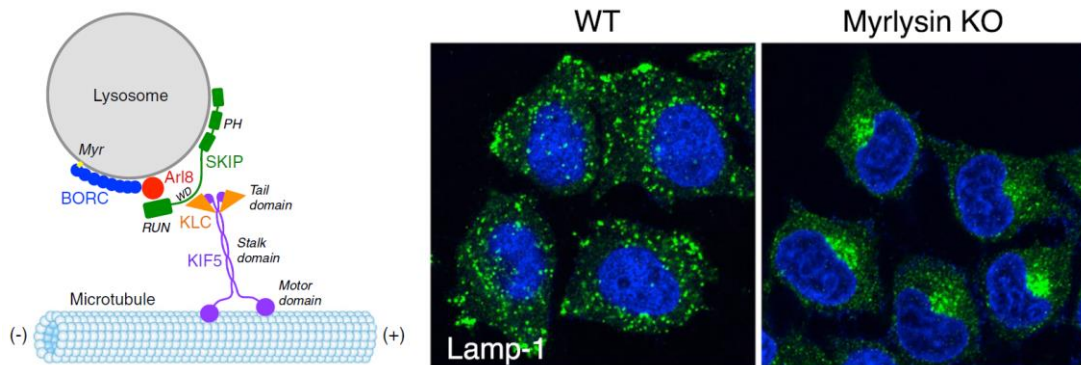
Lysosomy se pod elektronovým mikroskopem jeví jako denzní (tmavá) tělíska v cytosolu, o velikosti $\leq 1 \mu\text{m}$, ale jejich velikost (i počet) se za určitých podmínek může dramaticky měnit. Lysosom má kyselé vnitřní prostředí (lumen, $\text{pH} < 5$) a vysoký obsah iontů Ca^{2+} (až $600 \mu\text{M}$). Je ohraničen jednoduchou membránou, která je chudá na cholesterol a na vnitřní straně je pokryta ochrannou vrstvou (glykokalyx), tvořenou hlavně oligosacharidovými řetězci glykoproteinů LAMP1, LAMP2, LIMP1/CD63 a LIMP2, které brání poškození membrány hydrolasami. V endosomálním systému jsou z limitující membrány generovány intraluminální váčky (ILV), které nemají glykokalyx, obsahují vysoké množství bis(monoacylglycerol)fosfátu (BMP) a v lysosomu jsou společně s obsaženými membránovými proteiny a glykolipidy degradovány. V lumen lysosomu se kromě aktivátorů (např. saposinů) nachází cca 50 solubilních hydrolas (proteas, peptidas, fosfatas, nukleas, glykosidas, sulfatas, lipas aj.), které jsou aktivní při kyselém pH a jsou součástí mnohakrokových katabolických procesů. Za cílení těchto enzymů do lysosomu jsou zodpovědné hlavně modifikace manosa-6-fosfátem, který je rozpoznáván receptory M6PR (CI-M6PR a CD-M6PR) v *trans*-Golgiho síti. Samotný lysosom ale tyto receptory postrádá, protože jsou z endosomů recyklovány zpět. Kromě toho existují i nezávislé cesty, např. β -glukocerebrosidasa využívá jako receptor protein LIMP2 (Reczek D. et al., 2007).

V lysosomální membráně (LM) se nachází 140-300 proteinů, které se podílí na řadě procesů: acidifikaci lysosomu (zejména vATPasová H^+ pumpa), fúzi a interakci s jinými buněčnými strukturami (Rab7 GTPasa a SNARE proteiny), řízení pozice v rámci buňky (komplex BORC, obr. 2) a transportu látek do/z lumen, kam kromě transportérů (např. ABCD4 pro kobalamin) spadá také řada iontových kanálů (např. CIC7, MCOLN1) a membránový enzym HGSNAT. Proteiny LM obsahují v cytoplasmatické části motivy zodpovědné za cílení do lysosomu, tyrosinový a/nebo dileucinový motiv. Mezi nejhojnější proteiny LM patří kromě rodiny LAMP a LIMP proteinů také protein NPC1, který se společně s proteinem NPC2 podílí na transportu cholesterolu ven z lysosomu.

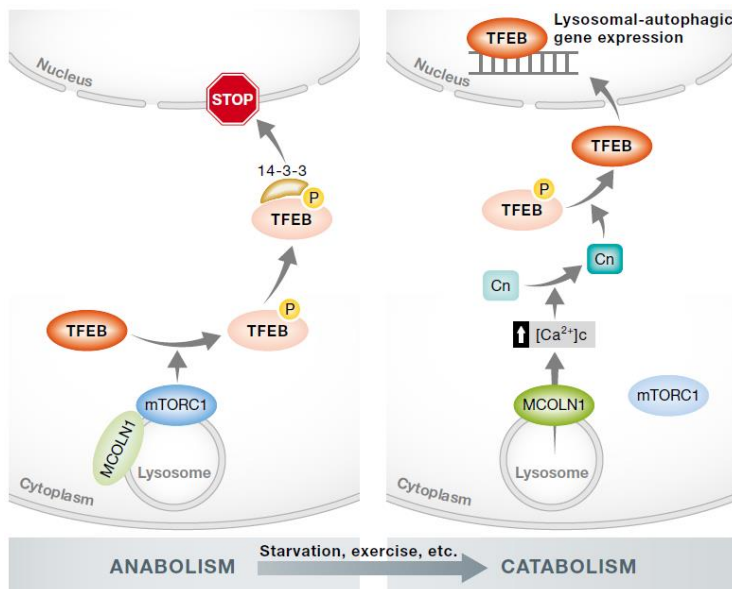
U mnoha dalších transportních dějů zatím nejsou určeny proteiny, které je zprostředkovávají (Chapel A. et al., 2013), a stále jsou nacházeny nové proteiny LM, popřípadě nové role známých proteinů. Např. v roce 2012 byl objeven lysin/argininový transporter LAAT-1, vzdálený homolog cystinosinu (CTNS), jehož aktivita vysvětluje, jak podávání cysteaminu pomáhá ulehčit projevům cystinosy (Liu B. et al., 2012). V roce 2015 byl identifikován hledaný lysosomální K^+ kanál, protein TMEM175 (Cang C. et al., 2015). Zajímavým zjištěním byla také role proteinů NPC1 a LAMP1 coby receptorů pro viry Ebola a Lassa (Jae

L.T. a Brummelkamp T.R., 2015).

Jak se funkce lysosomu liší u různých typů buněk nebo za různých podmínek, se ví relativně málo. Identifikace transkripčního faktoru EB (TFEB), hlavního regulátoru biogeneze lysosomu a autofagie, ale odhalila, jak se lysosom přizpůsobuje vlivům prostředí (viz obr. 3), např. nedostatku živin nebo akumulaci substrátů (Sardiello M. et al., 2009; Settembre C. et al., 2011; přehledně v Settembre C. et al., 2013).



Obr. 2: Komplex BORG a jeho funkční studie. Schéma vlevo ukazuje, jak je komplex BORG (obsahující myrlysin, Myr) zapojen do interakce s kinesinem (kinesin-1), který zprostředkovává pohyb lysosomu směrem k (+) konci mikrotubulu. V buňkách, které neexprimují myrlysin (myrlysin KO) lze oproti kontrole (WT) pozorovat juxt nukleární pozici lysosomálního markeru Lamp1 (zeleně). Adaptováno z literatury (Pu J. et al., 2015). Za normálních růstových podmínek jsou lysosomy většinou lokalizovány na periférii buňky, ale při hladovění dochází činností TRPML1 (MCOLN1), primárního lysosomálního Ca^{2+} kanálu, k rychlé redistribuci do blízkosti jádra, kde dochází k fúzi s autofagosomy (popsáno v Li X. et al., 2016).



Obr. 3: Mechanismus signalizace z lysosomu do jádra. Za normálních podmínek je protein TFEB fosforylován komplexem mTORC1, klíčovým kontrolorem buněčného růstu, na povrchu lysosomu a zadržován v cytoplasmě. Při např. hladovění dochází (v přímé reakci na obsah aminokyselin v lysosomu) k inaktivaci mTORC1 a uvolnění iontů Ca^{2+} z lysosomu činností MCOLN1. To vede k aktivaci kalcineurinu a defosforylaci TFEB, který je translokován do jádra a aktivuje transkripci genů lysosomální a autofagické dráhy. TFEB se váže na tzv. element CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation), který se nachází v promotorové oblasti ~500 genů. Adaptováno z literatury (Ballabio A., 2016).

1.1.1 Izolace lysosomů a lysosomálních membrán

Studium proteomu organel je klíčové pro pochopení jejich funkce. Pro izolaci lysosomů a lysosomálních membrán (LM) byly použity různé techniky (Lübke T. et al., 2009; Schröder B.A. et al., 2010), které nejčastěji spočívají v subcelulární frakcionaci pomocí gradientové

a/nebo diferenciální centrifugace nebo využívají specifických vlastností lysosomálních proteinů (Sleat D.E. et al., 2007). Výsledné preparáty slouží ke studiu jednotlivých lysosomálních membránových proteinů (Meikle P.J. et al., 1995; Taute A. et al., 2002) nebo provedení proteomických studií (Schröder B. et al., 2007a,b; Bagshaw R.D. et al., 2005a, Callahan J.W. et al., 2009; Chapel A. et al., 2013). Avšak u této práce je často složité rozlišit mezi proteiny, které jsou lysosomu vlastní a které do něj byly transportovány k degradaci. Navíc není lehké získat čistý preparát lysosomů, které objemově tvoří zhruba 1 % buňky. Z těchto důvodů není identifikace, validace a funkční charakterizace lysosomálních proteinů u konce.

Rozdělení lysosomů, mitochondrií a peroxisomů na denzitních gradientech má své limity, protože rozmezí hustoty těchto organel jsou velmi podobná a překrývají se, obzvláště při využití sacharosy. U jiných typů médií jako je Percoll, Nycodenz nebo OptiPrep (iodixanol) se mohou rozmezí hustoty velmi lišit, např. v iodixanolovém a sacharovém gradientu mají lysosomy nižší hustotu než mitochondrie, ale při použití Percollu je to (neznámo proč) naopak. Tato média jsou výrazně dražší než sacharosa, ale na rozdíl od sacharosy u nich lze pracovat v izosmolárních podmínkách. Nevýhodou je, že Percoll je třeba z frakcí odstranit, protože tento koloidní roztok neumožňuje přímé spektrofotometrické měření, a Nycodenz netvoří při centrifugaci samovolně gradient.

Separace lysosomů může být značně vylepšena pomocí technik, které ovlivňují hustotu organel. Podávání Tritonu WR1339 (tyloxapolu) nebo dextranu pokusným zvířatům (Leighton F. et al., 1968; Arai K. et al., 1991), inkubace kultivovaných buněk s progesteronem (Gasingirwa M.C. et al., 2008) nebo inkubace vzorku s 1-2 mM CaCl₂, vedoucí k zvětšení objemu mitochondrií a snížení jejich hustoty (Arai K. et al., 1991; Kawashima A. et al., 1998), podstatně vylepšilo oddělení lysosomů od mitochondrií. Nicméně tyto procedury vedou ke vzniku organel s abnormálními vlastnostmi.

Diettrich a kol. úspěšně obohatili frakci LM získanou z gradientu Percollu pomocí imunoadsorpce na kuličky potažené protilátkou proti proteinu LAMP2 (Diettrich O. et al., 1996). Stejná výzkumná skupina později přišla s metodou magnetické chromatografie (Diettrich O. et al., 1998), jejíž výhodou je, že nezávisí na morfologii a hustotě lysosomů, která může být u střeďavých onemocnění pozměněna. Kultivované fibroblasty inkubovali se superparamagnetickými koloidními částicemi Fe/dextranu. Lysosomy obsahující endocytované částice následně zachytili na magnetické koloně a LM získali hypotonickou lyzí.

Lyze lysosomů a separace LM pomocí centrifugace je další technikou, která byla využita pro

obohacení LM, přičemž pro lyzi může být využit hypoosmotický pufr (Ohsumi Y. et al., 1983; Chapel A. et al., 2013) nebo metylestery určitých aminokyselin, které působí selektivně na lysosomy (Goldman R. a Kaplan A., 1973; Symons L.J. a Jonas A.J., 1987; Schröder B. et al., 2007a). Takovou látkou je například metylester methioninu (MME), který snadno prostupuje do lysosomu, kde dojde k jeho štěpení, akumulaci methioninu a osmotická nerovnováha následně vede k prasknutí lysosomu.

Většina strukturálních a biochemických analýz lysosomu byla provedena na lysosomech izolovaných z krysích jater, popř. lidské placenty, u kterých lze získat vysoce purifikovaný vzorek. Izolace z biologického materiálu jiného typu vyžaduje úpravu standardních metod (Graham J.M., 2009), přičemž je obtížné dosáhnout srovnatelné čistoty a výtěžku. Proto existuje tak vysoké množství článků popisujících postupy izolace. Srovnáním proteinového složení lysosomů izolovaných z tkání nebo buněčných linií získaných od pacientů s lysosomálním střádavým onemocněním a kontrol lze identifikovat mutovaný gen/protein, který je příčinou daného onemocnění (Sleat D.E. et al., 2009). Většina vzácnějších proteinů byla avšak identifikována nepřímo pomocí genetického mapování (např. Hrebicek M. et al., 2006; Siintola E. et al., 2007; Rutsch F. et al., 2009).

1.1.2 Lysosomální střádavá onemocnění

Dysfunkce lysosomů je spojena s řadou onemocnění, ale i s procesem stárnutí. Do určité míry může být střádání nedegradovaného materiálu v lysosomu, tzv. lipofuscinu, považováno za fyziologický jev a bylo popsáno hlavně v postmitotických tkáních (mozku, srdci) a játrech. Lipofuscin má žlutohnědé zbarvení, vykazuje autofluorescenci s excitací v oblasti 320-480 nm a je obecně považován za indikátor stárnutí, protože se jeho množství s věkem zvyšuje (Schröder B.A. et al., 2010).

Koncept lysosomálních střádavých onemocnění (LSD) byl vytvořen Henri G. Hersem, jenž objevil, že Pompeho choroba (glykogenosa typu II, OMIM #232300) je způsobena deficitem lysosomálního enzymu (Hers H.G., 1963). Lysosomální střádavá onemocnění jsou heterogenní skupinou zhruba 60 onemocnění, které lze na základě složení a morfologie střádaného materiálu rozdělit na mukopolysacharidosy, glykoproteinosy, (sfingo)lipidosy, glykogenosy a neuronální ceroidní lipofuscinosy. Souhrnně se v České republice vyskytují s prevalencí 12,25 případů na 100 000 živě narozených (Poupetova H. et al., 2010).

Obecně mohou být LSD způsobeny nedostatečnou enzymovou aktivitou v důsledku mutace enzymu nebo jeho aktivátoru, popřípadě poruchou v posttranslační modifikaci enzymů

(mukolipidosa typu II, polysulfatasový deficit) nebo poruchou funkce protektivních proteinů (galaktosialidosa). Další širokou kategorií jsou onemocnění způsobená deficitem proteinů, které nemají katalytickou (hydrolytickou) funkci, jako jsou např. transportery a jiné proteiny v lysosomální membráně, ale i uvnitř lysosomu. Do této kategorie spadá např. sialin (onemocnění Salla), cystin (cystinosa) a NPC1 a NPC2 (Niemann-Pickova choroba typu C).

U syndromů Heřmanského-Pudlákova, Griscelliho a Chediak-Higashiho dochází k rozsáhlejším změnám vezikulárního transportu a biogeneze lysosomů a příbuzných organel (LRO).

Deficit jednotlivých lysosomálních proteinů může mít negativní dopad nejen na určitou metabolickou dráhu, ale i na základní funkce lysosomu (Platt F.M. et al., 2012; Segatori L. et al., 2014), např. na proces autofagie, při jehož porušení dochází k akumulaci dysfunkčních mitochondrií a jiných substrátů. Časté je také ovlivnění homeostázy iontů Ca^{2+} . Strádatá onemocnění často postihují centrální nervovou soustavu, což vede k mentální retardaci, progresivní degeneraci a předčasné smrti pacienta. Dysfunkce lysosomů a autofagie je také jedním z molekulárních mechanismů u adultních neurodegenerativních onemocnění, jako je Huntingtonova, Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba (Lee J.H. et al., 2010), kde se navíc ukazuje, že heterozygotní mutace v genu kódujícím lysosomální protein může predisponovat k vývoji onemocnění (Settembre C. et al., 2013).

Možnost korekce enzymového deficitu byla demonstrována již na konci 60. let (Fratantoni J.C. et al., 1968), kdy při společné kultivaci fibroblastů s různými defekty došlo k normalizaci fenotypu. Současné terapeutické strategie se zaměřují na enzymovou substituci, inhibici syntézy substrátu, využití molekulárních chaperonů, transplantaci kostní dřeně a genovou terapii za pomoci virových (i nevirálních) vektorů (Wakabayashi T. et al., 2015). Velkou překážkou jsou vysoké náklady na preklinické a klinické studie a obtížnost překročení hematoencefalické bariéry, což se s různým úspěchem daří obejít intratekálním podáváním daného enzymu (Muenzer J. et al., 2016). V poslední době vzbudila pozornost také možnost nahradit při buněčné terapii hematopoetické buňky autologními indukovanými pluripotentními kmenovými buňkami (iPSC). Tyto buňky nebo jejich diferencované formy by mohly být selektovány na základě poměru inaktivace chromosomu X a využity pro léčbu u žen heterozygotních pro X-vázaná onemocnění, od kterých byly získány (Bhatnagar S. et al., 2014), a to bez využití genové manipulace.

1.2 Inaktivace chromosomu X

U živočichů se vyvinuly různé komplexní mechanismy regulace genové dávky, které kompenzují rozdíl v počtu chromosomů X mezi pohlavími (Disteche C.M., 2012) a vedou k velké variabilitě exprese lišící se jak mezi živočišnými druhy, tak mezi jedinci různého i stejného pohlaví, mezi různými vývojovými fázemi organismu, tkáněmi i buněčnými typy. U placentálních savců je kompenzace dávky X-vázaných genů zprostředkována inaktivací jednoho z chromosomů X (X-inaktivací, XCI) v samičích buňkách, což má výrazný dopad na projevy X-vázaných onemocnění. Metabolická onemocnění způsobená mutacemi v genech lokalizovaných na chromosomu X se zásadně odlišují od autosomálních onemocnění nejen dědičností, ale i buněčnou a tkáňovou biologii.

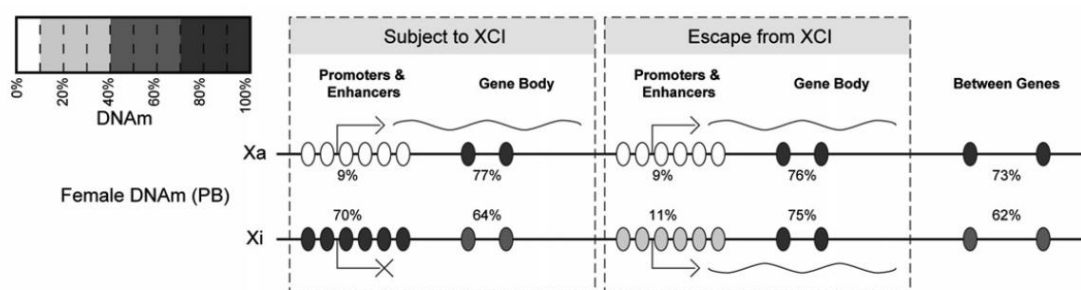
1.2.1 Inaktivní chromosom X a jeho typické vlastnosti

Pohlavní chromosomy se v průběhu evoluce vyvinuly z páru identických autosomů v podstatně odlišné chromosomy. Zatímco lidský chromosom X má délku 156 Mbp a nese zhruba 2000 genů, u chromosomu Y došlo během posledních ≥ 165 milionů let k výrazné degeneraci (Veyrunes F. et al., 2008). Ta byla způsobena potlačením rekombinace, která zabránila přenosu faktoru (*SRY*) determinujícího pohlaví (Bachtrog D., 2013). Meiotická rekombinace mezi chromosomy X a Y je limitovaná na krátké pseudoautosomální oblasti (PAR1 a PAR2) v terminálních částech chromosomů. Mimo tyto oblasti zůstal zachován pouze omezený počet funkčních X-Y párů, tzv. gametologů (Ross M.T. et al., 2005).

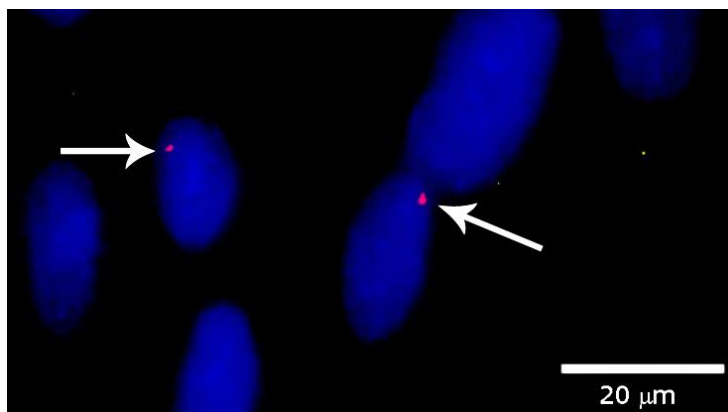
Již v roce 1949 pozoroval Murray Barr silně heterochromatické tělísko, tzv. Barrovo tělísko, které se nalézalo v samičích somatických buňkách v interfázi na periferii jádra (Barr M.L. a Bertram E.G., 1949). To, že se opravdu jedná o inaktivní chromosom X, potvrdila svými pokusy Mary F. Lyon v roce 1961 (Lyon M.F., 1961). Kompenzace dávky X-vázaných genů je dosaženo inaktivací transkripce jednoho z chromosomů X v samičích buňkách a zároveň zvýšením exprese (upregulací) X-vázaných genů u aktivního chromosomu X (X_a) (Ohno S., 1967). Byly popsány dva hlavní mechanismy upregulace, které zahrnují vyšší poměr acetylace H4K16 a histonové varianty H2A.Z v promotorových oblastech X-vázaných genů a zvýšenou stabilitu RNA (Deng X. et al., 2013). V souladu s tím byl na 5' konci X-vázaných genů nalezen také vyšší poměr iniciační formy RNA polymerasy II (PolIII-S5p) (Deng X. et al., 2011). Nicméně, platnost tzv. Ohnovy hypotézy o upregulaci je stále velmi diskutovaná (Veitia R. et al., 2015).

Inaktivní chromosom X (X_i) je tvořen vysoce kondenzovaným fakultativním

heterochromatinem, replikuje se v pozdní S-fázi buněčného cyklu (Hansen R.S. et al., 1996) a nachází se v oblasti chudé na transkripty hnRNA, tzv. Cot-1 hole (Clemson C.M. et al., 2006). Pro Xi je typická přítomnost mnoha epigenetických regulačních znaků, jako jsou modifikace histonů H3K27me3, H3K9me2, H2AK119ub a inkorporace histonové varianty macroH2A. Zároveň dochází k hypoacetylaci histonů a ztrátě modifikace H3K4me3. Dále je u Xi přítomná vysoká úroveň metylace CpG ostrůvků (oblastí bohatých na CpG dinukleotidy) v promotorových oblastech genů podléhajících inaktivaci a naopak ve srovnání s aktivním chromosomem nižší metylace DNA v intergenových a intragenových oblastech (viz obr. 4) (Cotton A.M. et al., 2015; Hellman A. a Chess A., 2007; Weber M. et al., 2005). Za modifikace Xi jsou mimo jiné zodpovědné Polycomb represivní komplexy (PRC1 a PRC2), histondeacetylasy (HDAC) a DNA metyltransferasy (DNMT).



Obr. 4: Přehledný souhrn metylace DNA u Xa a Xi v leukocytech periferní krve (PB). Procenta udávají průměrné hodnoty metylace DNA všech CpG dinukleotidů zařazených do dané kategorie. Přítomnost CpG je graficky reprezentována oválnými značkami, které ale neodrážejí skutečnou hustotu CpG. Adaptováno z literatury (Cotton A.M. et al., 2015).



Obr. 5: Lokalizace *Xist* RNA (Cy3, červeně) v jádrech myších fibroblastů (DAPI, modře) koresponduje s typickou lokalizací Xi na okraji jádra. Foto: autorka.

Inaktivní chromosom X je pokryt dlouhou nekódující RNA *XIST/Xist* (obr. 5), která je exprimovaná výlučně z Xi (Brown C.J. et al., 1991; Clemson C.M. et al., 1996). *XIST/Xist* RNA má charakteristiky mRNA (je sestřihovaná a polyadenylována), ale uniká jadernému exportu do cytoplasmy a zůstává v jádře. Je kódovaná genem ležícím v oblasti *XIC/Xic* (X-inactivation center) obsahující další geny regulující inaktivaci (přehledně v Galupa R. a Heard E., 2015). U člověka má *XIST* RNA délku 19,3 kb a s myší *Xist* RNA o délce 17,9 kb sdílí

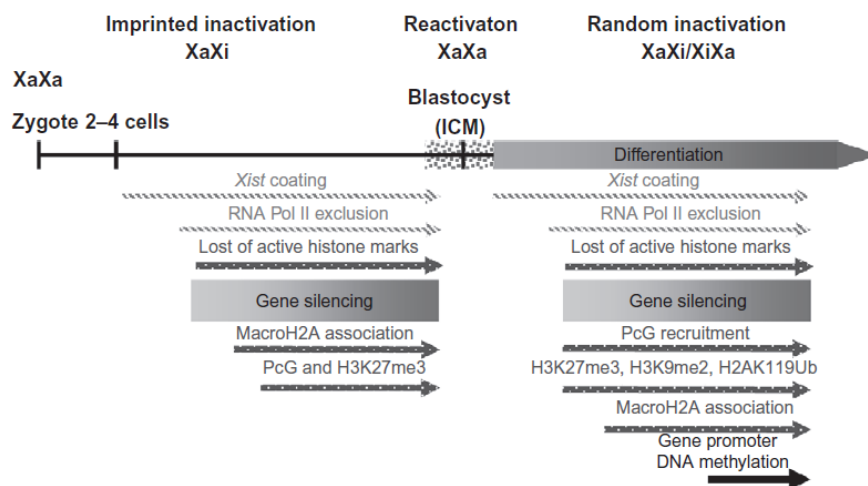
několik krátkých úseků vysoké homologie (označovaných A až F). Oblast repetitivního elementu A na 5' konci je evolučně konzervovaná a nepostradatelná pro umlčení transkripce. Zároveň je postačující pro umlčení transkripce reportérového genu (Minks J. et al., 2013).

Inaktivace chromosomu X je reverzibilní, k reaktivaci dochází v samičích zárodečných buňkách, kde také dochází ke ztrátě epigenetických znaků typických pro heterochromatin a ke ztrátě *XIST* RNA.

1.2.2 Ustanovení inaktivace chromosomu X

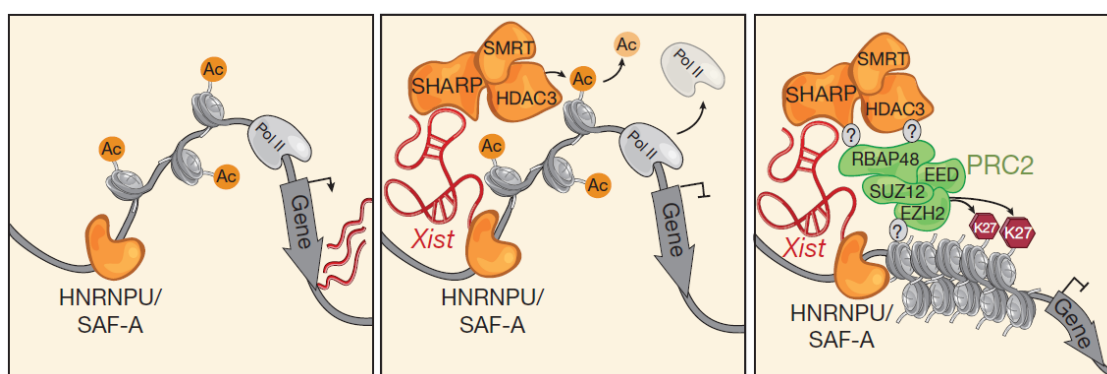
K iniciaci inaktivace chromosomu X dochází v raném embryonálním vývoji a umlčení exprese je u myši kompletní zhruba ve stádiu E6.5, u člověka později. Výběr budoucího Xi je náhodný. Ačkoli není jasné, jak fáze výběru probíhá, na základě pokusů s XX-XY heterokaryony bylo demonstrováno, že nevyžaduje homologní párování *Xic* (Barakat T.S. et al., 2014), což odporuje dřívějším představám (Xu N. et al., 2006; Bacher C.P. et al., 2006). Avšak existuje mechanismus, který zjišťuje počet chromosomů X ve vztahu k autosomům. Tím se vysvětluje proč jedinci s nadbytečným počtem (např. u karyotypu 46,XXX nebo 46,XXY) mají aktivní pouze jeden chromosom X, zatímco u triploidních jedinců je tento počet proměnlivý (Yang C. et al., 2011). V literatuře jsou přehledně popsány různé modely vedoucí k monoalelické expresi *Xist* RNA a iniciaci náhodné X-inaktivace, přičemž tyto modely se navzájem nemusí vylučovat (Augui S. et al., 2011).

V období ustanovení inaktivace je přítomno pouze omezené množství buněk, což vede k nerovnoměrné distribuci buněk, které mají aktivní paternální (X_p) nebo maternální (X_m) chromosom X. U myši existuje v preimplantačním stadiu také tzv. imprintovaná X-inaktivace, kdy dochází výlučně k umlčení X_p , ale u vnitřní buněčné masy dochází k reaktivaci a následně náhodné inaktivaci (obr. 6). Paternální chromosom X zůstává u myších extraembryonálních tkání inaktivní, avšak u člověka a např. králíka nebo koně nebyla imprintovaná X-inaktivace nalezena (Okamoto I. et al., 2011; Wang X. et al., 2012). Ustanovení imprintované i náhodné X-inaktivace je iniciováno šířením *Xist* RNA *in cis* (Avner P. a Heard E., 2001), po kterém následuje exkluze RNA polymerasy II, modifikace histonů a jiné změny následované na závěr nejstabilnější metylací DNA v promotorových oblastech genů. Tato soustava epigenetických znaků synergicky udržuje inaktivovaný stav chromosomu (Chang S.C. et al., 2006; Csankovszki G. et al., 2001). Inaktivace chromosomu X vyžaduje zásadní reorganizaci chromatinu, dochází ke globální ztrátě lokálních struktur a vytvoření dvou velkých domén, oddělených oblastí obsahující makrosatelit *DXZ4* (Rao S. et al., 2014).



Obr. 6: Průběh ustanovení X-inaktivace u myšního embrya. Pod časovou osou jsou znázorněny postupné změny, ke kterým dochází u chromosomu X během tohoto procesu. Adaptováno z literatury (Tollefsbol T., 2011).

V roce 2013 Engreitz a kol. vysvětlili, jak se *Xist* RNA šíří do distálních oblastí chromosomu X (Engreitz J.M. et al., 2013). Pro izolaci *Xist* RNA a asociované DNA použili novou metodu purifikace využívající antisense RNA (RAP). Takto identifikovali místa, kam se po indukci váže *Xist* RNA a zjistili, že nevyužívá sekvenční podobnost, ale oblasti, které jsou v prostoru blízko nově transkribované *Xist* RNA. Tyto oblasti nejsou bohaté na LINE1 elementy, které by měly hrát roli při šíření XCI (Lyon M.F., 1998), ale spíše se jedná o aktivní oblasti bohaté na geny, ze kterých se *Xist* RNA dále šíří do oblastí chudých na geny, obsahující i tyto repetitivní elementy (Simon M.D. et al., 2013). *Xist* RNA interaguje s chromatinem díky matrixovému proteinu hnRNPU (SAF-A) (Hasegawa Y. et al., 2010) a indukuje další represivní chromatinové modifikace a sbalení chromatinu vazbou proteinů (da Rocha S.T. et al., 2014), přičemž funguje jako lešení pro jejich organizaci (viz obr. 7).



Obr. 7: Model umlčení transkripce zprostředkovaného *Xist* RNA. Na protein hnRNPU (SAF-A) se váže *Xist* RNA fungující jako lešení, na které se vážou další proteiny indukující represivní modifikace chromatinu a jeho sbalení. Vazba PRC2 je nepřímá, zprostředkovaná jinými proteiny nebo modifikacemi chromatinu. Adaptováno z literatury (McHugh C.A. et al., 2015).

Proteiny přímo interagující s *Xist* RNA byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie po purifikaci komplexů RNA-protein ve dvou nedávných pracích (Chu C. et al., 2015;

McHugh C.A. et al., 2015), jež např. shodně objevily interakci s proteinem Spen/SHARP, který váže a aktivuje HDAC3. V rozporu s předchozí publikací (Zhao J. et al., 2008) nebyla potvrzena přímá interakce komponent komplexu PRC2 a *Xist* RNA. Dále bylo zjištěno, že během imprintované a náhodné inaktivace se na *Xist* RNA váže identická skupina proteinů, což podporuje představu, že tyto dvě formy inaktivace se liší pouze mechanismem výběru chromosomu X (Chu C. et al., 2015). Nedávno byla uvedena hypotéza, že při imprintované XCI hraje roli maternální imprint bránící inaktivaci X_m , kterým by mohla být modifikace H3K9me3 v protomotorové oblasti *Xist* (Fukuda A. et al., 2014).

Další práce (Vallot C. et al., 2013) identifikovala dlouhou nekódující RNA *XACT*, která je specificky exprimovaná u lidských pluripotentních kmenových (hPS) buněk, ale není přítomná u myši. *XACT* RNA pokrývá aktivní chromosom X a její exprese je spjata s počátkem reaktivace chromosomu X (Vallot C. et al., 2015). Je možné, že specificky pro člověka zprostředkovává mechanismus, kterým je v buňkách zabráněno inaktivaci obou chromosomů X. U myši tuto negativní regulaci zastává *Tsix* RNA (Lee J.T. a Lu N., 1999). Lidská *TSIX* RNA má významně nižší komplementaritu ke *XIST*, než myš *Tsix* ku *Xist*, takže její funkce coby antisense represoru byla často zpochybňována.

Ačkoli jsme se za 55 let od objevení X-inaktivace naučili hodně o tomto fenoménu, který je pokládán za paradigma epigenetické regulace (Lee J.T., 2011), dodnes jsou nalézány nové faktory a nové mechanismy. Na tomto místě je třeba zdůraznit, že velká část informací pochází z experimentů s myšimi buňkami, které se v oblasti X-inaktivace významně liší, ať už v množství unikajících genů, existenci imprintované X-inaktivace nebo úloze *Tsix* RNA. S objevem indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC) v roce 2006 (Takahashi K. a Yamanaka S., 2006) se otevřelo nové pole pro charakterizaci chromosomu X a XCI, protože umožňuje zkoumat změny, které probíhají během vývoje, reprogramování a pluripotence u lidských buněk bez etických problémů. Dosavadní znalosti o vlivu pluripotenčních faktorů na regulaci XCI a reaktivaci jsou přehledně popsány v literatuře (Galupa R. a Heard E., 2015).

1.2.3 Geny unikající inaktivaci chromosomu X

Inaktivace chromosomu X zajišťuje v rámci buňky monoalelickou expresi genů. Některé geny ale mohou do různé míry unikat inaktivaci a být exprimovány i u X_i . Unikající geny se často nacházejí v klastrech a u člověka jsou koncentrovány především na krátkém raménku v XAR (X added region), evolučně mladší části chromosomu X. Některé z nich jsou součástí tzv. X-

Y párů, tzn. že mají na chromosomu Y svůj paralog, který má stejnou funkci nebo u něj došlo k vývoji specifické funkce, často související s vývojem varlat. Většina unikajících genů ale buď nemá paralog, nebo se vyvinul v pseudogen, což vede k celkově vyšší expresi u žen. Ve srovnání s Xa je ale míra exprese u Xi nižší a pohybuje se v širokém rozmezí do ~70 % Xa (gen *P2RY8* v *PAR1*), což ukazuje, že ani geny v pseudoautosomálních oblastech nejsou schopny dosáhnout stejné exprese (Cotton A.M. et al., 2013). To může být způsobeno blízkostí inaktivního chromatinu nebo selektivní upregulací alely na Xa (Heard E. a Disteché C.M., 2006).

Při ustanovení X-inaktivace jsou oblasti s unikajícími geny schopné vytvořit smyčku a přitom neporušit šíření *Xist* RNA (Engreitz J.M. et al., 2013). Nadále pak postrádají přítomnost *Xist* RNA a represivních chromatinových modifikací. Další analýzy chromatinu také naznačují, že spolu domény s unikajícími geny mohou interagovat (Splinter E. et al., 2011) a jsou chráněny izolátorovými elementy, na které se váže protein CTCF (Filippova G.N. et al., 2005). Oblasti s klastry unikajících genů se shodují s topologicky asociovanými doménami (TAD) (Marks H. et al., 2015; Giorgetti L. et al., 2016).

Ve srovnání s myší, kde inaktivaci uniká 3-6 % genů (Yang F. et al., 2010; Wu H. et al., 2015), se u člověka nachází výrazně vyšší množství genů odolávajících inaktivaci. Zhruba 15 % genů je konzistentně exprimováno jak z Xa, tak z Xi, a dalších ~10 % genů pak uniká inaktivaci variabilně (Carrel L. a Willard H. F., 2005). Identifikace unikajících genů byla v tomto případě provedena s využitím hybridních buněčných linií, ve kterých je možné oddělit Xi od Xa a následně zkoumat expresi u Xi. Seznam takto nalezených unikajících genů byl potvrzen nebo rozšířen analýzou alelicky specifické exprese. U lymfoblastoidních buněčných linií bylo zjištěno, že inaktivaci uniká 13 % genů a velká část genů (~29 %) uniká inaktivaci jen u určité skupiny žen, a to s velmi širokým rozmezím exprese (Cotton A.M. et al., 2013), což je další faktor přispívající k fenotypovým rozdílům (Peeters S.B. et al., 2014). Jak bylo zjištěno na základě analýzy metylace DNA u jednovaječných dvojčat, v tomto variabilnímu úniku hraje roli genetická komponenta (Cotton A.M. et al., 2015).

Pro odhalení unikajících genů se také používá nepřímý přístup hodnocení epigenetických modifikací v dané oblasti. Takto byly identifikovány unikající geny na základě významně vyšší úrovně intragenové nonCpG metylace (Lister R. et al., 2013) a chybějící metylace v CpG ostrůvcích v promotorových oblastech (Cotton A.M. et al., 2011; Sharp A.J. et al., 2011). Další úroveň variability úniku byla pozorovaná u různých typů tkání. Napříč 27 typy tkání byl konzistentní stav metylace pozorován u 71 % genů, z nichž 9 % uniká a 62 % je

stabilně inaktivováno (Cotton A.M. et al., 2015). Možným nedostatkem těchto analýz je, že nerozlišují 5-metylcytosin a 5-hydroxymetylcytosin, který je významně obohacen např. v mozku (Jin S.G. et al., 2011) a je známkou probíhající aktivní demethylace závislé na enzymu Tet2. Exprese u Xi se může měnit v čase, některé geny se mohou totiž během vývoje a stárnutí organismu reaktivovat (Berletch J.B. et al., 2011).

Abnormální fenotyp u jedinců s aneuploidií pohlavních chromosomů (např. 45,X0; 47,XXY; 47,XXX) je zčásti způsoben právě abnormální hladinou exprese unikajících genů (Prothero K.E. et al., 2009). U žen s Turnerovým syndromem dochází k dysgenezi vaječnicků a řadě fyzických abnormalit. Malá postava se dává do souvislosti s haploinsuficiencí genu *SHOX* v PAR, který kóduje transkripční faktor, a vysoká úmrtnost (> 90 %) embryí s karyotypem 45,X0 *in utero* souvisí s nižší expresí genů důležitých pro vývoj placenty (Berletch J.B. et al., 2011). V kontrastu s tím myši s karyotypem 45,X0 mají zřejmě normální fenotyp.

1.2.4 Zešíkmení inaktivace chromosomu X

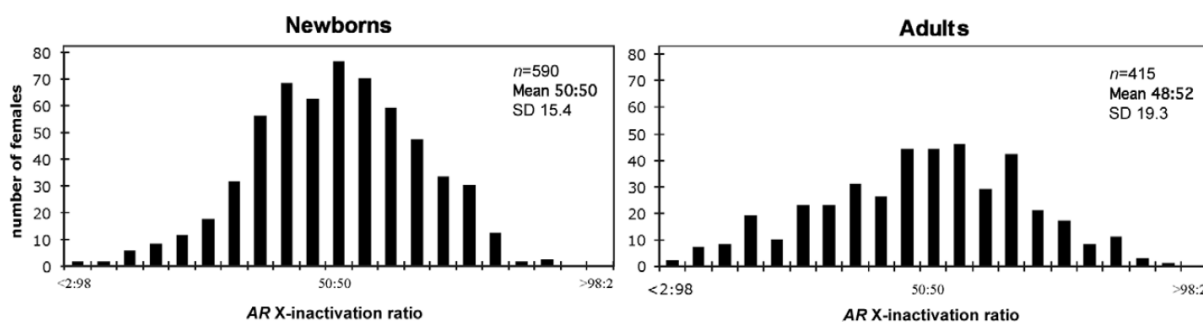
Po ustanovení inaktivace přechází Xi do tzv. udržovací fáze, ve které je stejný chromosom X stabilně propagován jako inaktivní při následném dělení buňky po zbytek života daného jednovlivce. Umlčený stav Xi je udržován díky epigenetické regulaci. Na základě toho jsou ženy mozaikou dvou buněčných populací s aktivním paternálním nebo maternálním chromosomem X (Migeon B.R., 2014). Poměr těchto dvou populací je většinou vyvážený, ale u některých žen se může výrazně odlišovat od průměrného poměru 50:50 a tomuto jevu se v angličtině říká „X-inactivation skewing“. V češtině není ustálený překlad tohoto termínu a v této práci bude dále používán termín „zešíkmení“ X-inaktivace. Informace v literatuře se při řešení, co je významná odchylka od průměrného poměru XCI, velmi liší. Hranice je umělá a v závislosti na uvážení autorů se může pohybovat v širokém rozmezí od 70:30 do 90:10 (Migeon B.R., 2014).

Ke vzniku výrazného zešíkmení mohou přispívat různé faktory. Vrozené zešíkmení XCI bylo pozorováno u hybridních myší, u nichž byl výběr chromosomu X ovlivněn alelami *Xce* (X-controlling element), oblasti překrývající se s *Xic* (Clerc P. a Avner P., 2006). K extrémnímu zešíkmení může vést také mutace v promotoru genu *XIST* (Plenge R.M. et al., 1997). Nicméně, genetické odlišnosti, které ovlivňují průběh inaktivace a tudíž poměr XCI, jsou velmi vzácné. Zešíkmení XCI obecně není dědičné a stochastické odchylky jsou častější příčinou primárního zešíkmení (Bolduc V. et al., 2008).

Kromě něj existuje i tzv. sekundární zešíkmení, ke kterému dochází v průběhu života jedince

(i prenatalně) a je způsobeno mutacemi v genech, které ovlivňují kondici a rychlost proliferace buněk (Minks J. et al., 2008). Vysoký poměr XCI se typicky vyskytuje například u žen s balancovanou translokací mezi chromosomem X a autosomem, kde dochází k selekci buněk s inaktivovaným normálním chromosomem X.

V rámci projektu, ve kterém byl analyzován poměr XCI u DNA získané z periferní nebo pupečnickové krve u 1005 zdravých žen (Amos-Landgraf J.M. et al., 2006), bylo zjištěno, že se výrazné zešíkmení XCI (>80:20) nachází u 4,9 % novorozenců a 14,2 % dospělých žen (viz obr. 8).



Obr. 8: Distribuce poměru XCI u novorozenců a zdravých dospělých žen má podobu Gaussovy křivky se středem v hodnotě zhruba 50:50. Pro měření byla použita metoda HUMARA (Allen R.C. et al., 1992) a poměr je vyjádřen jako poměr kratší a delší alely. Adaptováno z literatury (Amos-Landgraf J.M. et al., 2006).

Tento výsledek je v souladu s předchozími studiemi (Busque L. et al., 1996; Sharp A. et al., 2000; Hatakeyama C. et al., 2004; Busque L. et al., 2009) a může odrážet náhodné fluktuace v populaci hematopoetických buněk během času a pokles v počtu progenitorových buněk. Druhou možností je, že dochází k selekci buněk. S věkem spojené zešíkmení může být indikátorem klonální expanze v kostní dřeni i u zdravých žen (Busque L. et al., 2012). Progresivní zešíkmení XCI nemusí být lineární (Sandovici I. et al., 2004) a udává se jako jedna z možných příčin častějších autoimunitních onemocnění u žen (Invernizzi P. et al., 2008; Libert C. et al., 2010), přičemž negativní účinek spočívá v úniku před tolerizací nebo odhalení efektu mutací. K tomuto jevu může docházet také např. u sideroblastické anémie nebo deficitu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PD). Mossner a kol. (Mossner M. et al., 2013) uvedli hypotézu, podle které progresivní zešíkmení XCI u hematopoetických buněk předchází vývoji hematologických onemocnění s vysokou incidencí v pozdním věku, jako je myelodysplastický syndrom. Asociace mezi dlouhověkostí a úrovní zešíkmení je sporná (Gentilini D. et al., 2012; Mengel-From J. et al., 2012).

U zdravých žen nemusí mít poměr XCI žádný klinický význam, ale vysoké zešíkmení může být ukazatelem přítomnosti heterozygotní mutace na chromosomu X. Amos-Landgraf a kol. konstatovali, že obzvláště u novorozenců je vysoké zešíkmení ($\geq 90:10$) tak málo

pravděpodobné, že si zasluhuje podrobnější zkoumání (Amos-Landgraf J.M. et al., 2006).

1.2.5 Poměr XCI a mosaicismus v různých tkáních

Po ustanovení náhodné inaktivace dochází k vývoji tkání, které pocházejí z různého počtu progenitorových buněk, což vede ke vzniku různých vzorů mosaicismu. Tento proces může vést k velmi výrazným rozdílům v distribuci, jak bylo např. demonstrováno u pravé a levé hemisféry myšího mozku (Wu H. et al., 2015). Mosaicismus exprese pak může mít významný dopad na fenotyp.

Poměr inaktivace chromosomu X se nejčastěji díky snadné dostupnosti měří u DNA izolované z bílých krvinek. U onemocnění ovlivňujících hematopoesu je analýza krevních buněk relevantní. U studií ostatních onemocnění se často *bona fide* předpokládá, že poměr XCI stanovený v krvi zhruba odpovídá i ostatním tkáním, které jsou pro porozumění patologie onemocnění důležitější, ale nejsou pro výzkum dostupné. Existuje pouze omezený počet studií, které ukazují nakolik poměry XCI v různých tkáních korelují. Průměrná směrodatná odchylka poměrů XCI napříč tkáněmi různých osob se pohybuje v rozmezí 7,2 % až 10,7 % (Pegoraro E. et al., 2003; Bittel D.C. et al., 2008; Minks J., 2007). U buněk s vyšší mitotickou aktivitou může být v důsledku i velmi mírných selekčních tlaků nalezeno vyšší zešíkmení než u buněk s nižší aktivitou. Z tohoto důvodu by poměry XCI měly být stanovovány v nekultivovaných buňkách (Orstavik K.H., 2009). Za určitých speciálních podmínek se v krvi (resp. u specifické buněčné linie) může vyskytovat extrémní zešíkmení, které ale není přítomné v ostatních tkáních a souvisí se selekcí buněk, např. u žen heterozygotních pro Brutonovu agamaglobulinémii (gen *BTK*), X-vázaný těžký kombinovaný imunodeficit (gen *IL2RG*) nebo Fanconiho anémii typu B (gen *FANCB*) (Meetei A.R. et al., 2004; Holden S.T. et al., 2006; Puck J.M. et al., 1992).

Pokud je to možné, je vhodné analýzy XCI v krvi doplňovat i o výsledky u jiných snadno dostupných tkání, např. močových buněk, vlasových cibulek nebo bukálních stěrů. U poměru XCI stanoveného v bukálních stěrech bylo demonstrováno, že je spolehlivým ukazatelem poměru ve špatně dostupných tkání (De Hoon B. et al., 2015).

Mosaicismus XCI je přímo pozorovatelný jako důsledek mutací jen u omezeného počtu genů. U onemocnění *incontinentia pigmenti*, které je způsobeno mutacemi v genu pro NF-κB esenciální modulátor (*NEMO/IKBKG*), vznikají v souvislosti s mosaicismem XCI na kůži charakteristické vírovité struktury hyperpigmentace, které sledují tzv. Blashkovy linie. Podobně mutace v genu pro ektodysplasin A (*EDA*) vedou ke vzniku oblastí bez potních žláz

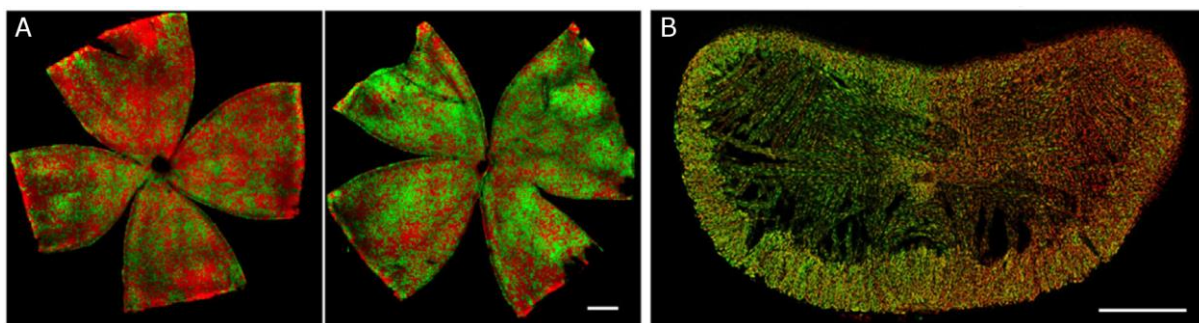
(Sun B.K. a Tsao H., 2008; Lexner M.O. et al., 2008).

Velikost jednotlivých okrsků s aktivním X_m/X_p je dle předpokladu u většiny tkání menší než 1 mm^3 , ale v současné době neexistuje univerzální technika, která by umožnila měřit velikost těchto oblastí v tkáních zdravých žen. De Hoon a kol. demonstrovali na základě měření poměru XCI metylačními metodami, že vzorek jater, svalů, mozku nebo vaječníku o velikosti 1 mm^3 je dostatečný pro měření XCI a výsledek není zkreslen velikostí okrsků mosaiky (De Hoon B. et al., 2015). Ve speciálních případech byly u žen heterozygotních pro X-vázaná onemocnění využity histochemické techniky, které zviditelnily velikost okrsků u vybraných tkání, jako jsou játra (Ricciuti F.C. et al., 1976), mozek (Willemsen R. et al., 2002), tlusté střevo a prsní tkáň (Novelli M. et al., 2003) aj. V kontrastu s předchozími výsledky bylo odhadnuto, že by se u štítné žlázy zdravých žen měly nacházet markantně větší okrsky o velikosti $48\text{-}128 \text{ mm}^2$ (Jovanovic L. et al., 2003) a u urotelu močového měchýře o velikosti 120 mm^2 (Tsai Y.C. et al., 1995). Velikost okrsků je tudíž další úrovní variability XCI u žen. Příspěvek mosaicismu XCI k rozmanitosti klinické prezentace X-vázaných onemocnění je nejčastěji studován na myším modelu (Shiojiri N. et al., 1997; Douvaras P. et al., 2012; Sikora J. et al., 2016).

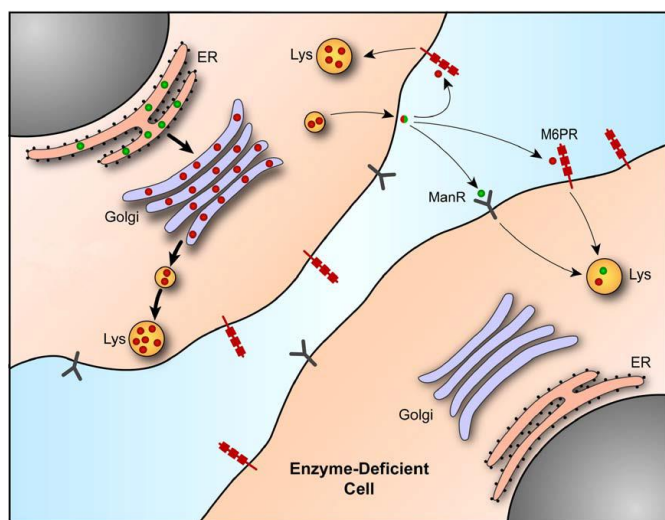
Získání nových informací o X-inaktivaci, které se v poslední době objevily, bylo umožněno vznikem celé řady nových metod (Engreitz JM et al., 2013; Chu C. et al., 2015; McHugh C.A. et al., 2015). Nicméně, nedávný článek popsal velmi jednoduchou, ale elegantní techniku, která pomáhá studovat mosaicismus XCI v různých typech tkání s rozlišením jednotlivých buněk. Wu a kol. (Wu H. et al., 2014) vyvinuli myší linie, u kterých jsou *Cre*-indukovatelné fluorescenční reportéry (GFP a tdTomato) integrovány do oblasti *Hprt1*, která podléhá inaktivaci chromosomu X. Díky tomuto systému bylo možné vytvořit tzv. mapy X-inaktivace, protože každá buňka (resp. její jádro) emitovala zelené nebo červené světlo v závislosti na tom, který z chromosomů X byl aktivní. Při použití různých *Cre* driverů bylo navíc možné selektivně pozorovat určité typy tkání bez rušení okolními vlivy (gen *Cre* byl umístěn za tkánově specifickým promotorem). Autoři provedli kvantitativní analýzu mosaicismu XCI u čípků sítnice a u vláskových buněk Cortiho orgánů, přičemž často pozorovali nehomogenitu, jak v rámci jednoho orgánu, tak mezi levým a pravým orgánem (viz obr. 9).

Také pozorovali efekt mosaicismu XCI u myšího modelu Norrieho choroby (mutace v genu *Ndp*). U heterozygotních žen s touto chorobou existuje velmi variabilní manifestace a autoři zjistili, že u heterozygotních myší oblastí s X_a nesoucím alelu Ndp^+ přesně doplňují oblasti, kde dochází k defektu v cévním zásobení sítnice. Norrin (sekretovaný regulační protein) tudíž

difunduje velice omezeně a nedochází ke kompenzaci v oblastech s Xa nesoucím alelu *Ndp*⁻. Korelace mosaicismu XCI s defekty na úrovni buněk takto pomáhá odhalit faktory ovlivňující klinický fenotyp.



Obr. 9: Ukázka variace mosaicismu XCI v různých tkáních. (A) Levá a pravá sítnice získaná od jedné dospělé myši (stádium P30). (B) Příčný řez jazykem myši (stádium P3). Měřítko: 500 μ m. Adaptováno z literatury (Wu H. et al., 2014).



Obr. 10: Transport lysosomálních enzymů a kooperace buněk. Nascenční enzym je v ER glykosylován (zelená kolečka), v Golgiho aparátu pak získává modifikaci manosa-6-fosfátem (červená kolečka) a váže se na M6PR receptor. Většina enzymu je transportována do lysosomu (tlustá šipka) a malá část (~10 %) je sekretována ven z buňky (tenká šipka). Extracelulární fosforylovaný nebo nefosforylovaný enzym se může vázat na plazmatické membráně na M6PR nebo u retikuloendotelového systému na manosový receptor (ManR). Oba receptory zprostředkovávají endocytosu a transport exogenních enzymů do lysosomu. Touto cestou se může enzym dostat do deficitních buněk. Adaptováno z literatury (Sands M.S. a Davidson B.L., 2006).

Vlastnosti genových produktů jsou různé, může se jednat o autonomní nebo sekretované proteiny, které jsou buňky do různé míry schopné sdílet. Fuller a kol. (Fuller M. et al., 2015) vytvořili smícháním fibroblastů získaných od hemizygotů a kontrol v poměru 1:1 umělý buněčný model Fabryho choroby a MPS II v heterozygotním stavu a u těchto systémů zkoumali vlastnosti GLA a I2S, lysosomálních solubilních enzymů, které jsou transportovány do lysosomu přes M6PR receptory a mohou pro vstup do buňky využívat receptory zprostředkovanou endocytózu (viz obr. 10). Enzym I2S měl v kontrolních buňkách srovnatelnou koncentraci s GLA, ale v médiu se nacházel v 10x vyšším množství než GLA. Zatímco u MPS II heterozygotního systému bylo střádání srovnatelné s kontrolou, malé množství sekretovaného enzymu GLA nebylo schopno redukovat střádání v deficitních fibroblastech. Tento efekt (slabé nebo silné metabolické kooperace) je jedním z vysvětlení rozdílů mezi X-vázanými nemocemi a osvětluje, proč u MPS II jsou asymptomatické

heterozygotní ženy normou, zatímco u Fabryho choroby spíše výjimkou.

Na základě svých výsledků a zkušeností Wu a kol. (Wu H. et al., 2014) shrnuli, že mosaika XCI je ovlivněna počtem zakládajících buněk a migrací buněk během vývoje. Mosaicismus XCI může generovat funkční diverzitu, která je náhodná a specifická pro každého jednotlivce. U tkání a orgánů jakou jsou játra, ledviny a plíce, u nichž velká část buněk vykonává stejnou funkci, nemusí hrát nehomogenita roli, spíše je důležitý celkový poměr $Xa(\text{mut}):Xa(\text{WT})$, tedy hranice, za kterou dochází k dysfunkci. Tato hranice je závislá na onemocnění a typu tkáně. U tkání jako je Cortiho orgán, nebo sítnice hraje topografie XCI mnohem větší roli. Klinická pozorování jsou s touto myšlenkou v souladu, např. ženy s X-vázaným onemocněním retinitis pigmentosa trpí variabilně ztrátou zraku (Grover S. et al., 2000).

1.2.6 X-vázaná onemocnění

Hemizygozita týkající se téměř všech X-vázaných genů vede u mužů k expozici fenotypu a charakteristickému vzorci dědičnosti, který usnadnil odhalení velkého množství onemocnění asociovaných s chromosomem X. X-vázaná onemocnění byla tradičně klasifikována jako recesivní nebo dominantní, nicméně u velké části onemocnění je penetrance u žen velmi variabilní, proto bylo navrženo od tohoto dichotomického rozdělení upustit (Dobyns W.B. et al., 2004). Také existuje podskupina X-vázaných dominantních onemocnění (zahrnující např. Rettův syndrom a incontinentia pigmenti) charakterizovaná letalitou nebo sníženou viabilitou u hemizygotů (Franco B. a Ballabio A., 2006; Morleo M. a Franco B., 2008).

U žen je manifestace mutací v X-vázaných genech velmi různorodá a souvisí se zešíkmením XCI a únikem z XCI (Migeon B.R., 2014). Dalšími faktory, které zvyšují diverzitu fenotypu, jsou s věkem spojená reaktivace chromosomu X pozorovaná u neurologických poruch a rakoviny (Spatz A. et al., 2004; Deng X. et al., 2014) a distribuce mosaicismu XCI v tkáních (Wu H. et al., 2014). Jedním z příkladů vyšší variability u žen jsou např. větší rozdíly v sociální interakci a verbálních schopnostech u jednovaječných dvojčat ženského pohlaví oproti mužskému pohlaví (Loat C.S. et al., 2004), ale také rozdíly v expresi X-vázaných onemocnění mezi jednovaječnými dvojčaty (Richards C.S. et al., 1990; Redonnet-Vernhet I. et al., 1996; Valleix S. et al., 2002; Bennett C.M. et al., 2008; De Gregorio L. et al., 2005).

Kromě genů důležitých pro reprodukci je savčí chromosom X bohatý na geny související s neurologickou funkcí a X-vázané geny jsou v mozku vysoce exprimované (Nguyen D.K. a Disteche C.M., 2006). Mutace v X-vázaných genech jsou příčinou poruchy intelektu (ID) u 5-10 % pacientů mužského pohlaví. Dodnes bylo identifikováno více než 100 kauzálních genů

na chromosomu X (Tzschach A. et al., 2015; Deng X. et al., 2014; Philips A.K. et al., 2014; Hu H. et al., 2016), včetně nově objevené asociace u genu *TAF1* (O'Rawe J.A. et al., 2015). S výjimkou syndromu fragilního chromosomu X, který je příčinou asi 25 % X-vázaných poruch intelektu (XLID), jsou jednotlivé XLID geny zodpovědné pouze za malé procento případů, což znesnadňuje rutinní testování. V jedné studii (Fieremans N. et al., 2016), která se soustředila na ženy s ID, se ukázalo, že vysoké zešíkmení XCI je dobrý indikátor XLID a kauzální varianta na chromosomu X byla nalezena u 6 z 18 žen.

Efekt mosaicismu XCI může být u různých neurologických onemocnění různý. Zatímco ženy nesoucí heterozygotně mutaci v genu *HPRT1* většinou nemají potíže, ženy s heterozygotní mutací v *MECP2* mají vážné neurologické problémy (Chahrour M. a Zoghbi H.Y., 2007). Poměr XCI je stanovován a dáván do souvislosti s projevy u řady onemocnění (viz tab. 1).

Tab. 1: Příklady X-vázaných onemocnění a odkazy na literaturu.

Onemocnění	OMIM #	Gen	Literatura
Duchennova muskulární dystrofie	310200	<i>DMD</i>	Juan-Mateu J. et al., 2012 Giliberto F. et al., 2014 Viggiano E. et al., 2016
X-vázaná hyperamonémie	311250	<i>OTC</i>	Yorifuji T. et al., 1998 Grünert S.C. et al., 2013
Wiskott-Aldrichův syndrom	301000	<i>WAS</i>	Andreu N. et al., 2003 Daza-Cajigal V. et al., 2013 Boonyawat B. et al., 2013
Sideroblastická anémie	300751	<i>ALAS2</i>	Cazzola M. et al., 2000 Aivado M. et al., 2006
Menkesova choroba	309400	<i>ATP7A</i>	Desai V. et al., 2011
Lesch-Nyhanův syndrom / Kelley-Seegmillerův syndrom	300322 300323	<i>HPRT1</i>	De Gregorio L. et al., 2000 De Gregorio L. et al., 2005 Sebesta I. et al., 2008
Hemofilie typu B	306900	<i>F9</i>	Okumura K. et al., 2008 Esquilin J.M. et al., 2012 Di Michele D.M. et al., 2014
Syndrom fragilního chromosomu X	300624	<i>FMRI</i>	Huang W. et al., 2014
X-vázaná hemolytická anémie	300908	<i>G6PD</i>	Manco L. et al., 2011
Incontinentia pigmenti	308300	<i>NEMO</i>	Migeon B.R. et al., 2014
X-adrenoleukodystrofie	300100	<i>ABCD1</i>	Maier E.M. et al., 2002 Wang Z. et al., 2013 Engelen M. et al., 2013
Rettův syndrom	312750	<i>MECP2</i>	Huppke P. et al., 2006 Archer H. et al., 2007 Zahorakova D. et al., 2016
Hemofilie typu A	306700	<i>F8</i>	Favier R. et al., 2000 Bicocchi M.P. et al., 2005 Renault N.K. et al., 2007 Pavlova A. et al., 2009 Miyawaki Y. et al., 2010
a jiné			Cho S.Y. et al., 2013 Orstavik K.H. et al., 1998

Z lysosomálních střeďavých onemocnění je na chromosom X vázána Fabryho choroba, mukopolysacharidosa typu II a Danonova choroba (Pinto L.L. et al., 2010). Narozdíl od předchozích dvou Danonova choroba (OMIM #300257) není zapříčiněna mutacemi v hydrolytickém enzymu, ale v membránovém proteinu LAMP2, který není buňkami sdílen. Fabryho choroba (OMIM #301500) je způsobena deficitem lysosomální hydrolasy, α -galaktosidasy A (GLA, EC 3.2.1.22), která je zodpovědná za odštěpování terminální α -galaktosylových skupin z glykosfingolipidů. V důsledku toho dochází k akumulaci částečně degradovaných glykosfingolipidů (převážně globotriaosylceramidu, GL-3) v lysosomech, hlavně u vaskuloendoteliálního systému. Klasická forma se u hemizygotů projevuje v dětství akroparestézií, angiokeratomy a korneální dystrofií. V dalších desetiletích pozvolna progreduje kardiovaskulární, renální a cerebrovaskulární onemocnění, což vede k předčasné smrti ve čtvrté nebo páté dekádě života. U některých pacientů může dojít k pozdějšímu nástupu a symptomy, které postihují srdce a/nebo ledviny, se často objeví až v pozdní dospělosti. Dříve byly heterozygotní ženy popisovány jako asymptomatické přenašečky, podobně jako je tomu u MPS II, ale nyní je zřejmé, že takové ženy jsou spíše výjimkou a většina trpí významným multisystémovým postižením, ačkoli se manifestuje později než u mužů (Wang R. Y. et al., 2007). Přes určité dispute v literatuře (Morrone A. et al., 2003; Dobrovolný R. et al., 2005; Maier E.M. et al., 2006; Elstein D. et al., 2012; Echevarria L. et al., 2016) jsou fenotypové projevy u žen kromě stáří a typu mutace významně ovlivněny poměrem XCI, který koreluje s aktivitou GLA. Mosaicismus XCI (resp. inkluzí GL-3) koreluje s poškozením podocytů, u nichž nebyla pozorována žádná metabolická kooperace (Mauer M. et al., 2014).

Mukopolysacharidosa typu II (MPS II, Hunterův syndrom, OMIM #309900) je způsobena 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 střeďání glykosaminoglykanů (GAG) v mnoha tkáních a orgánech. V moči pacientů je zvýšená koncentrace GAG. MPS II je progresivní multisystémové postižení, které se mimo jiné projevuje hepatosplenomegalií, dysostosis multiplex, poruchami sluchu, makrocefalií, makroglosií, kardiomegalií a mentální retardací. Situace u heterozygotních žen je v porovnání s Fabryho chorobou dramaticky odlišná, protože klinická manifestace MPS II u žen je velmi vzácná (viz diskuze u výsledků). Změny u chromosomu X jsou dávány do souvislosti také s vývojem rakoviny. Při výzkumu genomu u rakovinných tkání bylo zjištěno, že inaktivní chromosom X akumuluje více mutací

než autosomy (Jager N. et al., 2013), což naznačuje zhoršenou schopnost reparovat poškození. Jestliže by se takový chromosom X aktivoval, mohl by významně přispět progresi rakoviny. Studie Yildirim a kol. ukázala, že ztráta *Xist* RNA, která donedávna byla považována za postradatelnou při udržování inaktivovaného stavu (Csankovszki G. et al., 1999), vede k vývoji rakoviny u myších samiček (Yildirim E. et al., 2013). Autoři provedli *in vivo* knockout genu *Xist* v hematopoetických kmenových buňkách poté, co proběhla náhodná X-inaktivace, a to vedlo k plně penetrantní, letální formě rakoviny. U člověka existuje zatím pouze omezený počet informací o možné reaktivaci Xi u rakovinných tkání (Chaligné R. a Heard E., 2014).

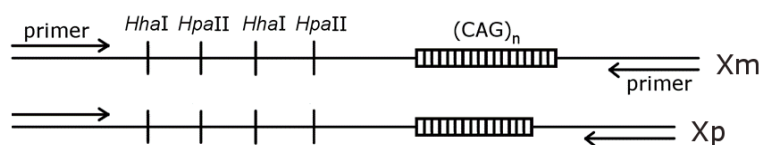
Další studie ukázala, že ztráta *XIST* RNA u lidských iPSC buněk je asociována se zvýšenou expresí X-vázaných onkogenů (Anguera M.C. et al., 2012), což naznačuje zvýšené riziko kancerogeneze u ženských kmenových buněk. Zatímco některé výzkumné skupiny objevily v iPSC buňkách reaktivaci chromosomu X, jiné nikoli (přehledně v Briggs S.F a Reijo Pera R.A., 2014), a doposud nebyla publikována studie, ve které by autoři byli schopni status XCI řídit, ačkoli je známý vliv kultivačních podmínek (Tomoda K. et al., 2012). Tyto výsledky ukazují, že před použitím těchto typů buněk v klinické praxi je třeba je pečlivě charakterizovat a dokumentovat jejich vlastnosti. Ovlivnění poměru XCI by mohlo být potenciálně využitelné při léčbě X-vázaných monogenních onemocnění.

1.2.7 Metody stanovení poměru XCI

Z historického pohledu existovala řada metod pro detekci zešíkmení X-inaktivace, které byly často také využívány pro určení monoklonálního původu nádorových tkání (Chen G.L. a Prchal J.T., 2007). Jednou z prvních byla metoda, která využívala různé elektroforetické pohyblivosti isoenzymů glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PD) A a B (Beutler E. et al., 1967). Také vznikla metoda, která rozlišovala Xi a Xa na základě různého času replikace a využívala značení pomocí 5-bromo-2'-deoxyuridinu (BrdU). Tato cytogenetická metoda byla použitelná pouze v případě, že byly chromosomy X strukturně odlišitelné (Perry P. a Wolff S., 1974). Další metoda byla omezena na lidské buňky schopné fúzovat s HPRT⁻ křeččími (popř. myšími) buňkami. Po fúzi byly selektovány hybridní buňky produkující HPRT, a tudíž nesoucí aktivní chromosom X. Ostatní lidské chromosomy byly ztraceny, protože nebyly pod selekčním tlakem. Za pomoci DNA sond byl určen poměr hybridů obsahujících chromosom Xa maternálního nebo paternálního původu (Puck J. M. et al., 1987). Tato metoda byla laboratorně, finančně a časově náročná, ale posloužila pro validaci prvních metod založených

na metylaci DNA.

Metody používané v současné době pro stanovení poměru XCI jsou nepřímé a rozlišují chromosom X_m a X_p na základě jednonukleotidových polymorfismů (SNP) nebo více informativních krátkých tandemových repetitiv (STR). X_a pak může být od X_i odlišen díky rozdílům v metylaci CpG ostrůvku v promotorové oblasti genu nebo rozdílům v expresi genu. Zdaleka nejvíce uplatňovanou metodou založenou na metylaci DNA je metoda HUMARA (Allen R.C. et al., 1992), která využívá vysoce polymorfní tandemovou repetici (CAG)_n v prvním exonu genu pro androgenní receptor (AR). V blízkosti repetice se nachází několik rozpoznávacích míst pro metylačně senzitivní restriktivní endonukleasy, která jsou u X_i metylovaná (obr. 11).



Obr. 11: Schéma oblasti na začátku genu AR využívané metodou HUMARA. Po štěpení DNA pomocí enzymu *HpaII* nebo *HhaI* je za předpokladu, že došlo ke kompletnímu štěpení nemetylované DNA, amplifikovaná pouze DNA z X_i. Porovnáním velikosti píků jednotlivých alel u štěpené a neštěpené DNA se stanoví poměr XCI.

Oblast genu AR byla také použita pro návrh metody AR-MSP (Kubota T. et al., 1999), která odstranila krok enzymového štěpení. AR-MSP zahrnuje metylačně specifické PCR (MSP) po chemické modifikaci DNA hydrogensířičitanem sodným, při které dochází ke konverzi nemetylovaných cytosinů na uracil, zatímco metylované cytosiny zůstávají netknuty. U nemodifikované DNA nedochází k amplifikaci. AR-MSP má oproti metodě HUMARA výhodu, že stanovuje poměr XCI nejen na základě X_i, ale i komplementární poměr u X_a, čímž se výsledek zpřesňuje. Běžně se avšak AR-MSP nevyužívá, mimo jiné proto, že při konverzi dochází ke ztrátě a degradaci materiálu (Pelizzola M. a Ecker J.R., 2011).

Metoda HUMARA je validovaná a vhodná pro rutinní analýzu, ale nemůže být použita u všech pacientek. Na základě polymorfismu v genu AR je metoda využitelná u zhruba 80 % žen (Amos-Landgraf J.M. et al., 2006). V minulosti bylo navrženo několik metod na obdobném principu jako metoda HUMARA, ale jejich použití je velmi omezené, hlavně proto, že nejsou tak jednoduché, robustní a vysoce informativní jako metoda HUMARA. Souhrn těchto metod a komentáře k možným problémům lze nalézt v následující tabulce (tab. 2), lokalizace oblastí na obr. 12.

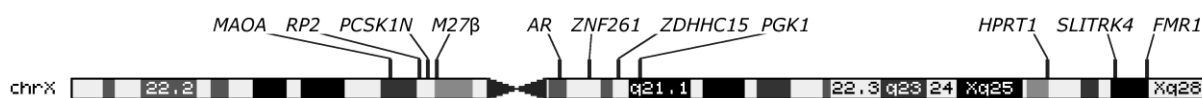
Řada metod vzniklých v posledních letech je nevýhodně založena na amplifikaci dinukleotidových repetitiv, které jsou náchylné ke vzniku vysokých tzv. stutter píků, což komplikuje odečet dat. Stutter píky vznikají kvůli tendenci *Taq* polymerasy sklouznout při *in vitro*

replikaci po řetězci DNA, čímž vznikají i produkty kratší než je pravá alela. U STR s delší jednotkou repetice je ale množství stutter piků menší (<http://www.cstl.nist.gov/strbase/>).

Tab. 2: Metody založené na metylaci DNA.

Lokus	Polymorfismus	Heterozygotita*	Komentář	Citace
<i>HPRT</i>	RFLP	20-30 %	méně informativní, Southern blot	Vogelstein B. et al., 1987
<i>PGK1</i>	RFLP	30 %	méně informativní	Singer-Sam J. et al., 1990 Gilliland D.G. et al., 1991
<i>DXS255 (M27β)</i>	VNTR	90 %	nekonzistentní metylace, Southern blot	Boyd Y., Fraser, 1990
<i>MAOA</i>	STR (GT), VNTR	75 %	enzymový krok navíc	Hendriks R.W. et al., 1992
<i>AR</i>	STR (CAG)	90 %	viz dále	Allen R.C. et al., 1992
<i>FMR1</i>	STR (CGG)	45-65 %	nehomogenní amplifikace alel	Lee S.T. et al., 1994 Carrel L. a Willard H.F., 1996
<i>ZNF261</i>	STR (TC)	90 %	vyšší množství tzv. stutter produktů	Beever C. et al., 2003
<i>ZDHHC15</i>	STR (AC)	60 %	vyšší množství tzv. stutter produktů	Bertelsen B. et al., 2011
<i>SLITRK4</i>	STR (AC)	80 %	vyšší množství tzv. stutter produktů	Bertelsen B. et al., 2011
<i>PCSK1N</i>	STR (CA, AG)	75 %	vyšší množství tzv. stutter produktů	Bertelsen B. et al., 2011
<i>RP2</i>	STR (GAAA)	80 %	při kombinaci s <i>AR</i> potřeba vynechat pomocný enzym	Machado F.B. et al., 2014

*U metod založených na STR oblastech jsou započítány i vzorky s rozdílem v délce produktů o jedné repetici. Při započítání pouze vzorků odlišených o dvě a více repetice se např. u *AR* zmenší množství informativních vzorků z 92 % na 79 % (analýza u 1005 žen v Amos-Landgraf J.M. et al., 2006).



Obr. 12: Pozice oblastí (genů), které byly použity pro vývoj metod pro stanovení poměru XCI (schéma adaptováno z UCSC Genome Browser a upraveno).

Ačkoli jsou metody založené na metylaci DNA oblíbené a prověřené časem, jsou semikvantitativní a nepřímé. Methylace DNA v jednotlivých CpG dinukleotidech může být také spojena s jinými faktory než je inaktivní stav chromosomu. Z tohoto pohledu by stanovení poměru XCI na základě genové exprese mohlo lépe aproximovat skutečný poměr XCI (Kutsche et al., 2000), avšak metody založené na metylaci zůstávají mnohem častěji používané díky snadné dostupnosti a větší stabilitě vzorků DNA oproti vzorkům RNA.

Mezi používané transkripční metody pro stanovení poměru XCI patří např. metoda detekující polymorfismus *HinfI* v exonu 6 genu *XIST* (Rupert J.L. et al., 1995; Amos-Landgraf J.M. et al., 2006), analýza produktů PCR amplifikovaných z exonu 1 genu *AR* pomocí kapilární elektroforézy nebo tzv. supresivní RT-PCR s alelicky specifickými primery identifikujícími SNP v oblastech vybraných genů a detekce produktů pomocí SYBR Green nebo Taqman sond, popř. kvantifikace pyrosekvenováním (Busque L. et al., 2009; Swierczek S.I. et al., 2012; Mossner M. et al., 2013). Poté co sekvenování nové generace otevřelo novou éru genetiky, bylo jenom otázkou času, než bude tato metodika použita také pro stanovení poměru

XCI. V nedávné době byl publikován článek, ve kterém autoři demonstrovali užitečnost přístupu, který využívá celoexomové a mRNA sekvenování, RNAseq (Szelinger S. et al., 2014). Určení fáze (tzn. rodičovského původu) alel SNP na základě analýzy segregace v rodině mělo minimální vliv na výsledek. Obecně se výsledky RNAseq shodovaly s metodou HUMARA ($n = 5$, $r = 0,84$), ale zešíkmení XCI bylo u RNAseq nižší, což je ovlivněno tím, že autoři odfiltrovali pouze geny ležící v PAR, ne všechny unikající geny.

Metody používané pro stanovení zešíkmení X-inaktivace se spoléhají na to, že ve zkoumané tkáni je daný gen stabilně podřízen inaktivaci, tzn. není exprimován z Xi a zároveň je exprimován z Xa a/nebo je jeho CpG ostrůvek kompletně metylován u Xi. Tento předpoklad ale v některých případech není splněn a proto je zjevné, že používání pouze jedné metody má svá úskalí. V nedávné době se objevily výhrady i k nejčastěji používané metodě HUMARA (Swierczek S.I. et al., 2012) (viz diskuze u výsledků). Metody pro stanovení poměru XCI nám také nemusí přinášet užitečnou informaci, pokud jsou využity u žen, které jsou genetickými mosaikami (Majer F. et al., 2014).

2 Cíle

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 střeďavých 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. Na základě informací uvedených v úvodu je zřejmé, že alternativní metody, které nejsou založeny na dinukleotidových repetičích, jsou stále potřebné, a to jak v případech, kdy standardní metoda není použitelná, tak pro potvrzení jejich výsledků.
- D. Využití nových metod pro stanovení poměru X-inaktivace u žen heterozygotních pro X-vázaná onemocnění různé povahy, nejen lysosomální střeďavá 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.

3 Metody

Chemikálie byly zakoupeny od firem: Biotium (Hayward, CA, USA), GE Healthcare (Little Chalfont, UK), GeneAge Technologies (Praha, ČR), Lach-Ner (Neratovice, ČR), New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), PAA Laboratories (Yeovil, UK), Qiagen (Hilden, Německo), Roche (Basel, Švýcarsko), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Německo), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a ThermoFisher Scientific (Wilmington, DE, USA), zahrnující Applied Biosystems, Thermo Scientific, Invitrogen, Fisher Scientific. Dodavateli oligonukleotidů byly firmy: Generi Biotech (Hradec Králové, ČR) a ThermoFisher Scientific.

3.1 Metody použité pro izolaci lysosomů a lysosomálních membrán

3.1.1 Kultivace buněčných kultur

Buňky linií HEK293 nebo HeLa byly kultivovány v 75 cm² lahvích v komerčně dodávaném mediu DMEM (ThermoFisher Scientific) obohaceném o antibiotika (gentamycin 40 µg/ml) a 10% fetální bovinní sérum (FBS) (PAA Laboratories). Kultivace byla prováděna v termostatu při 37 °C v atmosféře s 5% CO₂.

3.1.2 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, Vineland, NJ, USA) 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.

3.1.3 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, Riga, Latvia) při pokojové teplotě. Poté byla suspenze přenesena na led a byly přidány inhibitory proteáz cComplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche) o konečné koncentraci 1x. Suspenze po různě dlouhých inkubacích byly centrifugovány v centrifuze 4K15 (Sigma) 25 min při 25 000 g. V supernatantech a resuspendovaných peletách byly měřeny aktivity glukocerebrosidasy a hexosaminidasy a na základě toho určena úroveň lyze lysosomů.

3.1.4 Příprava lineárního a krokového sacharosového gradientu

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

3.1.5 Příprava lineárního gradientu z OptiPrepu

Lineární gradient z OptiPrepu (iodixanol, Sigma-Aldrich) byl připraven a centrifugován obdobně jako sacharosový 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 pufru HEPES/EDTA). Gradient byl převrstven 5 ml postnukleárního supernatantu v tomtéž pufru. Vzorek nebyl vystaven působení MME a byl k němu přidán roztok iodixanolu o výsledné koncentraci 4 %. Gradienty byly centrifugovány 2 hodiny při 100 000 g. Frakce byly sbírány od hladiny (21 frakcí po 0,8 ml).

3.1.6 Měření refrakčních indexů

Správná koncentrace jednotlivých roztoků iodixanolu a sacharosy a rozložení v gradientech byla kontrolována měřením refrakčních indexů na stolním optickém refraktometru.

3.1.7 Měření změny pH pomocí akridinové oranže

Schopnost změny pH u izolované frakce v závislosti na přídavku ATP byla ověřena dle metody popsané v literatuře (Dell'Antone P., 1979; Moriyama Y. et al., 1982). K reakčnímu roztoku (20 mM HEPES, pH 7,2, 0,2 M sacharosa, 50 mM KCl) s 20 μ M akridinovou oranží (Sigma-Aldrich) o objemu 1 ml byla přidána frakce lysosomálních membrán (10 μ g proteinu) a na spektrofotometru Shimadzu UV-2550 (Shimadzu, Duisburg, Německo) byla za pokojové

teploty kontinuálně měřena absorbance při vlnové délce 492 nm. Po stabilizaci křivky byl do kyvety přidán roztok 2 mM ATP (Sigma-Aldrich) s 2 mM MgCl₂ a po více než 2 minutách byl přidán roztok (NH₄)₂SO₄ o finální koncentraci 10 mM. Do druhé reakce byl přidán pouze (NH₄)₂SO₄ (žádné ATP). Změny absorbance byly měřeny v průběhu cca 6 minut.

3.1.8 Sonikace vzorků

Vzorky pro měření enzymových aktivit byly sonikovány na přístroji Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). Aktivity enzymů 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 úměrně upraveny pro umožnění měření na mikrotitračních destičkách.

3.1.9 Měření koncentrace proteinu

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody Bradfordové (Bradford M.M., 1976). Vzorky byly inkubovány 5 min s činidlem Bradford (Sigma-Aldrich) a následně byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 595 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko). Pro sestavení kalibrační rovnice byl použit hovězí sérový albumin (BSA) o koncentraci 0,1 mg/ml.

3.1.10 Měření aktivity glukocerebrosidasy a hexosaminidasy

20 µl vzorku bylo inkubováno v mikrotitrační destičce 30 min při 37 °C s 20 µl 5 mM substrátu 4-metylbelliferyl-β-D-glukosidu (Glycosynth, Warrington, Anglie) v McIlvainově pufru (0,1 M/0,2 M citrát/fosfátový pufr, 0,5% taurocholát sodný, 0,4% Triton X-100, pH 5,4). Reakce byla zastavena 200 µl 0,2 M glycin-NaOH pufru (pH 10,6). Pro kalibraci byl použit 1 µM roztok 4-metylbelliferonu (4-MU) (Sigma-Aldrich). Fluorescence uvolněného 4-MU a kalibrace byla měřena při excitaci v oblasti 365 nm a emisi v oblasti 448 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2. Specifická aktivita glukocerebrosidasy byla vyjádřena v nmol 4-MU uvolněného ze substrátu na mg proteinu za 1 minutu. Měření aktivity hexosaminidasy bylo obdobné, inkubační čas byl zkrácen na 15 minut a použit byl substrát 5 mM 4-metylbelliferyl-*N*-acetyl-β-D-glukosaminid (Glycosynth) v McIlvainově pufru (0,1 M/0,2 M citrát/fosfátový pufr, 0,05% BSA, pH 4,4).

3.1.11 Měření aktivity sukcinátdehydrogenasy

15 µl vzorku bylo inkubováno v polypropylenové mikrotitrační destičce 20 min při 37 °C s 80 µl 10 mM sukcinátu sodného (Sigma-Aldrich) v 50 mM fosfátovém pufru (pH 7,5).

Následně bylo do reakce přidáno 27 μl *p*-iodonitrotetrazoliové violeti (INT, Sigma-Aldrich) o koncentraci 2,5 mg na ml fosfátového pufru. Destička byla inkubována dalších 10 min při 37 °C a reakce byla zastavena přidáním 270 μl směsi etylacetát/etanol/trichloroctová kyselina v poměru 5:5:1 (v/v/w). Destička byla centrifugována 1 min při 3 000 g a 300 μl roztoku nad precipitátem bylo před měřením přepipetováno do polystyrenové mikrotitrační destičky. Absorbance roztoku byla ihned měřena při 490 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2. Výsledná aktivita sukcinátdehydrogenasy byla vyjádřena v nmol redukovaného INT na mg proteinu. Molární absorpční koeficient redukovaného INT je 19 300 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

3.1.12 Měření aktivity alkalické a kyselé fosfatasy

20 μl vzorku bylo inkubováno v mikrotitrační destičce 30 min při 37 °C s 90 μl reakční směsí, která je připravena smícháním 16 mM *p*-nitrofenylfosfátu (Sigma-Aldrich) s pufrům v poměru 1:1. Pufr pro měření alkalické fosfatasy tvořil 50 mM borát sodný/NaOH (pH 9,8), pro měření kyselé fosfatasy byl použit 180 mM acetátový pufr (pH 5,0). Při měření alkalické fosfatasy byl do reakční směsi navíc vmíchán 2 mM MgCl_2 . Reakce byla zastavena přidáním 270 μl 0,25 M NaOH. Destička byla centrifugována 1 minutu při maximálních otáčkách (3 000 g) a 300 μl roztoku bylo přepipetováno do nové polystyrenové mikrotitrační destičky. Absorbance roztoku byla měřena při 410 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2. Výsledná aktivita fosfatasy byla vyjádřena v nmol *p*-nitrofenolu uvolněného ze substrátu na mg proteinu za 1 minutu. Molární absorpční koeficient *p*-nitrofenolu je 9 620 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

3.1.13 Měření aktivity katalasy

Vzorek o objemu 2 μl byl přidán k 6 μl vzorkového pufru, který byl připraven smícháním 2% Tritonu X-100 s roztokem Tris/BSA (0,1 g BSA/100 ml 20 mM Tris-HCl pufru, pH 7,0) v poměru 1:2. Následně bylo do jamičky přidáno 100 μl substrátu (2,55 mM H_2O_2 v roztoku Tris/BSA) a přesně po 1 minutě inkubace na ledu byla reakce zastavena 200 μl roztoku oxysulfátu titaničitého (0,225 g/100 ml 1 M H_2SO_4). Destička byla centrifugována 1 min při 3 000 g a 280 μl roztoku bylo přepipetováno do nové polystyrenové mikrotitrační destičky. Absorbance vzorku byla měřena při 405 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 a porovnána s hodnotou absorbance substrátu v čase nula. Aktivita katalasy se v podstatě určovala zpětnou titrací H_2O_2 zbylého po ukončení enzymové reakce a byla vyjádřena v mU na mg proteinu. Aktivita 1 U je definována jako množství enzymu schopné zpracovat za daných reakčních podmínek 90 % substrátu za 1 minutu v objemu 50 ml.

3.1.14 Měření aktivity NADPH-cytochrom *c* reduktasy

Vzorek o objemu 12,5 μ l byl v mikrotitrační destičce smíchán s 250 μ l 50 mM fosfátového pufru o pH 7,7, 2,5 μ l 10 mM EDTA, 12,5 μ l cytochromu *c* (25 mg/ml 1x PBS) a 2,5 μ l roztoku rotenonu (1 mg/ml etanolu), který slouží jako inhibitor interferující mitochondriální oxidace NADPH. Absorbance vzorku byla měřena při pokojové teplotě při 550 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 dokud se neustálila, a poté bylo přidáno 25 μ l roztoku NADPH (2 mg/ml fosfátového pufru). Směs byla důkladně promíchána a absorbance vzorku byla zaznamenávána po dobu 5 minut v intervalech 30 s. Výsledná aktivita enzymu byla vypočítána ze sklonu přímky (v oblasti měření s lineárním přírůstkem absorbance) a vyjádřena jako nmol redukovaného cytochromu *c* na mg proteinu za 1 min. Molární absorpční koeficient redukovaného cytochromu *c* je 27 000 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

3.1.15 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Separční 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 (peroxidisíran amonný, Sigma-Aldrich) a 0,06% TEMED (tetrametyletylendiamin, Sigma-Aldrich). Směs byla nalita mezi sestavená skla, přelita vrstvou vody a ponechána 45 min polymerovat. Pro přípravu zaostřovacího gelu byl použit pufr obsahující 0,5 M Tris base a 13,9 mM SDS, pH 6,8. V případě separace na 7-15% gradientovém gelu byla směs míchána v gradientovém mixeru (Sigma-Aldrich) a nalévána za použití peristaltické pumpy Varioperpex II (LKB). Zpolymerovaný gel byl připevněn do aparatury MightySmall SE260 (Hofer, San Francisco, CA, USA). Vzorky (10 μ g proteinu z každé frakce získané během purifikace LM) 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 bylo napětí zvýšeno na 120 V.

3.1.16 Western blot

Rozdělené vzorky byly blotovány na PVDF membránu Immobilon-P (Merck Millipore, Bedford, MA, USA) v polosuché blotovací aparatuře (Biotec-Fischer, Reiskirchen, Německo). 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 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM

KH_2PO_4 , pH 7,3, 0,05% TWEEN20) obsahujícím 3% BSA (Serva Electrophoresis) a promyta v PBS-T. Pro detekci LAMP1 byla použita králičí primární protilátka (1:5000, darováno Dr. Carlssonem, University of Umea, Švédsko) a kozí sekundární protilátka proti králičím IgG (ThermoFisher Scientific). Membrána byla inkubována 1h s příslušnou primární protilátkou v PBS-T s 1% BSA, promyta 2x po dobu 5s a 2x 10 min a inkubována 45 min se sekundární protilátkou konjugovanou s reporterovým enzymem HRP (křenovou peroxidázou) 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, Cambridge, UK). 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, Riga, Lotyšsko).

3.2 Metody použité pro studii vlivu promotorových variant *HGSNAT*

3.2.1 Měření aktivity enzymu HGSNAT

10 μl vzorku bylo inkubováno 17 hodin při 37 °C s 10 μl 6 mM acetylCoA a 10 μl 3 mM substrátu 4-metylbelliferyl- β -D-glukosaminidu (Moscerdam, Oestgeest, Nizozemí) v McIlvainově pufru (0,1 M/0,2 M citrát/fosfátový pufr, 0,25% Triton X-100, pH 5,5). Reakce byla zastavena 600 μl 0,2 M glycin-NaOH pufru (pH 10,6). Pro kalibraci byl použit 1 μM roztok 4-metylbelliferonu. Fluorescence uvolněného 4-MU a kalibrace byla měřena při excitaci v oblasti 365 nm a emisi v oblasti 448 nm na fluorimetru LS 55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Specifická aktivita enzymu byla vyjádřena v nmol 4-MU uvolněného ze substrátu na mg proteinu za 17 hodin. Měření hexosaminidasy, kontrolního enzymu, je popsáno výše (3.1.10).

3.2.2 Měření koncentrace proteinu

Pro měření byla využita Hartree-Lowryho metoda (Hartree E.F., 1972). 200 μl vzorku bylo inkubováno 10 min při 50 °C s 200 μl roztoku A (2 g vinanu sodno-draselného, 90g Na_2CO_3 , 450 ml 1 M NaOH, doplněno do 1 l vodou). Směs byla ochlazená a po přidání 20 μl roztoku B (2 g vinanu sodno-draselného, 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 ml 1 M NaOH, doplněno do 100 ml vodou) inkubována 10 min při pokojové teplotě. Po přidání 600 μl roztoku C (Folin-Ciocalteouvo činidlo, Sigma-Aldrich, zředěno vodou v poměru 1:14) byla směs inkubována 10 min při 50 °C a ochlazená. Na spektrofotometru Shimadzu UV-2550 byla změřena absorbance vzorků při 650 nm. Jako standard byl použit roztok BSA o koncentraci 0,1 mg/ml.

3.3 Metody použité pro stanovení poměru inaktivace chromosomu X

3.3.1 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 dárcyň ve věku od 9 do 72 let (průměrný věk 36,5 let, medián 35 let), pěti mužských dobrovolníků a 18 členů pěti rodin. Všichni dárci byli českého původu. Studie byla povolena etickou komisí a ode všech zúčastněných byl získán informovaný souhlas.

3.3.2 Bioinformatické studie a návrh primerů

Hledání nových oblastí vhodných pro X-inaktivační studie bylo provedeno pomocí programu Galaxy (Goecks J. et al., 2010; Blankenberg D. et al., 2010; Giardine B. et al., 2005). Celá sekvence chromosomu X (verze NCBI36/hg18) byla systematicky prohledána pro nalezení oblastí, které obsahují v těsné blízkosti (max. 300 bp) CpG ostrůvek a krátkou tandemovou repetici (STR) s jednotkou repetice mezi 3-6 bp (lokalizováno pomocí programu Tandem Repeats Finder). Při následné selekci byly vypuštěny oblasti lokalizované v oblastech PAR1 a PAR2 (Mangs A.H. a Morris B.J., 2007). Takto zúžený výběr byl zobrazen v prohlížeči UCSC Genome Browser (Kent W.J. et al., 2002) a pro další evaluaci byly vybrány oblasti, které ležely v domnělých promotorových oblastech genů. Protože jsme neměli k dispozici žádná data o variabilitě STR v našich vybraných oblastech, byla jejich variabilita predikována pomocí programu SERV (Legendre M. et al., 2007) a vybrány pouze sekvence s VARscore > 0,9. Následně bylo na základě literatury (Park C. et al., 2010; Carrel L. et al., 2006; Carrel L. a Willard H.F., 2005; Sudbrak R. et al., 2001) zkontrolováno, zda oblasti neunikají inaktivaci. Naše kritéria splňovalo 19 oblastí, pro něž byly v programu Primer-BLAST (Ye J. et al., 2012) navrženy primery. Vhodné metylačně senzitivní a jiné restriční enzymy byly nalezeny pomocí programu Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>).

3.3.3 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 (New England Biolabs, NEB) v příslušném pufru a s 100 µg/ml BSA pokud bylo potřeba (detaily v tab. 3).

Tab. 3: PCR primery a enzymy použité v jednotlivých metodách I až V a délka vznikajících produktů.

No.	Gen	Repetice	Primery	Restrikční enzymy	Délka (bp)
I	<i>RPS6KA3</i>	CGG/ GCGGCA ^a	5'-6-FAM-CACAGCCATCTTCTGCCACGGG-3' 5'-AAGAAAGGGGCGAGACCCGGT-3'	<i>HpaII</i> + <i>RsaI</i>	305-311
II	<i>CNKS2</i>	GCA	5'-6-FAM-CGAGCGGGCAAGTTGGCTGA-3' 5'-TGTCGGGTCTCGCGGCTGTA-3'	<i>HpaII</i> + <i>RsaI</i>	281-308
III	<i>RPS6KA6</i>	CCG	5'-HEX-AGGGCTCGTCCTGAGGAGCG-3' 5'-CGAGCGGCTGTCGTTGTGGT-3'	<i>HhaI</i> + <i>RsaI</i>	306-324
IV	<i>TMEM185A^b</i>	CCG	5'-HEX-GGCCCTCAGTTTCATGGCG-3' 5'-CCCTCGTACGGAAGCCCGGA-3'	<i>HpaII</i> + <i>HpyCH4III</i>	243-279
V	<i>HMGB3</i>	CCG	5'-6-FAM-GTGGAGGCAGCTAGCGCGAG-3' 5'-GCTCGGGGAACGCGTTGAA -3'	<i>HpaII</i> + <i>HpyCH4III</i>	289-322

^aOblast repetice CGG obsahuje menší oblast s repeticí GCGGCA. ^bTento gen je asociován s fragilním místem FRAXF. Nebyla nalezena asociace se specifickým fenotypem (Lukusa T. a Fryns J.P., 2008).

Stejně množství DNA bylo inkubováno paralelně pouze s pomocným enzymem. Ten byl do směsi přidán za účelem snížení komplexity gDNA. Pomocný enzym štěpil sekvence DNA mimo amplifikovanou sekvenci a nebyl citlivý k metylaci, takže štěpil aktivní i inaktivní chromosom X stejnou mírou. Enzymy byly inaktivovány inkubací 10 min při 95 °C a 30 ng DNA bylo následně amplifikováno s navrženými primery (Applied Biosystems), přičemž zbytek směsi byl dále skladován při -20 °C (Kiedrowski LA et al., 2011). Jeden z primerů v každé sadě byl fluorescenčně značen pomocí 6-FAM nebo HEX. PCR reakce byly prováděny v objemu 10 µl a obsahovaly 1x PC2 pufr (50 mM Tris-HCl pH 9,1, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂, 150 µg/ml BSA), 200 µM dNTPs, 0,3 µM primery, 10% dimetylsulfoxid (DMSO), 240 mU Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) a 2,2 mU DeepVent polymerasy (NEB). DNA byla amplifikována v termocykleru C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA). Denaturace (94 °C 2 min) byla následována 35 cykly (94 °C 5 s, 68 °C 20-25 s) a finální extenzí, která byla z původních 10 min při 68 °C prodloužena na 30 min pro podpoření netemplátové adice dATP polymerázou a minimalizaci tvorby tzv. split píků. Obdobný protokol pro metodu HUMARA byl publikován v literatuře (Boudewijns M. et al., 2007).

3.3.4 Horizontální elektroforéza v agarosovém gelu

Agarosa (Serva Electrophoris) byla rozpuštěna (1,5 g/100 ml) v 1x TBE pufru (89 mM Tris, 112 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA) a po ztuhnutí tímto pufrům přelita. Vzorky byly smíchány s 6x Loading dye (Thermo Scientific) a interkalační barvičkou GelRed (Biotium). Na gel byly

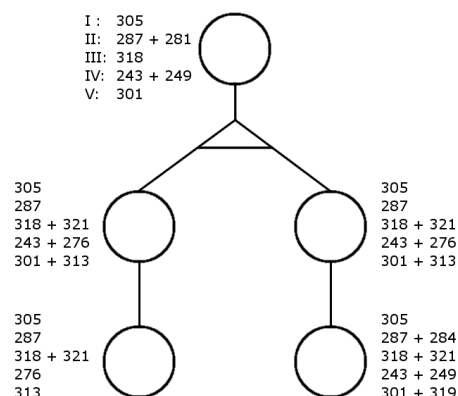
nanášeny paralelně s hmotnostním standardem GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific) a elektroforéza probíhala při intenzitě ~10 V/cm. Vizualizace DNA byla provedena na UV transiluminátoru (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Francie). Pokud bylo potřeba přečistit produkty PCR, byla použita souprava High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

3.3.5 Kapilární elektroforéza

Produkty PCR u neštěpených vzorků byly zředěny vodou v poměru 1:75, u štěpených vzorků 1:30. Podle možností byly vytvořeny směsi PCR produktů. Poté byly vzorky smíchány s Hi-Di formamidem (Thermo Scientific) a standardem GeneScan 500ROX (Applied Biosystems) v poměru 0,5:9:0,5 (celkem 10 μ l). Tyto směsi byly separovány na sekvenátoru 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Pro zpracování výsledků byl použit program GeneMapper software v4.1 (Applied Biosystems).

3.3.6 Selektce primerů a určení poměru XCI pomocí nových metod

Primery byly použity pro PCR amplifikaci 24 vzorků ženské DNA. Amplifikace u pěti sad primerů (očíslovaných I, II, III, IV a V) vedla ke vzniku produktů s variabilní délkou. Specifita těchto produktů byla potvrzena amplifikací nezávislé skupiny vzorků, získaných od pěti rodin, kde byla pozorována segregace alel (příklad jedné z rodin na obr. 13).



Obr. 13: Velikosti produktů amplifikovaných pomocí PCR se sadami primerů I až V.

Vzorky gDNA izolované od 100 kontrolních osob (žen) byly amplifikovány pomocí pěti sad primerů pro identifikaci informativních vzorků, u kterých byl následně stanoven poměr X-inaktivace. Poměr XCI byl vypočten jako poměr ploch píků dvou alel analyzovaného polymorfního místa získaných u vzorku štěpeného pomocí metylačně senzitivního restriční enzymu *HpaII* nebo *HhaI*. Tento mezivýsledek pak byl zkorigován poměrem ploch píků u neštěpeného vzorku. Tím se předešlo chybě způsobené preferenční amplifikací kratší alely. Poměr XCI byl vypočten u informativních heterozygotů, u kterých se produkty PCR lišily o dvě nebo více jednotek repetice. U vzorků, kde se produkty lišily jen o jednu repetici se nabízí možnost zavést korekci, která by odečetla příspěvek stutter píku delší alely k hlavnímu píku kratší alely. Zmínky o takové korekci lze nalézt v literatuře (Busque L. et al.,

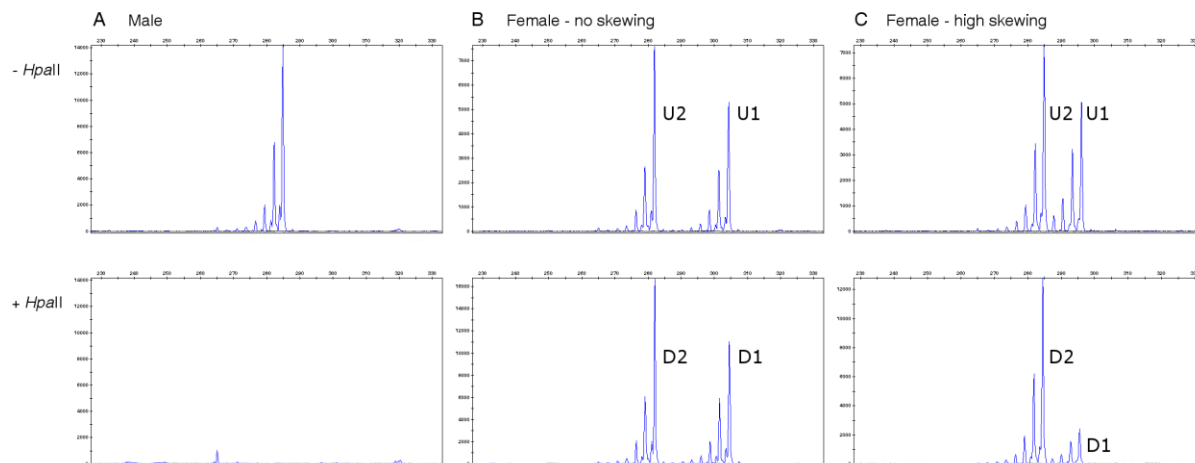
2009; Mossner M. et al., 2013; Sharp A. et al., 2000), nicméně, my jsme ji nezavedli, protože velikost stutter píků není uniformní. V každé sérii vzorků byl zahrnut také mužský vzorek pro potvrzení úplného štěpení metylačně senzitivním restrikcčním enzymem (obr. 14). Vzorec pro výpočet poměru XCI byl převzat z literatury (Thouin M.M. et al., 2003):

$$A_1 (\%) = 100 \cdot (D1/U1) / (D1/U1 + D2/U2)$$

$$A_2 (\%) = 100 \cdot (D2/U2) / (D1/U1 + D2/U2)$$

$$A_2 (\%) + A_1 (\%) = 100$$

(A_1/A_2 reprezentují procento buněk, u kterých je alela 1 nebo 2 inaktivní, U_1/U_2 reprezentují plochu píku alely 1 nebo 2 u neštěpeného vzorku, D_1/D_2 reprezentují plochu píku alely 1 nebo 2 u štěpeného vzorku.)



Obr. 14: Výsledky fragmentační analýzy – metoda II. Neštěpené (- *HpaII*) a štěpené (+ *HpaII*) vzorky byly amplifikovány s příslušnými primery a vzniklé produkty PCR byly separovány pomocí kapilární elektroforézy. 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 vysokým zešíkmením XCI.

Výsledek byl vyjádřen jako poměr delší alely ke kratší $A_1:A_2$. Hodnota byla průměrem dvou měření. Protože jsme při porovnávání výsledků jednotlivých metod nevěděli, jestli jsou jednotlivé alely *in cis*, nemohli jsme přímo porovnávat naše výsledky. Pro účely porovnávání jsme tedy výsledky převedli na odchylku od průměrného poměru XCI 50:50. Škála výsledků se pohybovala od 0 do 50 %, kde 0 % odpovídá stejné expresi z obou alel a 50 % odpovídá expresi výhradně jedné alely.

3.3.7 Určení poměru XCI s využitím oblasti genu *AR*

Konvenční metoda HUMARA, která kombinuje štěpení pomocí metylačně senzitivních restrikcčních endonukleáz a PCR, byla provedena podle publikovaného protokolu (Racchi O. et al., 1998) s tím rozdílem, že jeden z primerů byl značen fluorescenční značkou HEX.

Poměry XCI byly rovněž určovány pomocí metody AR-MSP, která také využívá oblast genu *AR* (Kubota T. et al., 1999). Vzorky DNA byly modifikovány pomocí hydrogensířičitanu sodného (NaHSO_3) podle protokolu popsaného v literatuře (Frommer M. et al., 1992) nebo

s použitím soupravy EpiTect Bisulfite kit (Qiagen). Modifikovaná DNA byla amplifikovaná pomocí PCR s dvěma sadami primerů AR-M nebo AR-U, které specificky amplifikují metylovanou sekvenci Xi, respektive nemetylovanou sekvenci Xa. Produkty PCR byly separovány pomocí kapilární elektroforezy a poměry XCI byly vypočítány dle publikované rovnice.

3.3.8 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). Výběr těchto oblastí a další detaily metod jsou popsány v literatuře (Musalkova D. et al., 2015), SnaPshot reakce byly provedeny dle prokolu 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 elektroforezy a velikosti píků byly použity pro výpočet poměru exprese alel, který byl upraven podle kalibračních křivek.

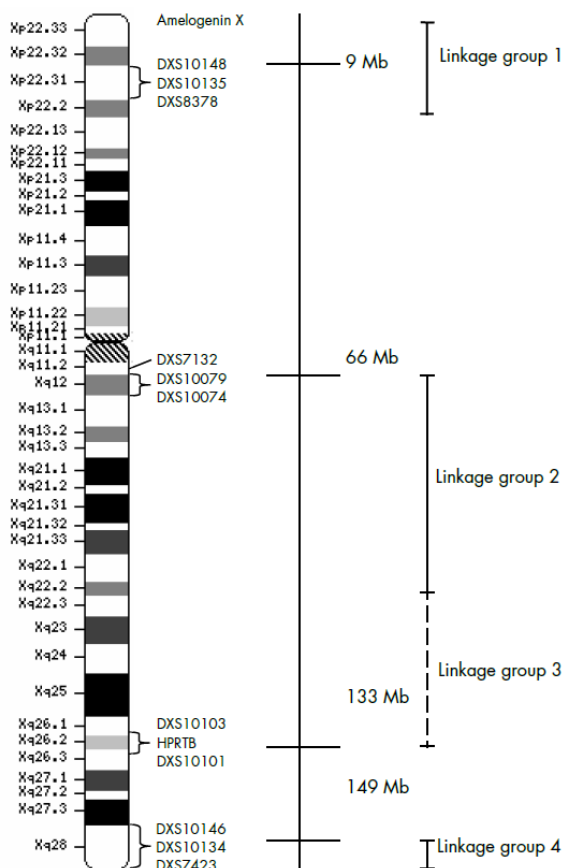
3.3.9 Určení poměru XCI na základě sekvenování produktů RT-PCR

RT-PCR produkty byly analyzovány pomocí hlubokého sekvenování. Pro rozlišení maternální a paternální alely bylo možné u pacientky s deficitem OTC využít jak mutaci c.583G>C v exonu 6 genu *OTC*, tak SNP c.137A>G (rs1800321) v exonu 2. U pacientky s MPS II byla využita mutace c.1403G>A v genu *IDS* a SNP c.156A>T (rs12097) v genu *LAMP2*.

Pro přípravu knihovny bylo použito singleplexové PCR a Nextera XT library preparation kit (Illumina, San Diego, CA). Pro sekvenování byl využit sekvenátor MiSeq a MiSeq reagent kit v2 (500cycle) (Illumina). Pro odstranění duplikací, mapování a určení variací byl použit software NextGENe (SoftGenetics, State College, PA). Jako referenční sekvence byla použita sekvence genomu hg19 (NM_000531 u OTC).

3.3.10 Analýza polymorfismů pomocí soupravy Investigator Argus X-12

Genomová DNA byla analyzována pomocí soupravy Investigator Argus X-12 (Qiagen) zaměřující se na 12 STR markerů na chromosomu X a amelogenin pro určení pohlaví (obr. 15). Amplifikace a následná separace na kapilární elektroforese a analýza dat byla provedena dle pokynů výrobce.



Obr. 15: Pozice oblastí 12 mikrosatelitních markerů na chromosomu X. Vzdálenost od telomery p raménka je uvedena v Mb. Adaptováno z návodu výrobce.

3.3.11 SDS-PAGE a Western blot

Provedení SDS-PAGE elektroforesy a následného Western blotu je popsáno v kapitole 3.1.15 a 3.1.16. Pro měření koncentrace proteinu ve vzorcích byl použit infračervený spektrometr DirectDetect (Merck Millipore). Signál byl kvantifikován v oblasti $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$. Pro detekci byla použita polyklonální králičí protilátka anti-OTC IgG (HPA000243) a monoklonální myší protilátka anti-GAPDH IgM (G8795) od firmy Sigma-Aldrich a monoklonální králičí protilátka anti-CPS1 IgG (ab155083) od firmy Abcam (Cambridge, UK).

3.3.12 Měření aktivity enzymu OTC

Stanovení aktivity enzymu bylo provedeno pomocí modifikované již dříve publikované metody (Tuchman M. et al., 1989). Jako substrát byl použit izotopově značený ornitin-d6 a produkt enzymové reakce citrulin-d6 byl detekován pomocí LC-MS/MS za využití komerčně dostupné soupravy pro analýzu aminokyselin (EZ:faast, Phenomenex, Torrance, USA).

3.3.13 Statistická analýza

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

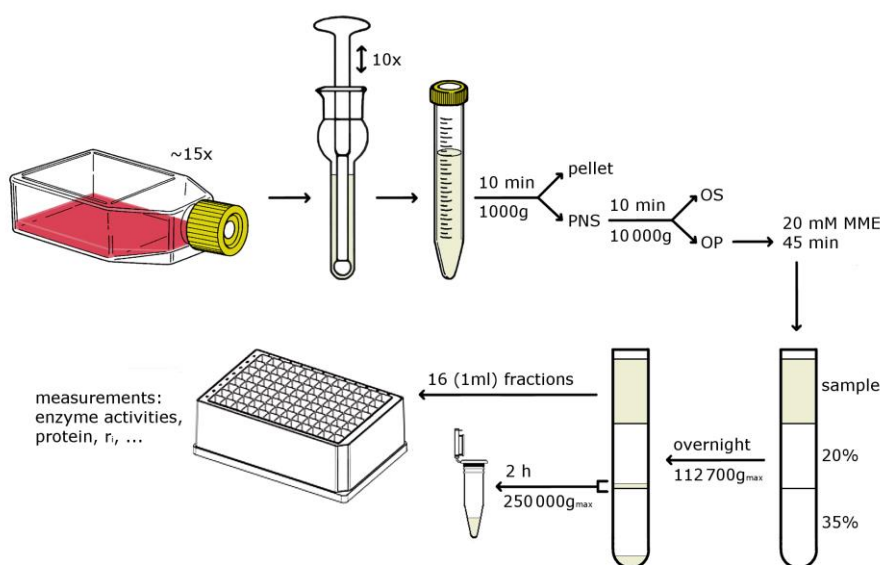
3.4 Ostatní metody

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

4 Výsledky a diskuse

4.1 Izolace lysosomálních membrán z kultivovaných buněk

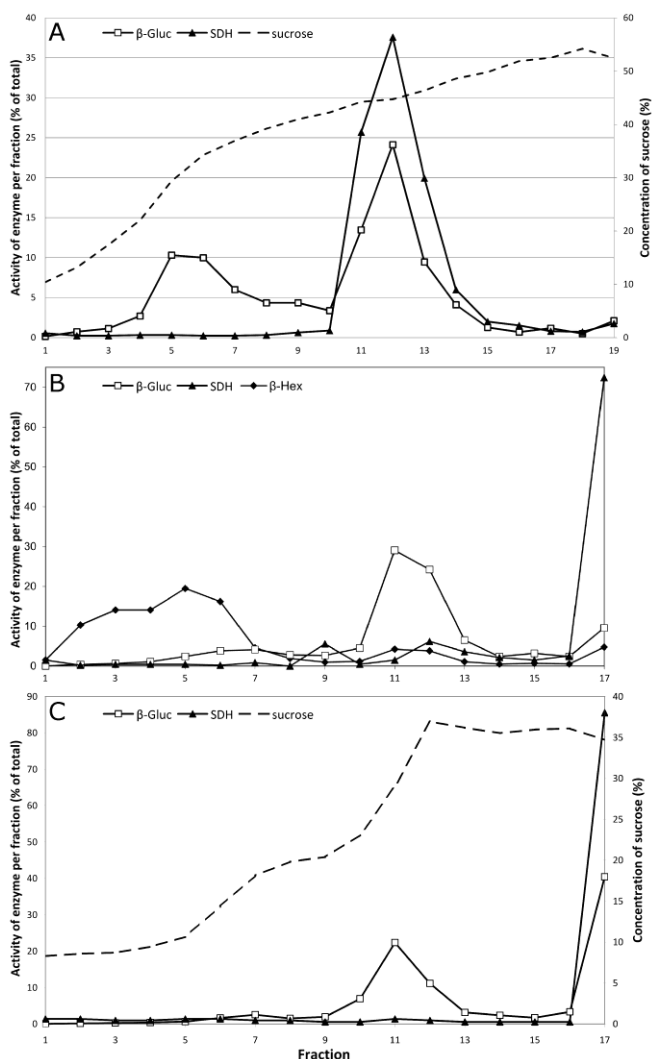
Lysosomální membrány (LM) byly tradičně izolovány pomocí celé řady metod a jejich kombinací (diferenciální centrifugace, separace v denzitním gradientu aj.), přičemž se často využívala účelová změna vlastností určitých organel, popřípadě jejich lyze. Pro výzkum proteinů a lipidů LM jsme vyvinuli jednoduchou a časově nenáročnou metodu sloužící k obohacení LM z kultivovaných buněk linií HEK293 a HeLa (obr. 16).



Obr. 16: Schéma postupu při izolaci lysosomálních membrán. Organelový koncentrát (OP) získaný stočením postnukleárního supernatantu (PNS) byl inkubován s 20 mM metylesterem methioninu (MME), který indukuje lyzi lysosomů. Vzorek byl následně rozdělen pomocí krokového sacharosového gradientu a obohacená frakce LM byla získána z rozhraní 20%/35% sacharosy.

Organelový koncentrát (OP) 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 snadno 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 (viz Mušálková D. et al., 2013). Pro obohacení LM jsme se nejdříve neúspěšně pokoušeli využít diferenciální centrifugaci (Ohsumi Y. et al., 1983). 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

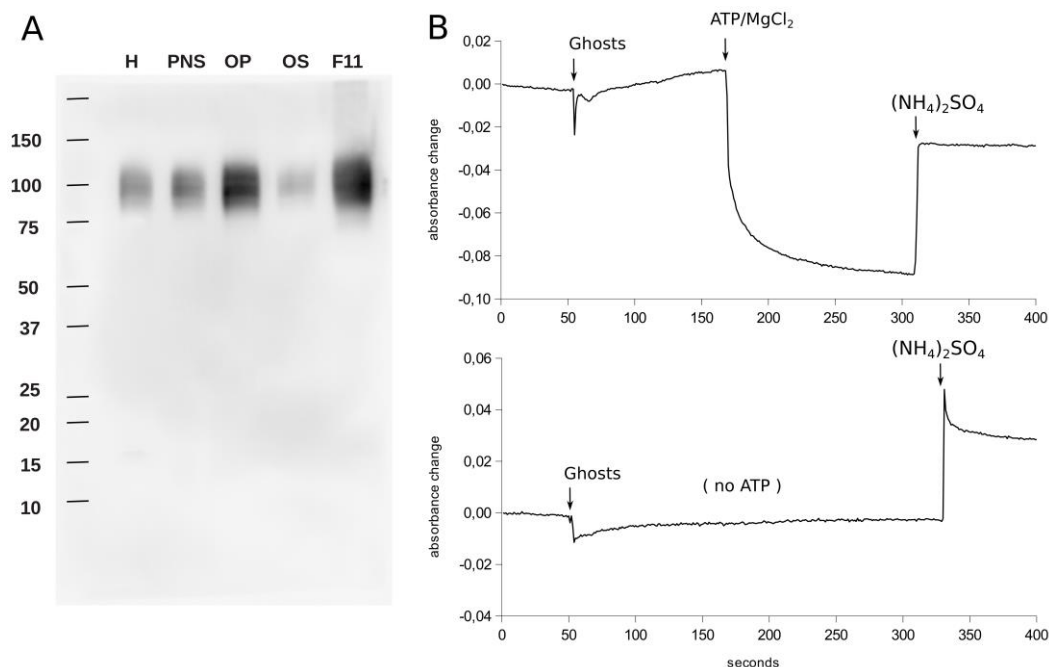
gradientu bylo možné pozorovat dvě oblasti se zvýšenou aktivitou β -Gluc (obr. 17A), první v oblasti 30-41% sacharosy a druhá v oblasti okolo 45% sacharosy, kde se také, jak ukazuje aktivita sukcinátdehydrogenasy (SDH), vyskytovala drtivá většina mitochondrií. Následně jsme navrhli krokový gradient (lyzáát/20% sacharosa/41% sacharosa), ale frakce z rozhraní 20%/41% sacharosy bohatá na β -Gluc obsahovala mitochondriální kontaminaci (obr. 17B). Tento problém byl prakticky eliminován při snížení koncentrace sacharosy ve spodní vrstvě z 41 % na 35 % (obr. 17C), což samozřejmě vedlo ke snížení výtěžku LM (resp. β -Gluc).



Obr. 17: Výsledek separace vzorku na lineárním sacharovém 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 mitochondrií), a popř. β -hexosaminidasy (β -Hex, lumenální 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 lumenálního 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.

Frakce LM získaná z rozhraní 20%/35% sacharosy obsahovala vysoké množství proteinu LAMP1 (obr. 18A) a měla vysokou aktivitu β -Gluc (viz tab. 4). Specifická aktivita β -Gluc se při procesu zvýšila průměrně 15x (7-22x, provedeno 7 experimentů), promytí membrán pomocí 10 mM Tris pufru vedlo k dalšímu, zhruba dvojnásobnému zvýšení. Celkový výtěžek činil zhruba 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 (viz obr. 18B).



Obr. 18: Charakterizace preparátu LM. (A) Western blot detekující glykosylovaný protein LAMP1 v jednotlivých frakcích: homogenát (H), postnukleární supernatant (PNS), organelový koncentrát (OP), supernatant po stočení organel (OS) a frakce 11 (F11) z krokového gradientu sacharosy. (B) Acidifikace preparátu LM po přidání ATP pozorovaná jako změna absorbance akridinové oranže při 492 nm. Do květy byl přidán nejdříve vzorek LM (Ghosts), poté roztok ATP a $MgCl_2$ a nakonec roztok sulfátu amonného, což vedlo k alkalizaci vzorku. U kontrolního pokusu nebylo přidáno ATP (viz panel dole), a tudíž nedošlo k poklesu absorbance.

Tab. 4: 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

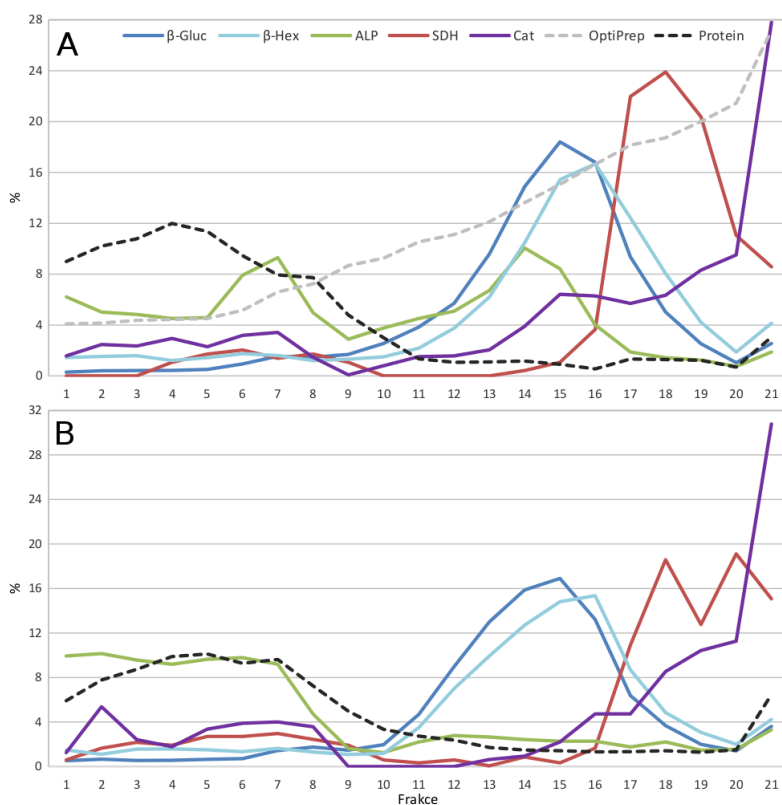
* Frakce 11 měla nejvyšší specifickou aktivitu β -Gluc v rámci sacharosového gradientu (viz obr. 17).

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 Na₂CO₃; Bagshaw R.D. et al., 2005b) 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 (obr. 19). 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.

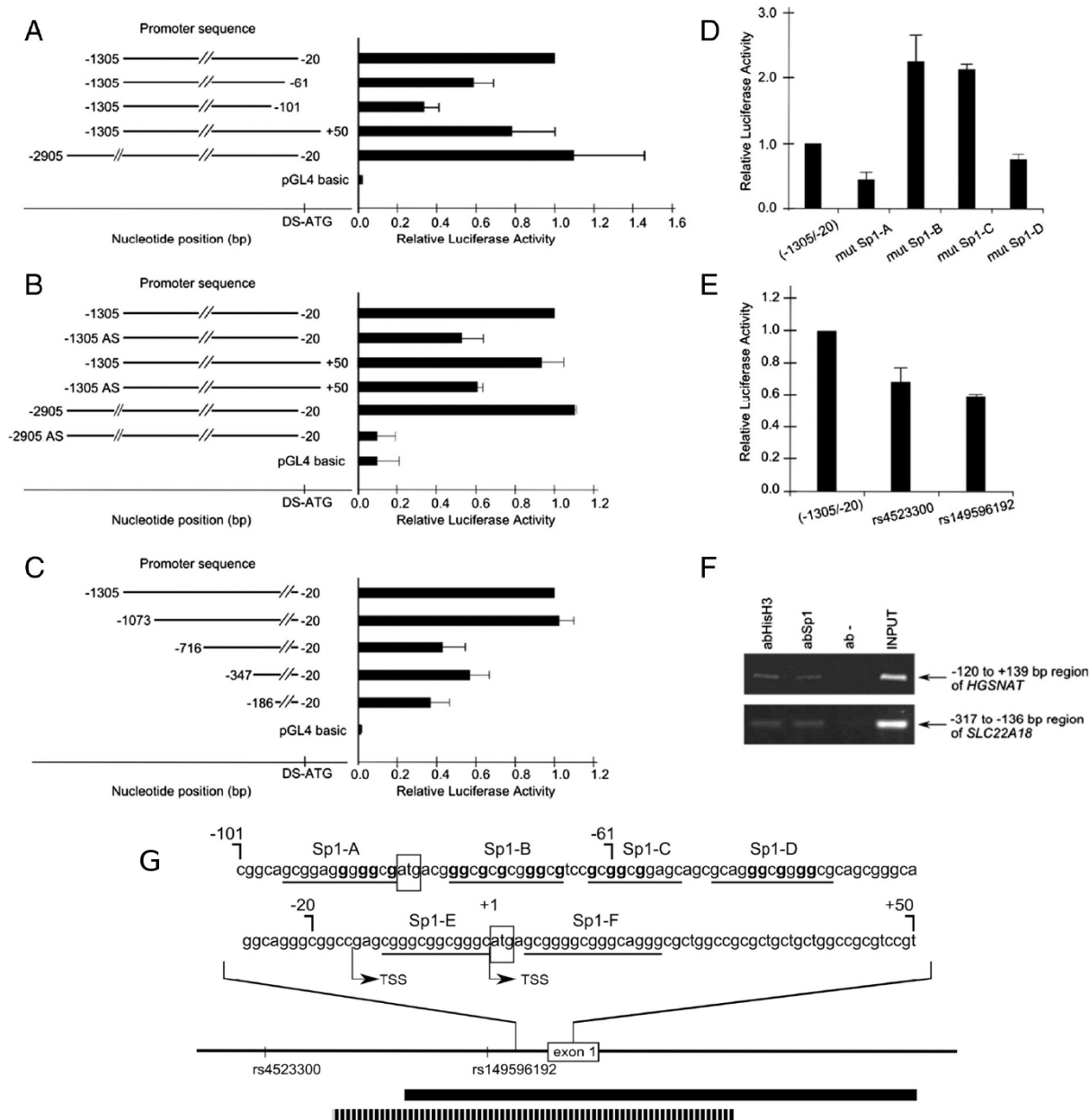


Obr. 19: Výsledek separace vzorku postnukleárního supernatantu na lineárním iodixanolovém (OptiPrep) gradientu: rozdělení u buněčné linie HeLa (A) a HEK293 (B). Frakce byly sbírány od hladiny a následně byla měřena aktivita glukocerebrosidasy a β -hexosaminidasy (β -Gluc a β -Hex, markery lysosomů), sukcinátdehydrogenasy (SDH, marker mitochondrií), katalasy (Cat, marker peroxisomů) a alkalické fosfatasy (ALP, marker plazmatické membrány).

Aktivita je vyjádřena v procentech celkové aktivity, množství proteinu v procentech celkového množství. Z refrakčních indexů byla dopočítána koncentrace OptiPrepu v procentech. Frakce 1-7 odpovídají oblasti, kam byl aplikován vzorek.

4.2 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 v pericentromerické oblasti chromosomu 8 (Fan X. et al., 2006; Hrebicek M. et al., 2006). U *HGSNAT* byly identifikovány dva potenciální iniciační kodony, downstream a upstream ATG (DS-ATG, US-ATG). V nedávném článku (Richtrova E. et al., 2016) jsme charakterizovali promotor genu *HGSNAT* jako promotor bez TATA (a CAAT) boxu, jehož klíčové elementy jsou obsaženy v úseku o délce 1054 bp nad exonem 1 (výsledky souhrně v obr. 20). Zhruba 400 bp této oblasti se překrývá s nemetylovaným CpG ostrůvkem. Pomocí metody 5'RACE (Rapid amplification of cDNA ends) byly identifikovány dva hlavní začátky transkripce (TSS) v pozici +1 a -15 (počítáno od DS-ATG), a transkripty tak obsahují pouze DS-ATG (obr. 20G). Snížení reportérové aktivity v oblasti -101/-20 (obr. 20A) a -1073/-716 (obr. 20C) naznačilo přítomnost silných regulačních elementů. V oblasti -101/-20 byla predikována čtyři potenciální vazebná místa pro transkripční faktor Sp1 (Specificity protein 1) (označena A-D, obr. 20G). Cílená mutagenese jednotlivých míst (obr. 20D) vedla jak k významnému snížení reportérové aktivity na 55 % referenční hodnoty (místo Sp1-A, $p < 0,05$), tak k významnému zvýšení aktivity na zhruba dvojnásobek (místa Sp1-B a Sp1-C). U místa Sp1-D došlo k nevýznamnému snížení o 23 %. Vazba Sp1 byla následně potvrzena chromatinovou imunoprecipitací (obr. 20F) a potvrdila důležitost tohoto faktoru pro regulaci promotoru. 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 (Pugh B.F. a Tijan R., 1991; Gill G. et al., 1994; Emami K.H. et al., 1998), patřícího do rodiny Sp transkripčních faktorů se zinkovými prsty. Mnohonásobná vazebná místa pro Sp1 jsou častou charakteristikou promotorů bez TATA boxu a bývají lokalizována 40-80 bp nad začátkem transkripce (Smale S.T. a Kanadoge J.T., 2003). Molekuly Sp1 tvoří multimerní komplexy, které synergicky aktivují transkripci (Pascal E. a Tjian R., 1991). Vzájemné působení jednotlivých míst není plně pochopeno a v literatuře je taktéž popsáno snížení i zvýšení aktivity transkripce po zamezení vazby faktoru (Li R. et al., 1996; Hewetson A. et al., 2003).



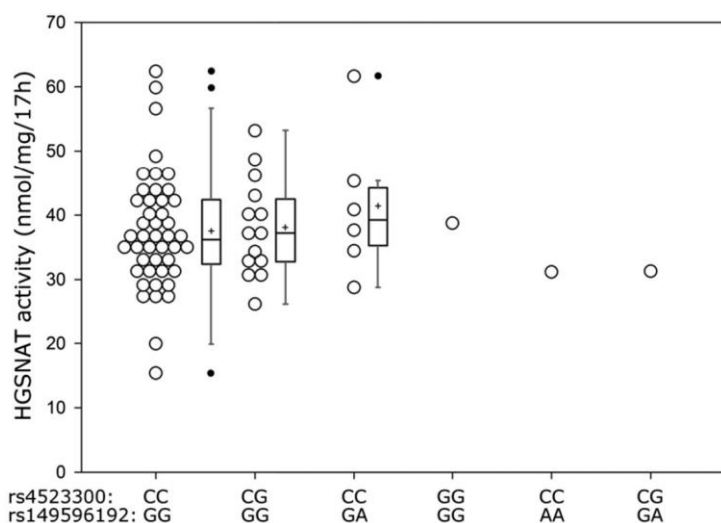
Obr. 20: Charakterizace promotoru genu *HGSNAT*. (A-E) Analýza luciferasové aktivity u konstruktů obsahujících vyznačené oblasti promotoru, popř. variace. AS značí protisměrnou (antisense) orientaci. Pro analýzu byla použita souprava Dual-Luciferase Reporter Assay System a tranzientní transfekce do HepG2 buněk. Hodnoty reprezentují průměr ± výběrovou směrodatnou odchylku nejméně dvou nezávislých měření, z nichž každé bylo provedeno v triplikátu. Hodnoty byly vztahovány ke konstruktu (-1305/-20), který představuje hodnotu 1. Prázdný vektor pGL4 byl použit jako negativní kontrola. (A) Deleční analýza v blízkosti začátku transkripce (TSS). (B) Analýza konstruktů v protisměrné orientaci. (C) Deleční analýza v 5' oblasti. (D) Funkční analýza vazebných míst pro Sp1. Každé místo bylo mutováno zvlášť. (E) Funkční analýza variant nalezených u pacientů s MPS IIIC. (F) Analýza vazby Sp1 pomocí chromatinové imunoprecipitace (ChIP). Fragmentovaná DNA z HepG2 buněk, které byly tranzientně transfekovány vektorem pN3-Sp1, byla použita pro imunoprecipitaci pomocí protilátky proti Sp1 (abSp1) nebo proti histonu H3 (abHisH3, pozitivní kontrola), popřípadě byla inkubována bez protilátky (ab -, negativní kontrola). Imunoprecipitáty a vstupní DNA (INPUT) byly použity pro PCR amplifikaci promotorových oblastí genu *HGSNAT* a *SLC22A18*, který sloužil jako pozitivní kontrola. (G) 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 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 rámečkem.

Promotorové fragmenty (-1305/-20 a -1305/+50) vložené v antisense orientaci (obr. 20B) vedly ke snížení reportérové aktivity na ~50-60 %, což ukazuje na divergentní iniciaci transkripce. To je relativně častý jev u lidských promotorů, který se neomezuje jenom na bidirekcionální promotory (Seila A.C. et al., 2008; Core L.J. et al., 2008). Upstream od genu *HGSNAT* (> 5 kb) neleží žádný známý gen, který by s ním mohl sdílet promotor.

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 (obr. 20E). 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. 21).

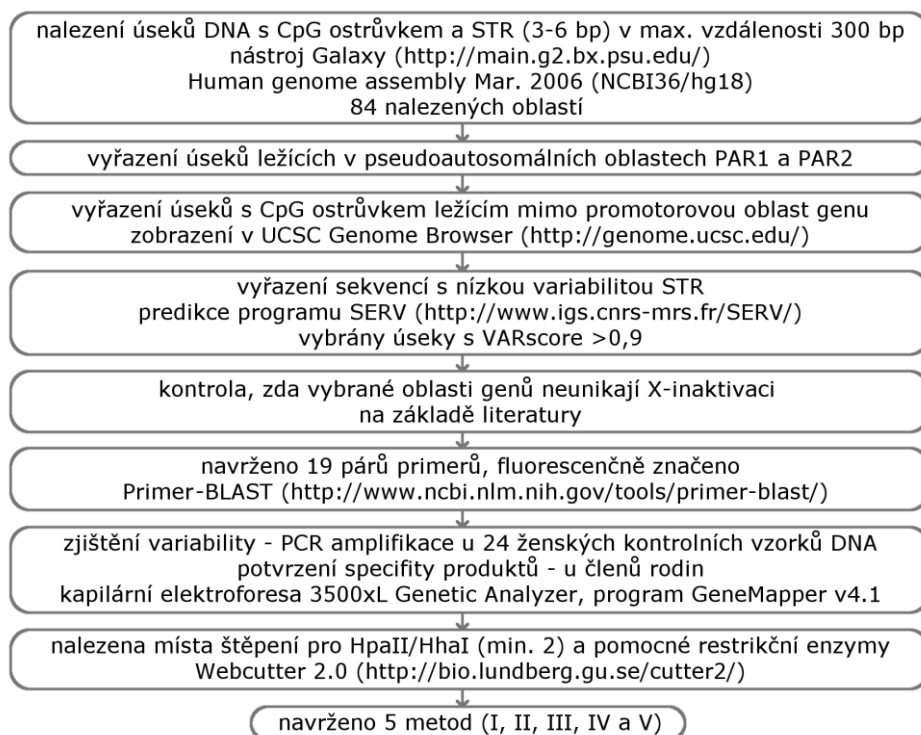


Obr. 21: Aktivita *N*-acetyltransferasy u 68 kontrolních osob, které byly na základě genotypu rozděleny do 6 skupin. Výsledky u prvních tří skupin jsou doplněny o krabicový diagram, jehož hranice jsou vymezeny 25. a 75. percentilem (rozmezí IQR), centrální linie ukazuje medián, symbol „+“ ukazuje průměr souboru. Vousy sahají do vzdálenosti minimální a maximální hodnoty v rámci rozmezí 1,5 násobku IQR. Odlehlé hodnoty jsou znázorněny jako jednotlivé body (s výplní).

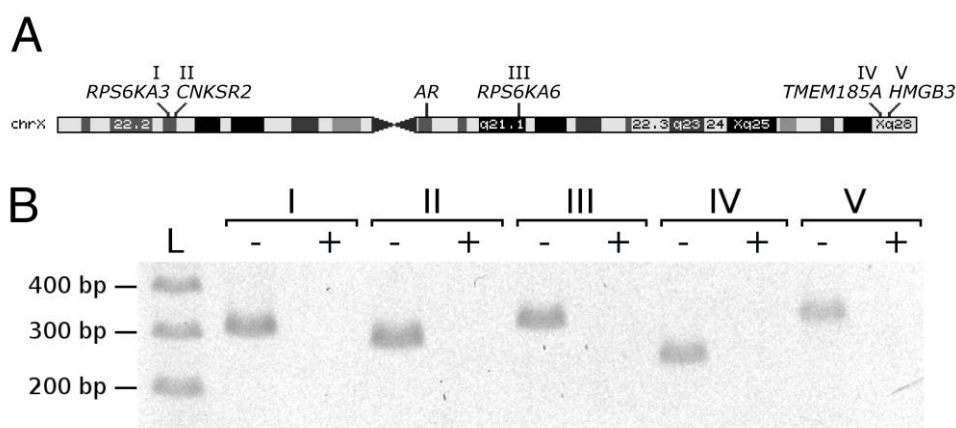
Jednotlivé skupiny tvořilo 77 homozygotů pro WT alely (u 45 změřena aktivita), 14 heterozygotů u rs4523300, 6 heterozygotů u rs149596192, 1 homozygot u každé varianty a 1 osoba, která nesla heterozygotně obě varianty. Při porovnání skupin nebyl nalezen významný rozdíl. To není úplně překvapivé, protože 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.

4.3 Vývoj nových metod pro stanovení zešikmení chromosomu X

Místa na chromosomu X, která by potenciálně mohla být vhodná pro stanovení poměru XCI, byla vyhledána podle schématu na obr. 22. Z původních 84 oblastí byl výběr zúžen na 19, pro jejichž amplifikaci byly navrženy fluorescenčně značené primery. Na základě další selekce bylo vybráno 5 párů primerů, u kterých byly optimalizovány podmínky štěpení DNA a PCR amplifikace. Podrobnosti tohoto výběru jsou uvedeny v diplomové práci (Mušálková D., 2011).



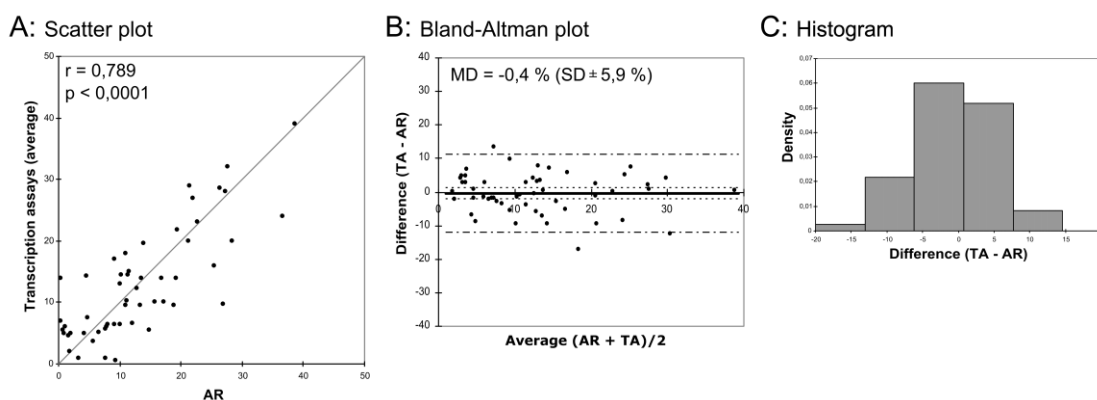
Obr. 22: Postup návrhu nových metod pro stanovení poměru XCI.



Obr. 23: (A) Pozice oblastí (genů), které byly vybrány pro návrh metod (schéma bylo adaptováno z UCSC Genome Browser). (B) Reprezentativní výsledky jednotlivých metod u vzorků mužské gDNA. Symboly +, – značí, zda byla gDNA před amplifikací štěpena pomocí metylačně senzitivního restričního enzymu (*HpaII/HhaI*), či nikoli. L, standard.

Takto byly navrženy metody I, II, III, IV a V, využívající oblasti genů *RPS6KA3*, *CNKSR2*, *RPS6KA6*, *TMEM185A* a *HMGB3* (pozice na chromosomu X je naznačena na obr. 23A). Žádná ze studovaných oblastí nebyla amplifikována pomocí PCR u mužské gDNA, která byla v předchozím kroku štěpena pomocí metylačně senzitivního restriktivního enzymu (obr. 23B). Tyto oblasti tudíž nejsou metylované u aktivního chromosomu X.

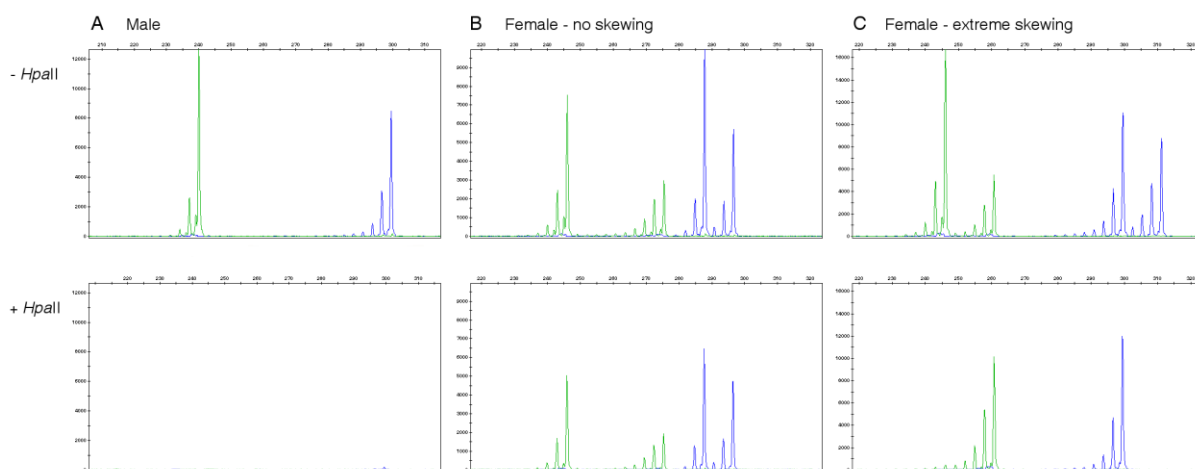
Nové metody byly dále validovány porovnáním jejich výsledků s výsledky standardní metody AR-MSP. Metoda AR-MSP je technicky náročnější varianta metody HUMARA založená na metylačně specifickém PCR, ale její výhodou je, že v každém vzorku je stanoven poměr XCI nejen na základě inaktivních chromosomů X, 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 (na škále 0-100 %) byla pozorována velmi vysoká korelace mezi AR-MSP a metodou HUMARA (Pearsonův korelační koeficient $r = 0,926$, $p < 0,001$). Průměrný rozdíl (MD) mezi metodami byl 0,5 % a standardní odchylka (SD) $\pm 7,9$ %. Výsledky srovnání AR-MSP s transkripčními metodami (TA) jsou zpracovány na obr. 24. I zde byla zjištěna vysoká korelace a dobrá shoda výsledků. Proto byly pro další použití výsledky metody AR-MSP považovány za referenční a byly využity pro validaci nových metod.



Obr. 24: 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. Před použitím jednotlivých metod bylo zjištěno, zda jsou využívány STR oblasti v jednotlivých oblastech polymorfni, tzn. jestli při amplifikaci vznikají délkově odlišené produkty. Metody pak byly považovány za informativní, jestliže vznikaly dva produkty lišící se nejméně o dvě jednotky repetice. 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. Měření poměru XCI bylo u těchto vzorků provedeno tak, jak je popsáno v metodické sekci. Reprezentativní výsledky metod IV a V jsou uvedeny na obrázku (obr. 25).



Obr. 25: 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 zešikmením XCI ukazují, že jedna alela přítomná u neštěpeného vzorku prakticky chybí u štěpeného vzorku.

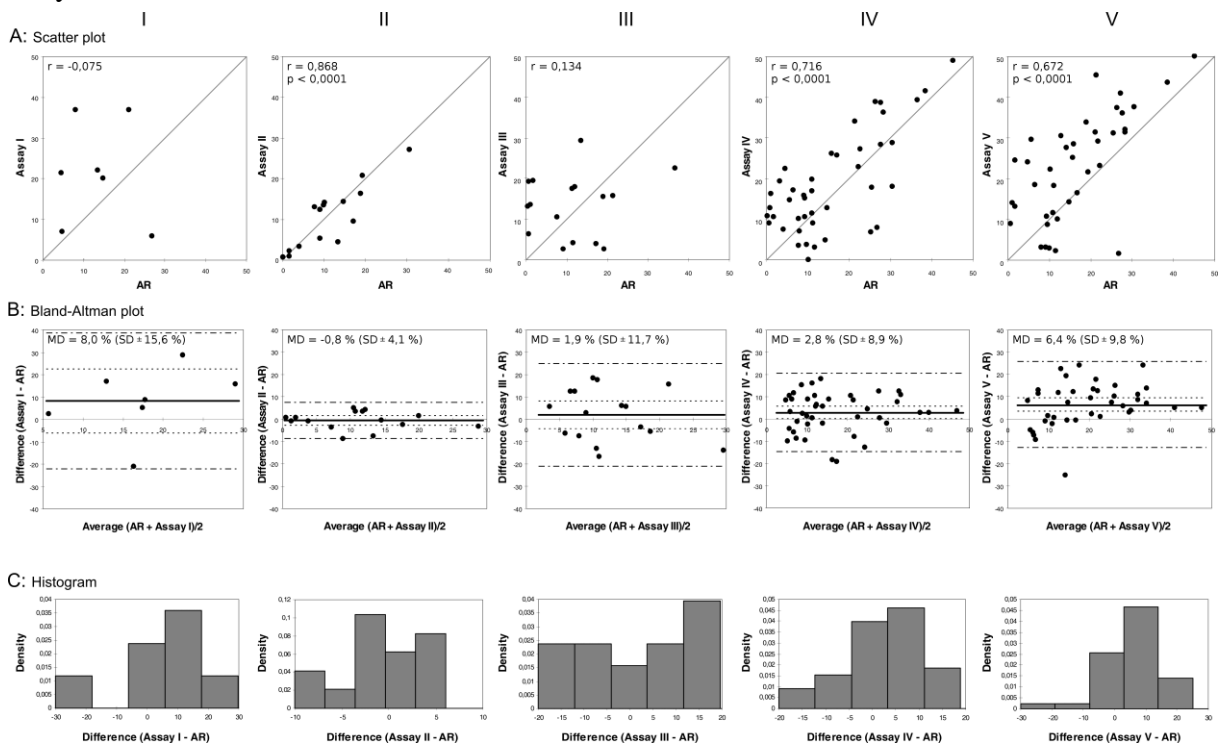
Měření poměru XCI jednotlivými metodami bylo u každého vzorku provedeno dvakrát a na základě toho byl stanoven koeficient opakovatelnosti, který reprezentuje maximální rozdíl dvou opakovaných měření (s 95% pravděpodobností). Pro jednotlivé metody měl koeficient hodnotu: 8,6 % u AR-MSP, 3,6 % u metody HUMARA (obdobný výsledek v Busque L. et al., 2009), 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. 5) lze vyčíst, že mezi studiemi není významný rozdíl v procentuálním zastoupení žen s vysokým zešikmením XCI.

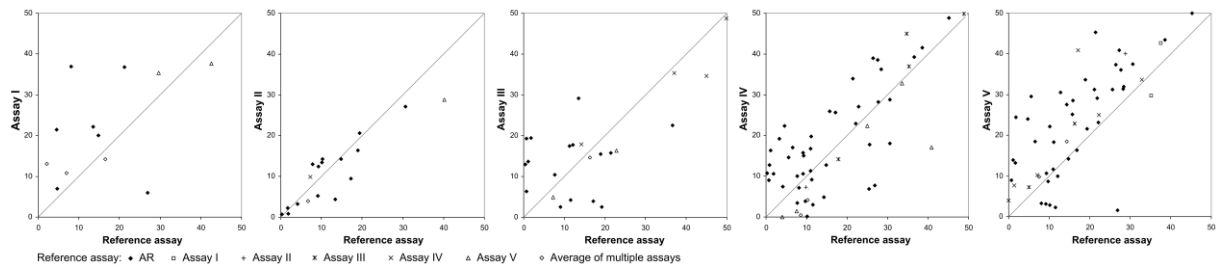
Poměr XCI	> 80:20	> 90:10	> 95:5
naše studie	17,4 %	4,7 %	2,3 %
Amos-Landgraf et al., 2006	14,2 %	3,6 %	1,7 %

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. 26 je uvedeno srovnání X-Y grafů, Bland-Altmanových grafů a také histogramy pro posouzení normality. Na obr. 27 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.



Obr. 26: 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. 27: 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.

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 ostatními novými metodami a toto srovnání naopak ukazovalo velmi dobrou shodu. V každém případě šlo ale o velmi malý počet vzorků. Obdobných výsledků bylo dosaženo i u metody III. Ta byla více informativní, ale bohužel 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.

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 polymorfni 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 přinášejí 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 navrhují 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 (no. 79, tab. S1), 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. 24 a 26), kde se jedná o bod nejbzdálenější 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 repeticích, 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.

4.4 Aplikace nových metod pro stanovení zešikmení chromosomu X

Vyvinuté metody pro stanovení poměru X-inaktivace jsou vhodné i pro ostatní aplikace, ve kterých se využívá metoda HUMARA, například pro určení klonality nádorových tkání. Nicméně jejich hlavní výhodou spočívá v měření poměru XCI u vysokého procenta vzorků, u kterých metoda HUMARA není informativní. Naše nové 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.

4.4.1 Analýza poměrů XCI u dívky s velmi vzácnou manifestací MPS II

Prevalence MPS II se pohybuje v rozmezí 0,43-1,09 na 100 000 živě narozených dětí (Poupetova H. et al., 2010). Drtivá většina pacientů jsou muži a v literatuře nalezneme pouze omezené množství symptomatických žen (viz tab. 7). Jedna z těchto žen (no. 7) 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 (např. no. 1 a 16) způsobeno strukturní abnormalitou. Tabulka navíc ukazuje, že 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 (chrápání, problémy s řečí a se sluchem) 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* (tab. 6), zatímco aktivity celé řady dalších lysosomálních enzymů byly v kontrolním rozmezí (ukázáno na příkladu dvou enzymů).

Tab. 6: Aktivity lysosomálních enzymů v leukocytech a séru.

Zdroj	Enzym (typ MPS)	Aktivita enzymu (nmol/mg/1-17h)			
		Pacientka	Matka	Otec	Kontroly
Leukocyty	β -galaktosidasa (kontrolní enzym)	144	175	146	95-272
	α -iduronidasa (MPS I)	35			18,1-57,5
	iduronát-2-sulfatasa (MPS II)	0,46	49,2		28,1-70,4
Sérum	iduronát-2-sulfatasa (MPS II)	19			364-954

Tab. 7: Seznam případů patientek s manifestací MPS II a odkazy na literaturu.

No.	Genetický defekt	Příčina klinické manifestace	Metodika stanovení poměru XCI	Výsledek stanovení	Situace u příbuzných	Ref.
1	Reciproká translokace t(X;5) (q28;q33) porušující gen <i>IDS</i>	Porušení genu <i>IDS</i> + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	BrdU značení	Pozdní replikace normálního chromosomu X	Translokace u rodičů nenalezena	Mossman J. et al., 1983; Roberts S.H. et al. 1989
2	del(Xq25) + mutace v genu <i>IDS</i>	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	BrdU značení	Pozdní replikace chromosomu X s delecí	Delece u rodičů nenalezena, u matky snížená aktivita <i>IDS</i>	Broadhead D.M. et al., 1986
3	Delece oblasti Xq27.3-q28	Delece paternálním chr. X + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>DXS255</i> ; hybridní buňky; analýza <i>IDS</i> cDNA	Pouze paternální (mutovaný) chromosom X je aktivní	Delece u matky nenalezena, matka má vyrovnaný poměr XCI	Clarke J.T. et al., 1990; 1991; 1992
4	Informace nedostupná	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>DXS255</i>	Zešikmení X-inaktivace	Identické dvojčete nemanifestuje MPS II a má vyrovnaný poměr XCI	Winchester B. et al., 1992
5	c.1403G>A (p.R468Q)	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Hybridní buňky; metylace <i>AR</i> ; restriční analýza <i>IDS</i> cDNA	Pouze maternální (mutovaný) chromosom X je aktivní	Matka (het.) má vyrovnaný poměr XCI	Sukegawa K. et al., 1997
6	c.1403G>T (p.R468L)	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>AR</i> ; restriční analýza <i>IDS</i> cDNA	Pouze maternální (mutovaný) chromosom X je aktivní	Matka (het.) má vyrovnaný poměr XCI	Sukegawa K. et al., 1998
7	p.L41P (homozygotně)	Obě alely defektní	Metylace <i>DXS255</i> , <i>MAOA</i> , <i>AR</i>	Extrémní zešikmení, nedáváno do souvislosti s onemocněním	Matka (het.) má vyrovnaný poměr XCI	Cudry S. et al., 2000
8	Delece 3254bp včetně celého exonu 8, inserce 20bp	Delece na paternálním chr. X + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>DXS255</i> , <i>MAOA</i> , <i>AR</i> , <i>FMRI</i>	Pouze paternální (mutovaný) chromosom je aktivní	Mutace u rodičů nenalezena, matka a sestra mají vyrovnaný poměr XCI	Cudry S. et al., 2000
9	Delece c.706-719, inserce G	Delece na maternálním chr. X + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>AR</i> , sekvenování <i>IDS</i> cDNA	Pouze maternální (mutovaný) chromosom je aktivní	Matka (het.) má vyrovnaný poměr XCI	Tuschl K. et al., 2005
10	Intragenová inverze (rekombinace gen-pseudogen)	Inverze na maternálním chr. X + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>AR</i>	Pouze maternální (mutovaný) chromosom je aktivní	Matka (het.) - poměr XCI nestanoven/neukázán	Manara et al., 2010
11	c.1327C>T (p.R443*)	Mutace jedné alely + předpokládáno zešikmení XCI	Metylace <i>AR</i> , <i>FMRI</i>	Metody nejsou informativní	Dcera (het.) - poměr XCI nestanoven	Sohn Y.B. et al., 2010
12	c.1568A>G (p.Y523C)	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>AR</i>	97:3, maternální (mutovaný) chromosom je preferenčně aktivní	Matka, teta, babička (het.) mají poměr XCI (20:80, 30:70 a 74:26)	Kloska A. et al., 2011
13	c.879G>A (p.Y285Efs*47, sestřihová mutace)	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>AR</i> ; sekvenování <i>IDS</i> cDNA	>95:5, maternální (mutovaný) chromosom je preferenčně aktivní	Matka, sestra (het.) mají vyrovnaný poměr XCI (40:60 u matky)	Zhang H. et al., 2011
14	Delece exonů 1-4 (min. rozmezí: c.1-103_184del)	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Nespecifikováno	Neukázáno	Delece u matky a sestry nenalezena (extrémní poměry XCI), otec zdravý	Jurecka A. et al., 2012
15	c.1327C>T (p.R443*)	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>AR</i>	92:8 (parentální původ nespecifikován)	Mutace u matky a sestry nenalezena, otec zdravý	Piña-Aguilar R.E. et al., 2013
16	Reciproká translokace t(X;9) (q28;q12) nepoškozující <i>IDS</i>	Poškození regulace exprese <i>IDS</i> + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	BrdU značení; metylace <i>AR</i>	100:0, paternální chromosom (s translokací) je preferenčně aktivní	Translokace u rodičů nenalezena	Lonardo F. et al., 2014
17	c.1403G>A (p.R468Q)	Mutace jedné alely + zešikmení XCI (inaktivace WT alely)	Metylace <i>AR</i> , <i>CNKSR2</i> ; transkripční metoda (<i>LAMP2</i>)	>96:4, paternální (mutovaný) chromosom je preferenčně aktivní	Mutace u rodičů nenalezena, matka má vyrovnaný poměr XCI	Řeboun M. et al., 2016

Poměry XCI jsou udávány ve formátu aktivní X_{mut} : X_{WT} . Zkratka „het.“ označuje heterozygotně přítomnou mutaci, bez manifestace.

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), má závažné dopady na enzymovou aktivitu a procesování proteinu IDS (Sukegawa-Hayasaka K. et al., 2006) a u rodičů nebyla nalezena. Žádné další patogenní změny při vyšetření možnosti rekombinace mezi genem a pseudogenem a při analýze delecí/duplikací metodou MLPA nebyly nalezeny.

Kvůli možnosti somatického mosaicismu u rodičů, bylo u DNA izolované z tří buněčných typů (periferní leukocyty, močový sediment a bukální stěry) provedeno hluboké sekvenování PCR amplikonů. Počet čtení mutované alely byl u všech vzorků pod detekčním limitem (< 0,5 %), somatický mosaicismus tudíž nebyl nalezen, ale germinální mosaicismus vyloučit nelze.

Vyšetření metylace v oblasti genu *AR* ukázalo u pacientky extrémní zešíkmení jak v leukocytech získaných z krve, tak u bukálních stěrů (tab. 8). Maternální alela byla téměř kompletně inaktivována. Stejný výsledek byl nalezen při vyšetření genu *CNKSR2*. Při vyšetření transkriptů hlubokým sekvenováním byla u genu *LAMP2* nalezena zdánlivá homozygotita pro paternální alelu c.156A a u genu *IDS* exkluzivní exprese mutované alely.

Tab. 8: 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 (PBMC) byly připraveny dvě iPSC buněčné linie. Tyto buňky byly pozitivní pro charakterické markery pluripotence (Oct3/4, SSEA4, anti-TRA-1-81, Lin28 a Sox2) a měly výrazně sníženou aktivitu enzymu IDS (1,49 a 2,32 nmol/mg/h) ve srovnání s kontrolami (17,15 a 21,32 nmol/mg/h). Tyto linie měly potenciál se diferencovat do kardiomyocytů a neuronálních buněk. Analýza poměru XCI u těchto dvou iPSC klonů, 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

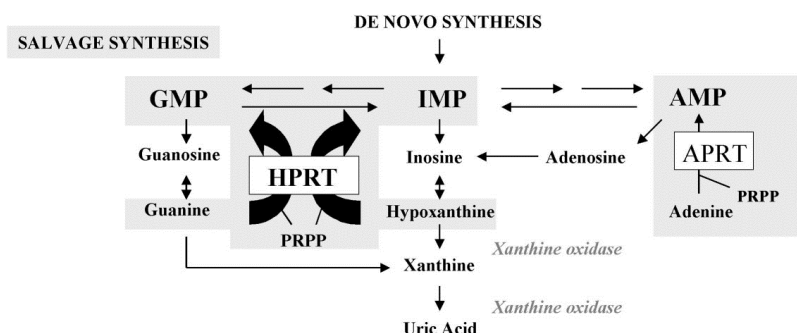
iPSC) a resetování X-inaktivace (Gafni O. et al., 2013), nedošlo ke změně poměru XCI. Pro tento výsledek existují tři vysvětlení: 1) chromosom X zůstal inaktivní a nedošlo k resetování X-inaktivace, 2) k resetování došlo, ale chromosom X není posléze inaktivován náhodně, 3) část buněk dosáhla reprogramovaného 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.

Jak je ukázáno v tabulce 7, extrémní zešikmení (> 95:5) ve prospěch aktivní mutované alely je velmi častým jevem u symptomatických pacientek s MPS II (zatímco jejich také 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 zešikmení 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.

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

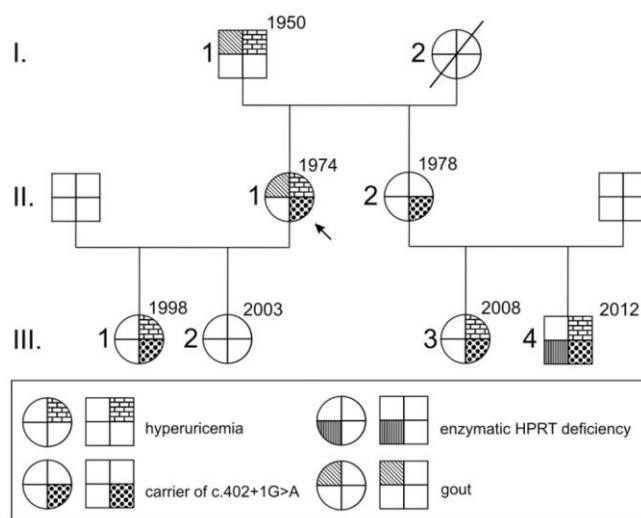
Deficit hypoxantin-guaninfosforibosyltransferasy (HPRT/HGPRT) je vrozenou poruchou purinového metabolismu, u které rozpoznáváme odlišné formy onemocnění. Enzym HPRT (EC 2.4.2.8) je kódován genem *HPRT1* v oblasti Xq26.2 a má centrální roli ve zpětném využití produktů katabolismu purinových nukleotidů (viz obr. 28).



Obr. 28: HPRT katalyzuje za přítomnosti fosforibosylpyrofosfátu (PRPP) dvě obdobné reakce: konverzi guaninu na guanosinmonofosfát (GMP) a hypoxantinu na inosinmonofosfát (IMP). Adaptováno z literatury (Torres R.J. a Juan G.P., 2007).

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). Zvýšené množství těchto metabolitů lze detekovat i v moči. 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 sebe-poškozující chování. Heterozygotní ženy bývají asymptomatické. Diagnostika žen na základě biochemických údajů a enzymových aktivit je nespolehlivá (viz dále), což značně komplikuje situaci, není-li identifikována mutace v genu *HPRT1* (Torres R.J. et al., 2012).

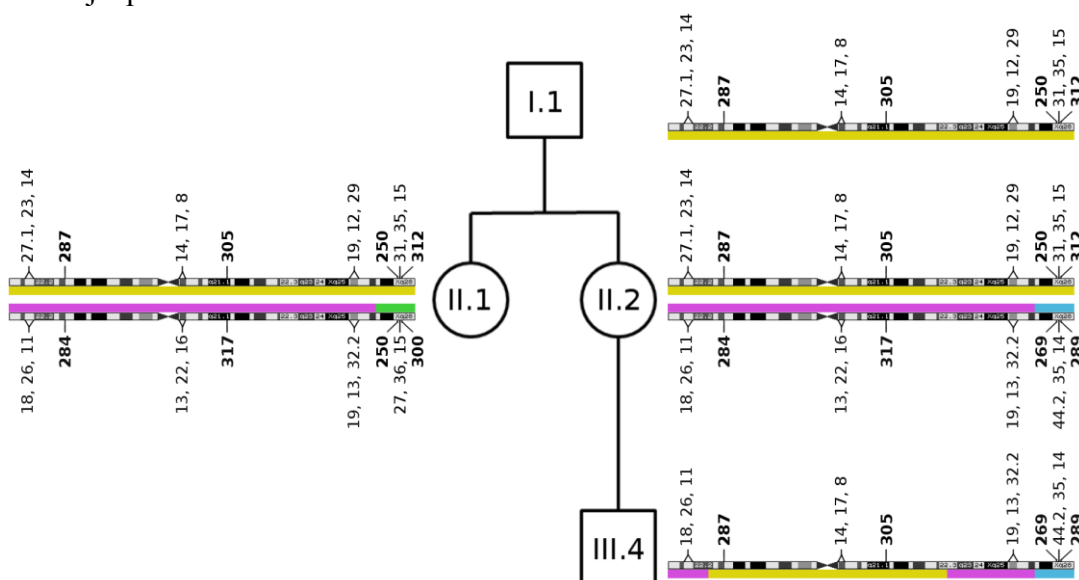
My jsme měli příležitost studovat klinické, biochemické a molekulárně genetické charakteristiky u české rodiny s hyperurikémií a mutací v genu *HPRT1* (Kostalova E. et al., 2015). Rodokmen této rodiny a další údaje jsou zobrazeny na obr. 29.



Obr. 29: 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 sestříhová 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 dnových 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 erytrocytech. Pacient I.1 je léčen pro hyperurikémii a dnu od věku 53 let. Přesnější biochemická, klinická a genetická data jsou shrnuta v článku (Kostalova E. et al., 2015), kde jsou uvedeny i nalezené polymorfismy (rs1165165, rs2231142, rs16890979) urátových transportérů (*SLC17A3*, *ABCG2* a *SLC2A9*) asociované s hyperurikémií (Dehghan A. et al., 2008). 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 (obr. 30). Při analýze poměru XCI byly amplifikovány produkty PCR, jejichž velikost naznačovala, že u chromosomu X došlo při meiotickém dělení k rekombinaci úseků DNA. Tyto výsledky byly zpřesněny pomocí analýzy 12 STR markerů na chromosomu X a potvrzují specifitu našich metod.



Obr. 30: Pozice oblastí využívaných našimi metylačními metodami (tučně) a STR markerů ze soupravy Investigator Argus X-12 (Qiagen) na chromosomu X (schéma bylo adaptováno z UCSC Genome Browser). Čísla uvádějí velikosti PCR produktů v bp (tučně), popř. počet repetice. Názvy STR markerů jsou uvedeny v metodické sekci. U chromosomů jsou barevně označeny oblasti obsahující markery o stejné délce, přesná rozhraní oblastí neznáme a jsou naznačena pouze velmi hrubě.

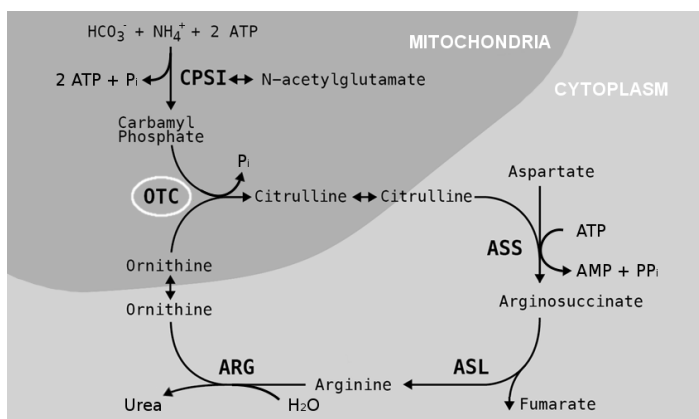
Výsledky stanovení ukázaly extrémní zešikmení ($SD \pm 0,1 \%$) u genomové DNA izolované z leukocytů, tzn. poměr 0,4:99,6 u ženy II.1 a 1,5:98,5 až 0,2:99,8 u ženy II.2, s preferenčně aktivní paternální WT alelou. Stejný výsledek byl nalezen i u dívky III.3 a naznačoval možné sekundární zešikmení v krvi 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. Selekční 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.

4.4.3 Analýza poměrů XCI v explantátu jater dívky s deficitem OTC

Deficit OTC (OMIM #311250) je nejčastější dědičná porucha močovinového cyklu. Gen *OTC* je lokalizován v oblasti Xp21.1 a podléhá inaktivaci. Exprimován je výlučně v jaterních hepatocytech (a střevní mukóze) a kóduje ornitintranskarbamylasu (OTC, E.C. 2.1.3.3.), enzym mitochondriální matrix, který katalyzuje reakci mezi karbamylfosfátem a ornitinem za vzniku citrulinu a fosfátu (obr. 31).

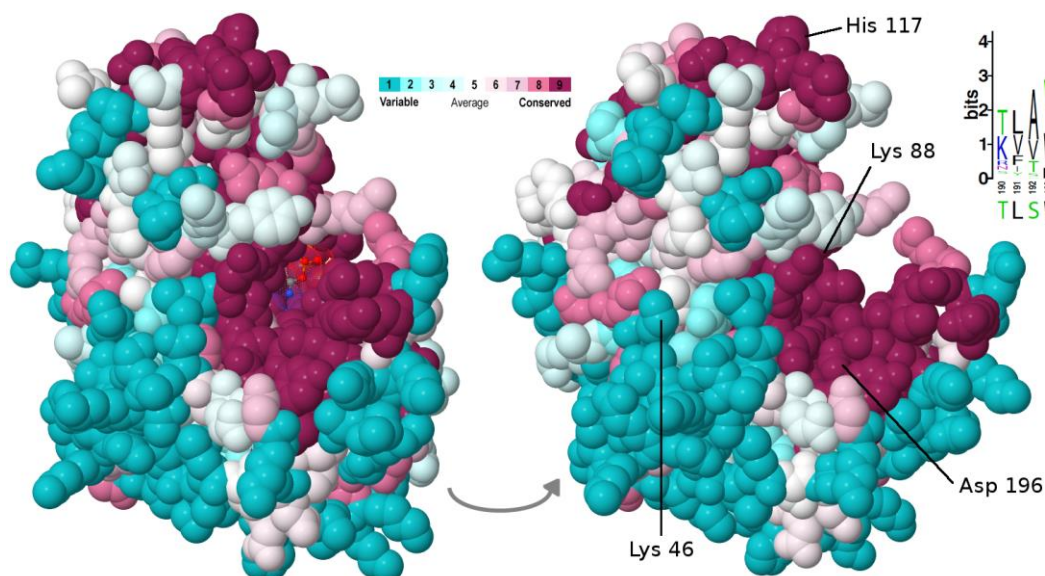


Obr. 31: Schéma močovinového cyklu.

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, jako jsou operace, nehoda (Choi J.H. et al., 2015), vysoký příjem proteinu (Reddy D.B. et al., 2013), poporodní období, hladovění, užití určitých léčiv, chemoterapie a jiné (Cavicchi C. et al., 2014). Onemocnění je dlouhodobě léčeno dietou. Akutní epizody hyperamonémie vyžadují agresivní léčbu snižující koncentraci amoniaku (hemodialýza, peritoneální dialýza, výměnná transfúze) 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. Existuje případ dárkyně, u které se vyvinuly symptomy po darování ~60 % objemu jater, u kterých byl při biopsii normální histologický nálezn. Symptomy se vyvinuly i u jejího bratra, který byl příjemcem (Mukhtar A. et al., 2013). 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 mutaci c.583G>C (p.G195R) v exonu 6 (Choi J.H. et al., 2015; Kim G.H. et al., 2006; Tuchman M.

et al., 1994), kterou sdělila od matky (popsána v Storkanova G. et al., 2013).

Protein OTC je v cytoplazmě syntetizován jako 354 aminokyselin dlouhý preproteín, u něhož je po importu do mitochondrie odstřiženo prvních 32 aminokyselin a vzniká funkční protein v podobě homotrimeru. Aktivní místo je zformováno na rozhraní podjednotek trimeru. Aktivita enzymu je regulována posttranslačním mechanismem, acetylací lysinu 88 v blízkosti aktivního místa (obr. 32), která snižuje enzymovou aktivitu (Yu W. et al., 2009). Deacetylace je zprostředkována mitochondriálním sirtuinem Sirt3, NAD⁺ dependentní deacetylase, která stimuluje OTC při hladovění organismu (Hallows W.C. et al., 2011) a funguje jako metabolický sensor reagující na množství NAD⁺ v mitochondriích. Obdobně např. Sirt5 stimuluje karbamylfosfátsyntetasu (CPS1), další enzym močovinového cyklu (obr. 31) (Nakagawa T. et al., 2009; Li L. et al., 2016).

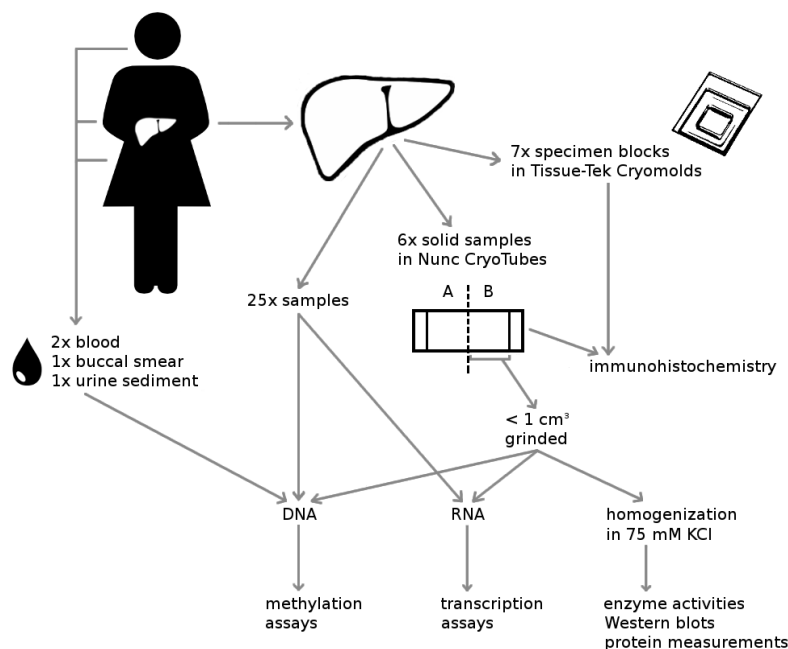


Obr. 32: Struktura lidské formy proteinu OTC (ID: 1EP9; Shi D. et al., 2001) s navázaným karbamylfosfátem. Protein je ukázán ve dvou polohách jako tzv. space-filling model. Barva vyznačuje konzervovanost aminokyselin ve škále 1 (nejnižší, tyrkysová) až 9 (nejvyšší, burgundská fialová), tak jak na základě srovnání sekvence 150 proteinů vypočítal program ConSurf (<http://consurf.tau.ac.il>; Landau M. et al., 2005; Ashkenazy H. et al., 2016). Pro výpočet bylo použito výchozí nastavení. Mutovaná, vysoce konzervovaná aminokyselina glycinu 195 (skóre 9) se ve struktuře nachází pod vyznačeným aspartátem 196. Dále je vyznačen histidin 117 (skóre 9), který doplňuje aktivní místo vedlejší podjednotky, lysin 88 (skóre 9), který podléhá acetylaci sirtuinem Sirt3, a lysin 46 (skóre 1), který v důsledku polymorfismu rs1800321 může být zaměněn za arginin. Vpravo nahoře se nachází zjednodušená reprezentace srovnání 566 forem proteinu OTC (adaptováno ze stránky <http://ureacycle.cnmcresearch.org>). Číslování odpovídá lidské formě proteinu, velikost písmen odpovídá konzervovanosti.

OTC je evolučně vysoce konzervovaný protein a struktura lidské formy byla určena na základě krystalografie (ID v databázi RCSB PDB: 1OTH, 1C9Y, 1EP9 a 1FVO). Identifikovaná missense mutace p.G195R mění vysoce konzervovanou aminokyselinu v ornitin-vazebné doméně (obr. 32), což vede k významné redukci aktivity i množství proteinu (Kogo T. et al., 1998). U chlapců je asociována s neonatální formou onemocnění a

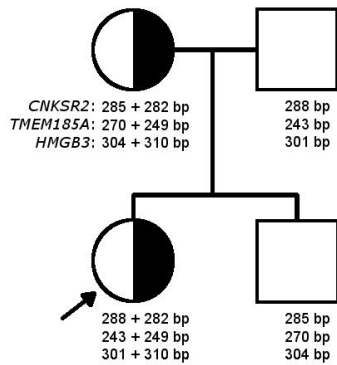
vyskytla se také u dvou dívek, z nichž jedna ve věku 2 let podstoupila transplantaci jater (Choi J.H. et al., 2015). Druhá v dětství prodělala mnoho hyperamonemických příhod a trpí závažnou mentální retardací (Tuchman M. et al., 1994).

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. 33), které byly využity pro studium vlivu X-inaktivace na projevy onemocnění. 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. (směs syntetických pryskyřic a glykolů) a parafínových řezech (neukázáno na obrázku).

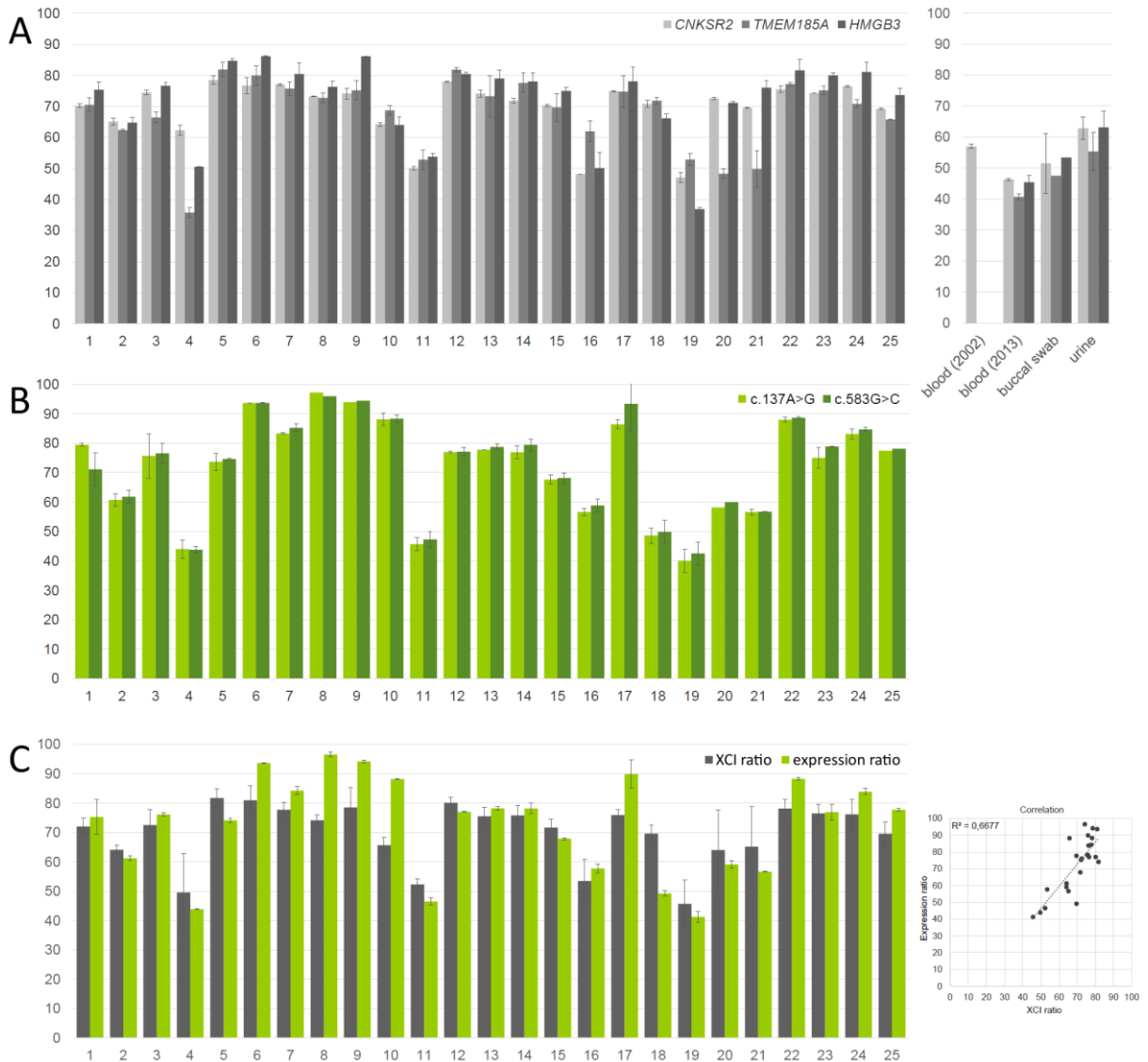


Obr. 33: Schéma zpracování vzorků izolovaných z jater a jiných tkání pacientky.

Pro analýzu poměrů XCI pomocí metod využívajících metylaci DNA nebylo možné využít metodu HUMARA, protože nebyla informativní, ale všechny tři naše publikované metody *CNKS2*, *TMEM185A* a *HMGB3* (Musalkova D. et al., 2015) byly použitelné (obr. 34).



Obr. 34: Délky produktů PCR (v bp) u jednotlivých členů rodiny.



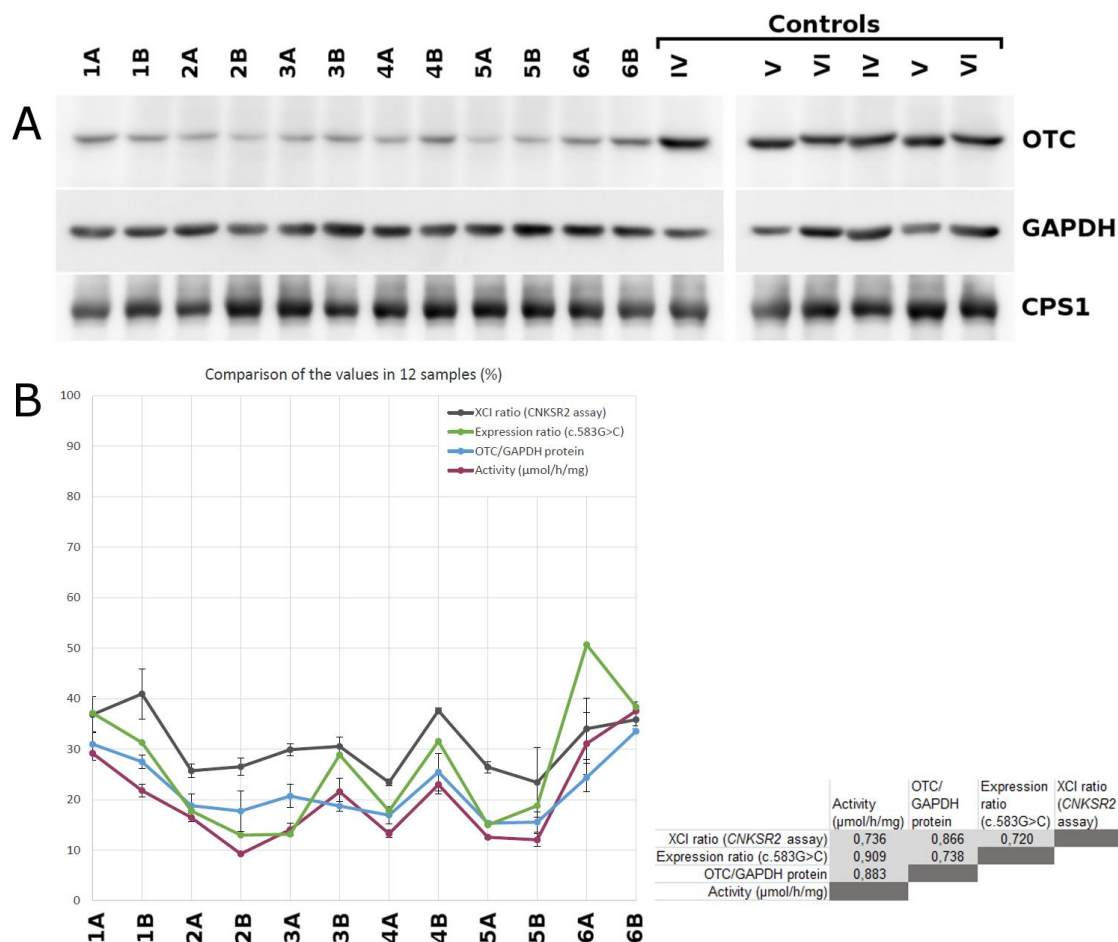
Obr. 35: Srovnání výsledků poměru XCI a exprese alel ve 25 vzorcích získaných z jater (číslováno 1 až 25). (A) Podíl buněk (v %) s aktivním chromosomem X nesoucím mutaci – určeno pomocí tří metod na základě metylace DNA. Výsledky jsou pro srovnání uvedeny i u 2 vzorků krve (rok odběru 2002 a 2013) a vzorku bukkálního stěru a močového sedimentu. U vzorku bukkálního 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.

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. 35A). 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. 35C), které se pohybovaly okolo stejného průměru, ale v širším rozmezí 41:59 až 96:4 (průměr 73:27, obr. 35B).

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). Tato benigní variace má vysokou frekvenci výskytu (0,195) a vyskytuje se často i u hemizygotů. Oproti tomu mutace c.583G>C nebyla identifikována ani u jedné z ~87 000 alel v projektu ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>). 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 (např. ve Wakiya T. et al., 2012), 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. 35A), 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 rozemlety a využity pro stanovení množství proteinu OTC metodou Western blot (obr. 36A) 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. 36B, tab. S2 v příloze, $p < 0,01$). 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 %.



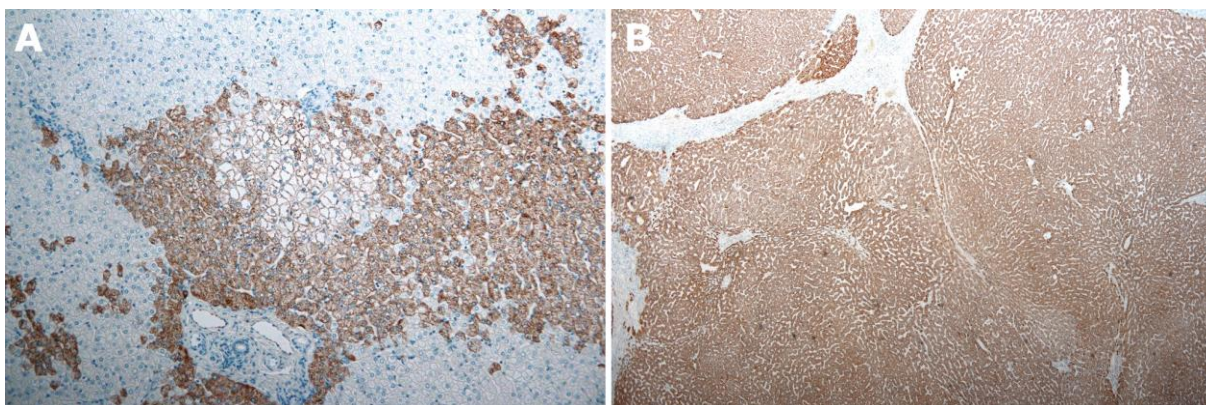
Obr. 36: Srovnání výsledků u vzorků jater získaných od pacientky s deficitem OTC (označeno 1A až 6B) a 3 kontrol (IV, V, VI). (A) Reprezentativní výsledky Western blotu – detekce proteinu OTC, GAPDH a CPS1. Kontrola IV byla použita pro sjednocení výsledků ze dvou gelů. Byla nanášena na první gel společně 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.

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 (viz obr. 37). 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, hvězdicovité 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 intra-

organovou variací 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 $\alpha = 0,05$).

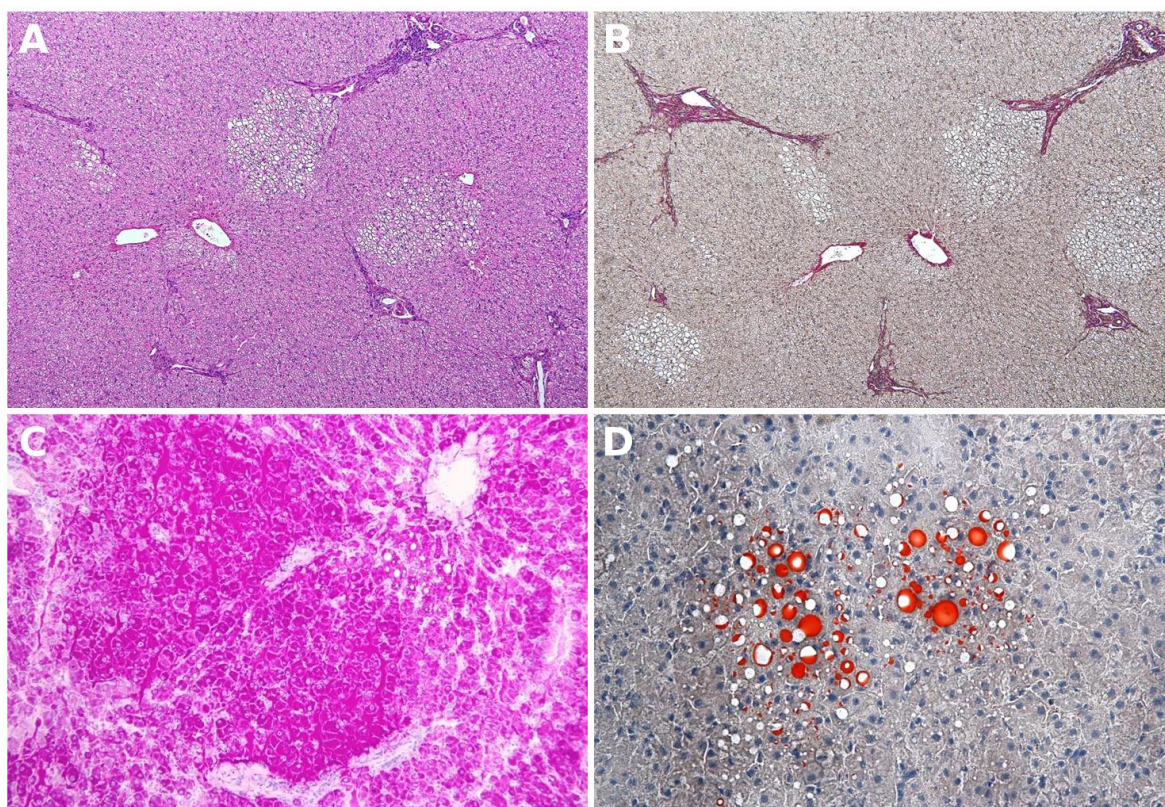


Obr. 37: Imunohistochemická analýza jater, detekce proteinu OTC. (A) pacientka s deficitem OTC, x200; (B) kontrola (etylická cirhóza), x40. V játrech pacientky je patrný mosaicismus exprese OTC a fokální glykogenosa (světlý ostrůvek) v pozitivní oblasti.

Po stránce histopatologické byla pro játra charakteristická fokální glykogenosa, steatosa a mírná fibrosa (obr. 38). Jak je vidět na předchozím obrázku (obr. 37), 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; Yaplito-Lee J. et al., 2013; Carpentieri D. et al., 2015). Společné 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.



Obr. 38: Histopatologická analýza jater pacientky s deficitem OTC. (A) parafinový řez, HE (hematoxylin-eosin, základní přehled), x100; (B) parafinový řez, VgE1 (van Gieson, barvení kolagenních a elastických vláken), x100; (C) zmrazená tkáň, PAS (periodic acid Schiff, barvení glykogenu a neutrálních polysacharidů), x400; (D) zmrazená tkáň, Sudan (Oil Red O, barvení neutrálních tuků), x400. V játrech je patrná fokální glykogenosa (světlé ostrůvky v panelu A a B, syté v C), steatosa (C, D) a mírná fibrosa (B). Ostrůvky glykogenosy jsou diastasa sensitivní (tzn. nebarví se v PAS po inkubaci s enzymem, neukázáno).

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 po nástupu puberty nestačily k udržení metabolické kompenzace a vedly k opakovaným episodám hyperamonémie.

5 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 stádavých 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. Sestříhová 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.

6 Seznam zkratek

4-MU	4-metylbelliferon
ABCD	ATP-binding cassette transporter, family D
ALP	alkalická fosfatasa
AR	androgenní receptor
ATP	adenosin-5'-trifosfát
β -Gluc	β -glukocerebrosidasa
β -Hex	β -hexosaminidasa
bp	pár bazí DNA/RNA
BrdU	bromodeoxyuridin
BSA	bovinní sérový albumin
Cat	katalasa
CLEAR	coordinated lysosomal expression and regulation
CpG	kovalentně spojené nukleotidy C a G
CPS1	karbamylfosfátsyntetasa 1
CTCF	CCCTC-binding factor
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
ddNTPs	2',3'-dideoxynukleosid-5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA metyltransferasa
dNTPs	2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát
G6PD	glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
GAG	glykosaminoglykan
GAPDH	glyceraldehyded-3-fosfátdehydrogenasa
GLA	α -galaktosidasa A
GFP	zelený fluorescenční protein
HDAC	histondeacetylasa
HGSNAT	acetyl-CoA: α -glukosaminid <i>N</i> -acetyltransferasa
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
HPRT	hypoxantin-guaninfosforibosyltransferasa
hPS	lidské pluripotentní kmenové buňky
HUMARA	metoda pro stanovení poměru XCI využívající gen <i>AR</i>
ID	porucha intelektu
IDS	iduronátsulfatasa
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky
KO	knockout
LAMP	lysosomálně asociovaný membránový protein
LIMP	lysosomálně integrovaný membránový protein
LM	lysosomální membrána
LRO	organely příbuzné lysosomům
LSD	lysosomální střídává onemocnění
M6PR	manosa-6-fosfátový receptor
ManR	manosový receptor
MD	průměrný rozdíl mezi metodami
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MME	methionin metylester
MPS	mukopolysacharidosa

MSP	metylačně specifické PCR
NPC	Niemann-Pickova choroba typu C
OMIM	online Mendelian inheritance in man
OP	organelová peleta/koncentrát
OTC	ornititranskarbamylasa
PAR	pseudoautosomální oblast
PB	periferní krev
PBMC	mononukleární buňky periferní krve
PBS	fosfátový pufr s NaCl
PCR	polymerasová řetězová reakce
PNS	postnukleární supernatant
PRC	Polycomb represivní komplex
RAP	RNA antisense purification
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
n_i	refrakční index
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
RT-PCR	PCR spojené s reverzní transkripcí (popř. real-time PCR)
SD	směrodatná odchylka
SDH	sukcinátdehydrogenasa
<i>SHOX</i>	short stature homeobox
SNP	jednobázový polymorfismus
<i>SRY</i>	Sex-determining region Y
STR	krátká tandemová repetice
TA	transkripční metoda
TAD	topologicky asociovaná doména
TFEB	transkripční faktor EB
TMEM	transmembrane protein
<i>TSIX</i>	antisense ke <i>XIST</i>
UCSC	University of California, Santa Cruz
WT	wild-type
Xa	aktivní chromosom X
<i>XACT</i>	X-active specific transcript
XAR	X-added region
<i>Xce</i>	X-controlling element
XCI	inaktivace chromosomu X
Xi	inaktivní chromosom X
<i>XIC</i>	X-inactivation center
<i>XIST</i>	X-inactive specific transcript
XLID	X-vázaná porucha intelektu
Xm	maternální chromosom X
Xp	paternální chromosom X; krátké raménko chromosomu X

7 Použitá literatura

- Aivado M, Gattermann N, Rong A, Giagounidis AA, Prall WC, Czibere A, Hildebrandt B, Haas R, Bottomley SS. 2006. X-linked sideroblastic anemia associated with a novel ALAS2 mutation and unfortunate skewed X-chromosome inactivation patterns. *Blood Cells Mol Dis* 37:40–45.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. 1992. Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 51:1229-1239.
- 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.
- Andreu N, Andreu N, Pujol-Moix N, Martinez-Lostao L, Oset M, Muñiz-Diaz E, Estivill X, Volpini V, Fillat C. 2003. Wiskott–Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation, *Blood Cells Mol Dis* 31:332–337.
- Anguera MC, Sadreyev R, Zhang Z, Szanto A, Payer B, Sheridan SD, Kwok S, Haggarty SJ, Sur M, Alvarez J, Gimelbrant A, Mitalipova M, Kirby JE, Lee JT. 2012. Molecular signatures of human induced pluripotent stem cells highlight sex differences and cancer genes. *Cell Stem Cell* 11:75-90.
- Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, Öllinger K. 2013. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol* 5:214-226.
- Arai K, Kanaseki T, Ohkuma S. 1991. Isolation of highly purified lysosomes from rat liver: identification of electron carrier components on lysosomal membranes. *J Biochem* 110:541-547.
- Archer H, Evans J, Leonard H, Colvin L, Ravine D, Christodoulou J, Williamson S, Charman T, Bailey MES, Sampson J, de Klerk N, Clarke A. 2007. Correlation between clinical severity in patients with Rett syndrome with a p.R168X or p.T158M *MECP2* mutation, and the direction and degree of skewing of X-chromosome inactivation. *J Med Genet* 44:148-152.
- Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, Ben-Tal N. 2016. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res* 44:W344-350.
- Augui S, Nora EP, Heard E. 2011. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat Rev Genet* 12:429-442.
- Avner P, Heard E. 2001. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2:59-67.
- Bacher CP, Guggiari M, Bros B, Augui S, Clerc P, Avner P, Eil R, Heard E. 2006. Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat Cell Biol* 8:293-299.
- Bachtrog D. 2013. Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nat Rev Genet* 14:113-124.
- Badizadegan K, Perez-Atayde AR. 1997. Focal glycogenosis of the liver in disorders of ureagenesis: its occurrence and diagnostic significance. *Hepatology* 26:365-373.

- Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW. 2005a. Lysosomal membrane proteomics and biogenesis of lysosomes. *Mol Neurobiol* 32:27-41.
- Bagshaw RD, Mahuran DJ, Callahan JW. 2005b. A proteomic analysis of lysosomal integral membrane proteins reveals the diverse composition of the organelle. *Mol Cell Proteomics* 4:133-143.
- Ballabio A. 2016. The awesome lysosome. *EMBO Mol Med* 8:73-76.
- Barakat TS, Loos F, van Staveren S, Myronova E, Ghazvini M, Grootegoed JA, Gribnau J. 2014. The trans-activator RNF12 and cis-acting elements effectuate X chromosome inactivation independent of X-pairing. *Mol Cell* 53:965-978.
- Barr ML, Bertram EG. 1949. A morphological distinction between neurons of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163:676-677.
- 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.
- Bennett CM, Boye E, Neufeld EJ. 2008. Female monozygotic twins discordant for hemophilia A due to nonrandom X-chromosome inactivation. *Am J Hematol* 83:778-780.
- Berletch JB, Yang F, Xu J, Carrel L, Distèche CM. 2011. Genes that escape from X inactivation. *Hum Genet* 130:237-245.
- Bertelsen B, Tümer Z, Ravn K. 2011. Three new loci for determining X chromosome inactivation patterns. *J Mol Diagn* 13:537-540.
- Beutler E, Collins Z, Irwin LE. 1967. Value of genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in tracing the origin of malignant tumors. *N Engl J Med*. 276:389-391.
- Bhatnagar S, Zhu X, Ou J, Lin L, Chamberlain L, Zhu LJ, Wajapeyee N, Green MR. 2014. Genetic and pharmacological reactivation of the mammalian inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111:12591-12598.
- Bicocchi MP, Migeon BR, M. Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, Molinari AC, Corsolini F, Morerio C, Acquila M. 2005. Familiar nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. *Eur J Hum Genet* 13:635-640.
- Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeveva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. 2008. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *J Med Genet* 45:309-313.
- Bland JM, Altman DG. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1:307-310.
- Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, Nekrutenko A, Taylor J. 2010. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol* 89:19.10.1-19.10.21.
- Bolduc V, Chagnon P, Provost S, Dubé MP, Belisle C, Gingras M, Mollica L, Busque L. 2008. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. *J Clin Invest* 118:333-341.
- Boonyawat B, Dhanraj S, Al Abbas F, Zlateska B, Grunenbaum E, Roifman CM, Steele L, Meyn S, Blanchette V, Scherer SW, Swierczek S, Prchal J, Zhu Q, Torgerson TR, Ochs

- HD, Dror Y. 2013. Combined de-novo mutation and nonrandom X-chromosome inactivation causing Wiskott–Aldrich syndrome in a female with thrombocytopenia. *J Clin Immunol* 33:1150–1155.
- Boudewijns M, van Dongen JJM, Langerak AW. 2007. The human androgen receptor X-chromosome inactivation assay for clonality diagnostics of natural killer cell proliferations *J Mol Diagn* 9:337-344.
- Boyd Y, Fraser NJ. 1990. Methylation patterns at the hypervariable X-chromosome locus DXS255 (M27 β): correlation with X-inactivation status. *Genomics* 7:182-187.
- 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.
- Briggs SF, Reijo Pera RA. 2014. X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Curr Opin Genet Dev* 28:78-82.
- Broadhead DM, Kirk JM, Burt AJ, Gupta V, Ellis PM, Besley GT. 1986. Full expression of Hunter’s disease in a female with an X-chromosome deletion leading to non-random inactivation. *Clin Genet* 30:392-398.
- Brown CJ, Ballabio A, Ruper JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF. 1991. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 349:38-44.
- 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, Garreton 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.
- Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG. 1996. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* 88:59-65.
- Busque L, Paquette Y, Provost S, Roy DC, Levine RL, Mollica L, Gilliland DG. 2009. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. *Blood* 113:3472-3474.
- Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, Mollica L, Li J, Viale A, Hequy A, Hassimi M, Socci N, Bhatt PK, Gonen M, Mason CE, Melnick A, Godley LA, Brennan CW, Abdel-Wahab O, Levine RL. 2012. Recurrent somatic *TET2* mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet* 44:1179-1181.
- Callahan JW, Bagshaw RD, Mahuran DJ. 2009. The integral membrane of lysosomes: its proteins and their roles in disease. *J Proteom* 72:23-33.
- Cang C, Aranda K, Seo YJ, Gasnier B, Ren D. 2015. TMEM175 is an organelle K(+) channel regulating lysosomal function. *Cell* 162:1101-1112.
- 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.
- Carrel L, Willard HF. 1996. An assay for X inactivation based on differential methylation at

- the fragile X locus, *FMRI*. *Am J Med Genet* 64:27-30.
- Carrel L, Willard HF. 2005. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434:400-404.
- Carrel L, Park C, Tyekucheva S, Dunn J, Chiaromonte F, Makova KD. 2006. Genomic environment predicts expression patterns on the human inactive X chromosome. *PLoS Genet* 2:e151.
- Cavicchi C, Donati M, Parini R, Rigoldi M, Bernardi M, Orfei F, Gentiloni Silveri N, Colasante A, Funghini S, Catarzi S, Pasquini E, la Marca G, Mooney S, Guerrini R, Morrone A. 2014. Sudden unexpected fatal encephalopathy in adults with *OTC* gene mutations—Clues for early diagnosis and timely treatment. *Orphanet J Rare Dis* 9:105.
- Cazzola M, May A, Bergamaschi G, Cerani P, Rosti V, Bishop DF. 2000. Familial-skewed X-chromosome inactivation as a predisposing factor for late-onset X-linked sideroblastic anemia in carrier females. *Blood* 96:4363–4365.
- Chahrour M, Zoghbi HY. 2007. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56:422-437.
- Chaligné R, Heard E. 2014. X-chromosome inactivation in development and cancer. *FEBS Lett* 588:2514-2522.
- Chang SC, Tucker T, Thorogood NP, Brown CJ. 2006. Mechanisms of X-chromosome inactivation. *Frontiers Biosci* 11:852-866.
- Chapel A, Kieffer-Jaquinod S, Sagné C, Verdon Q, Ivaldi C, Mellal M, Thirion J, Jadot M, Bruley C, Garin J, Gasnier B, Journet A. 2013. An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Mol Cell Proteomics* 12:1572-1588.
- Chen GL, Prchal JT. 2007. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood* 110:1411-1419.
- Cho SY, Lam CW, Tong SF, Siu WK. 2013. X-linked glycogen storage disease IXa manifested in a female carrier due to skewed X chromosome inactivation. *Clin Chim Acta* 426:75-78.
- 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.
- Chu C, Zhang QC, da Rocha ST, Flynn RA, Bharadwaj M, Calabrese JM, Magnuson T, Heard E, Chang HY. 2015. Systematic discovery of Xist RNA binding proteins. *Cell* 161:404-416.
- Clarke JT, Willard HF, Teshima I, Chang PL, Skomorowski MA. 1990. Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) in a karyotypically normal girl. *Clin Genet* 37:355-362.
- Clarke JT, Greer WL, Strasberg PM, Pearce RD, Skomorowski MA, Ray PN. 1991. Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of the X chromosomes in a karyotypically normal girl. *Am J Hum Genet* 49:289-297.
- Clarke JT, Wilson PJ, Morris CP, Hopwood JJ, Richards RI, Sutherland GR, Ray PN. 1992. Characterization of deletion at Xq27-q28 associated with unbalanced inactivation of the nonmutant X chromosome. *Am J Hum Genet* 51:316-322.
- Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB. 1996. XIST RNA paints the inactive X

- chromosome at interphase: evidence for novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol* 132:259-275.
- Clemson CM, Hall LL, Byron M, McNeil J, Lawrence JB. 2006. The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7688-7693.
- Clerc P, Avner P. 2006. Random X-chromosome inactivation: skewing lessons for mice and men. *Curr Opin Genet Dev* 16:246-253.
- Conzelmann E, Sandhoff K. 1983. Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci* 6:58-71.
- Core LJ, Waterfall JJ, Lis JT. 2008. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322:1845–1848.
- Cotton AM, Lam L, Affleck JG, Wilson IM, Peñaherrera MS, McFadden DE, Kobor MS, Lam WL, Robinson WP, Brown CJ. 2011. Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation. *Hum Genet* 130:187-201.
- Cotton AM, Ge B, Light N, Adoue V, Pastinen T, Brown CJ. 2013. Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. *Genome Biol* 14:R122.
- 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.
- Csankovszki G, Panning B, Bates B, Pehrson JR, Jaenisch R. 1999. Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. *Nat Genet* 22:323-324.
- Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. 2001. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153:773-784.
- Cudry S, Tigaud I, Froissart R, Bonnet V, Maire I, Bozon D. 2000. MPS II in females: molecular basis of two different cases. *J Med Genet* 37:E29.
- Daza-Cajigal V, Martínez-Pomar N, Garcia-Alonso A, Heine-Suner D, Torres S, Vega AK, Molina IJ, Matamoros N. 2013. X-linked thrombocytopenia in a female with a complex familial pattern of X-chromosome inactivation. *Blood Cells Mol Dis* 51:125–129.
- Da Rocha ST, Boeva V, Escamilla-Del-Arenal M, Ancelin K, Granier C, Matias NR, Sanulli S, Chow J, Schulz E, Picard C, Kaneko S, Helin K, Reinberg D, Stewart AF, Wutz A, Marqueron R, Heard E. 2014. Jarid2 is implicated in the initial Xist-induced targeting of PRC2 to the inactive X chromosome. *Mol Cell* 53:301-316.
- 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 Duve C, Pressman B, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. 1955. Tissue fractionation studies: intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 64:604-617.

- De Gregorio L, Nyhan WL, Serafin E, Chamoles NA. 2000. An unexpected affected female patient in a classical Lesch-Nyhan family. *Mol Genet Metab* 69:263-268.
- De Gregorio L, Jinnah HA, Harris JC, Nyhan WL, Schretlen DJ, Trombley LM, O'Neill JP. 2005. Lesch-Nyhan disease in a female with a clinically normal monozygotic twin. *Mol Genet Metab* 85:70-77.
- Dehghan A, Köttgen A, Yang Q, Hwan SJ, Kao WL, Rivadeneira F, Boerwinkle E, Levy D, Hofman A, Astor BC, Benjamin EJ, van Duijn CM, Witteman JC, Coresh J, Fox CS. 2008. Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet* 372:1953-1961.
- 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.
- Deng X, Hiatt JB, Nguyen DK, Ercan S, Sturgill D, Hillier LW, Schlesinger F, Davis CA, Reinke VJ, Gingeras TR, Shendure J, Waterston RH, Oliver B, Lieb JD, Disteche CM. 2011. Evidence for compensatory upregulation of expressed X-linked genes in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 43:1179-1185.
- Deng X, Berletch JB, Ma W, Nguyen DK, Hiatt JB, Noble WS, Shendure J, Disteche CM. 2013. Mammalian X upregulation is associated with enhanced transcription initiation, RNA half-life, and MOF-mediated H4K16 acetylation. *Dev Cell* 25:55-68.
- Deng X, Berletch JB, Nguyen DK., Disteche CM. 2014. X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. *Nat Rev Genet* 15:367-378.
- Desai V, Donsante A, Swoboda KJ, Martensen M, Thompson J, Kaler SG. 2011. Favorable skewed X-inactivation accounts for neurological sparing in female carriers of Menkes disease. *Clin Genet* 79:176-182.
- Diettrich O, Gallert F, Hasilik A. 1996. Purification of lysosomal membrane proteins from human placenta. *Eur J Cell Biol* 69:99-106.
- Diettrich 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.
- Di Michele DM, Gibb C, Lefkowitz JM, Ni Q, Gerber LM, Ganguly A. 2014. Severe and moderate haemophilia A and B in US females. *Haemophilia* 20:e136-e143.
- Disteche CM. 2012. Dosage compensation of the sex chromosomes. *Annu Rev Genet* 46:537-560.
- Dobrovolny R, Dvorakova L, Ledvinova J, Magage S, Bultas J, Lubanda JC, Ellender M, Karetova D, Pavlikova M, Hrebicek M. 2005. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the α -galactosidase A gene in Czech and Slovak population. *J Mol Med* 83:647-654.
- Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, Chan AS, Ho AW, Ting NT, Oosterwijk JC, Ober C. 2004. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet A* 129:136-143.
- Douvaras P, Liu W, Mort RL, McKie L, West KM, Cross SH, Morley SD, West JD. 2012. Normal X-inactivation mosaicism in corneas of heterozygous *Flna*^{Dilp2/+} female mice – a

- model of human filamin A (*FLNA*) diseases. *BMC Res Notes* 5:122.
- Echevarria L, Benistan K, Toussaint A, Dubourg O, Hagege AA, Eladari D, Jabbour F, Beldjord C, De Mazancourt P, Germain DP. 2016. X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin Genet* 89:44-54.
- Elstein D, Schachamov E, Beer R, Altarescu G. 2012. X-inactivation in Fabry disease. *Gene* 505:266-268.
- Emami KH, Burke TW, Smale ST. 1998. Sp1 activation of a TATA-less promoter requires a species-specific interaction involving transcription factor IID. *Nucleic Acids Res.* 26:839–846.
- Engreitz JM, Pandya-Jones A, McDonel P, Shishkin A, Sirokman K, Surka C, Kadri S, Jeffrey Xing, Goren A, Lander ES, Plath K, Guttman M. 2013. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X-chromosome. *Science* 341:1237973.
- Esquilin JM, Takemoto CM, Green NS. 2012. Female factor IX deficiency due to maternally inherited X-inactivation. *Clin Genet* 82:583–586.
- Fan X, Zhang H, Zhang S, Bagshaw RD, Tropak MB, Callahan JW, Mahuran DJ. 2006. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am J Hum Genet* 79:738–744.
- Favier R, Lavergne JM, Costa JM, Caron C, Mazurier C, Viéumont M, Delpech M, Valleix S. 2000. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood* 96:4373-4375.
- Fieremans N, Van Esch H, Holvoet M, Van Goethem G, Devriendt K, Rosello M, Mayo S, Martinez F, Jhangiani S, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR, Vermeesch JR, Marynen P, Froyen G. 2016. Identification of intellectual disability genes in female patients with skewed X-inactivation pattern. *Hum Mutat* 37:804-811.
- Filippova GN, Chenq MK, Moore JM, Truong JP, Hu YJ, Nguyen DK, Tsuchiya KD, Disteche CM. 2005. Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell* 8:31-42.
- Franco B, Ballabio A. 2006. X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders. *Curr Opin Genet Dev* 16:254-259.
- Fratantoni JC, Hall CW, Neufeld EF. 1968. Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science* 162:570-572.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1827-1831.
- 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.
- Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A. 2014. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun* 5:5464.
- Fuller M, Mellett N, Hein LK, Brooks DA, Meikle PJ. Absence of α -galactosidase cross-

- correction in Fabry heterozygote cultured skin fibroblasts. *Mol Genet Metab* 114:268-273.
- 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.
- Galupa R, Heard E. 2015. X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. *Curr Opin Genet Dev* 31:57-66.
- Gasingirwa MC, Thirion J, Costa C, Flamion B, Lobel P, Jadot M. 2008. A method to assess the lysosomal residence of proteins in cultured cells. *Anal Biochem* 374:31-40.
- Gentilini D, Castaldi D, Mari D, Monti D, Franceschi C, Di Blasio AM, Vitale G. 2012. Age dependent skewing of X chromosome inactivation appears delayed in centenarians' offspring. Is there a role for allelic imbalance in healthy aging and longevity? *Aging Cell* 2:277-283.
- Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D, Albert I, Taylor J, Miller W, Kent WJ, Nekrutenko A. 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res* 15:1451-1455.
- Giliberto F, Radic CP, Luce L, Ferreiro V, de Brasi C, Szijan I. 2014. Symptomatic female carriers of Duchenne muscular dystrophy (DMD): Genetic and clinical characterization. *J Neurol Sci* 336:36-41.
- Gill G, Pascal E, Tseng ZH, Tjian R. 1994. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:192-196.
- Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. 1991. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci* 88:6848-6852.
- Giorgetti L, Lajoie BR, Carter AC, Attia M, Zhan Y, Xu J, Chen CJ, Kaplan N, Chang HY, Heard E, Dekker J. 2016. Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse. *Nature* 535:575-579.
- Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Galaxy Team. 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* 11:R86.
- 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.
- Graham JM. 2009. Subcellular fractionation and isolation of organelles. In: *Current protocols in cell biology*, John Wiley & Sons.
- Grover S, Fishman GA, Anderson RJ, Lindeman M. 2000. A longitudinal study of visual function in carriers of X-linked recessive retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 107:386-396.
- 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.
- Hallows WC, Yu W, Smith BC, Devries MK, Ellinger JJ, Someya S, Shortreed MR, Prolla T, Markley JL, Smith LM, Zhao S, Guan KL, Denu JM. 2011. Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Mol Cell* 41:139-149.
- Hansen RS, Canfield TK, Fjeld AD, Gartler SM. 1996. Role of late replication timing in the silencing of X-linked genes. *Hum Mol Genet* 5:1345-1353.
- Hartree EF. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427.
- Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, Tsutui K, Nakagawa S. 2010. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. *Dev Cell* 19:469-476.
- Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL, Penaherrera MS, Brown CJ, Robinson WP. 2004. The dynamics of X inactivation skewing as women age. *Clin Genet* 66:327-332.
- Heard E, Disteche CM. 2006. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X-chromosome. *Genes Dev* 20:1848-1867.
- Hellman A, Chess A. 2007. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 315:1141-1143.
- Hendriks RW, Chen ZY, Hinds H, Schuurman RK, Craig IW. 1992. An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the monoamine oxidase A gene. *Hum Mol Genet* 1:187-194.
- Hers HG. 1963. Alpha glucosidase deficiency in generalised glycogen storage disease (Pompe disease). *Biochem J* 86:11-16.
- Hewetson A, Chilton BS. 2003. An Sp1-NF-Y/progesterone receptor DNA binding dependent mechanism regulates progesterone-induced transcriptional activation of the rabbit RUSH/SMARCA3 gene. *J Biol Chem* 278:40177-40185.
- Holden ST, Cox JJ, Kesterton I, Thomas NS, Carr C, Woods CG. 2006. Fanconi anaemia complementation group B presenting as X-linked VACTERL with hydrocephalus syndrome. *J Med Genet* 43:750-754.
- 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.
- Huang W, Luo S, Ou J, Zhu F, Xia Y, Xue J, Pan Q, Wu L, Duan R. 2014. Correlation

- between FMR1 expression and clinical phenotype in discordant dichorionic-diamniotic monozygotic twin sisters with the fragile X mutation. *J Med Genet* 51:159-164.
- Hu H, Haas SA, Chelly J, et al. 2016. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol Psychiatry* 21:133-148.
- Huppke P, Maier EM, Warnke A, Brendel C, Laccone F, Gärtner J. 2006. Very mild cases of Rett syndrome with skewed X inactivation. *J Med Genet* 43:814-816.
- Invernizzi P, Pasini S, Podda M. X chromosome in autoimmune disease. *Expert Rev Clin Immunol* 4:591-597.
- Jae LT, Brummelkamp TR. 2015. Emerging intracellular receptors for hemorrhagic fever viruses. *Trends Microbiol* 23:392-400.
- Jager N, Schlesner M, Jones DT, Raffel S, Mallm JP, Junge KM, Weichenhan D, Bauer T, Ishague N, Kool M, Northcott PA, Korshunov A, Drews RM, Koster J, Versteeg R, Richter J, Hummel M, Mack SC, Taylor MD, Witt H, Swartman B, Schulte-Bockholt D, Sultam M, Yaspo ML, Lehrach H, Hutter B, Brors B, Wolf S, Plass C, Siebert R, Trumpp A, Rippe K, Lehmann I, Lichter P, Pfister SM, Eils R. 2013. Hypermethylation of the inactive X chromosome is a frequent event in cancer. *Cell* 155:567-581.
- Jin SG, Wu X, Li AX, Pfeifer GP. 2011. Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucl Acids Res* 39:5015-5024.
- 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.
- Jovanovic L, Delahunt B, McIver B, Eberhardt NL, Grebe SK. 2003. Thyroid gland clonality revisited: the embryonal patch size of the normal human thyroid gland is very large, suggesting X-chromosome inactivation tumor clonality studies of thyroid tumors have to be interpreted with caution. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3284-3291.
- Juan-Mateu J, Rodríguez MJ, Nascimento A, Jiménez-Mallebrera C, González-Quereda L, Rivas E, Paradas C, Madruga M, Sánchez-Ayaso P, Jou C, González-Mera L, Munell F, Roig-Quilis M, Rabasa M, Hernández-Lain A, Díaz-Manera J, Gallardo E, Pascual J, Verdura E, Colomer J, Baiget M, Olivé M, Gallano P. 2012. Prognostic value of X-chromosome inactivation in symptomatic female carriers of dystrophinopathy. *Orphanet J Rare Dis* 7:82.
- Jurecka A, Krumina Z, Žuber Z, Rózdzyńska-Świątkowska A, Kłoska A, Czartoryska B, Tylki-Szymańska A. 2012. Mucopolysaccharidosis type II in females and response to enzyme replacement therapy. *Am J Med Genet A* 158A:450-454.
- Kawashima A, Sato A, Kawashima M, Nitta K, Yumura W, Sugino N, Nihei H, Natori Y. 1998. A simple procedure for the isolation of rat kidney lysosomes. *Kidney Int* 54:275-278.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:996-1006.
- Kiedrowski LA, Raca G, Laffin JJ, Nisler BS, Leonhard K, McIntire E, Montgomery KD. 2011. DNA methylation assay for X-chromosome inactivation in female human iPS cells. *Stem Cell Rev* 7:969-975.
- 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.
- Kłoska A, Jakóbkiewicz-Banecka J, Tylki-Szymańska A, Czartoryska B, Węgrzyn G. 2011. Female Hunter syndrome caused by a single mutation and familial XCI skewing: implications for other X-linked disorders. *Clin Genet* 80:459-465.
- 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.
- Kutsche R, Brown CJ. 2000. Determination of X-chromosome inactivation status using X-linked expressed polymorphisms identified by database searching. *Genomics* 65:9-15.
- Landau M, Mayrose I, Rosenberg Y, Glaser F, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. 2005. ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Res* 33:299–302.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA. 2010. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141:1146-1158.
- Lee JT, Lu N. 1999. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell* 99:47-57.
- Lee JT. 2011. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:815-826.
- Lee ST, McGlennen RC, Litz CE. 1994. Clonal determination by the fragile X (*FMR1*) and phosphoglycerate kinase (*PGK*) genes in hematological malignancies. *Cancer Res* 54:5212-5216.
- Legendre M, Pochet N, Pak T, Verstrepen KJ. 2007. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. *Genome Res* 17:1787-1796.
- Leighton F, Poole B, Beaufay H, Baudhuin P, Coffey JW, Fowler S, De Duve C. 1968. The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J Cell Biol* 37:482-513.
- Lexner MO, Bardow A, Juncker I, Jensen LG, Almer L, Kreiborg S, Hertz JM. 2008. X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. Genetic and dental findings in 67 Danish patients from 19 families. *Clin Genet* 74:252-259.
- Li R, Hodny Z, Luciakova K, Barath P, Nelson BD. 1996. Sp1 activates and inhibits transcription from separate elements in the proximal promoter of the human adenine nucleotide translocase 2 (*ANT2*) gene. *J Biol Chem* 271:18925–18930.
- Li X, Rydzewski N, Hider A, Zhang X, Yang J, Wang W, Gao Q, Cheng X, Xu H. 2016. A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation. *Nat Cell Biol* 18:404-417.
- Libert C, Dejager L, Pinheiro I. 2010. The X chromosome in immune functions: when a

- chromosome makes a difference. *Nat Rev Immunol* 10:594-604.
- Li L, Zhang P, Bao Z, Wang T, Liu S, Huang F. 2016. PGC-1 α Promotes ureagenesis in mouse periportal hepatocytes through SIRT3 and SIRT5 in response to glucagon. *Sci Rep* 6:24156.
- Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haqhiqhi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR. 2013. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341:1237905.
- Liu B, Du H, Rutkowski R, Gartner A, Wang X. 2012. LAAT-1 is the lysosomal lysine/arginine transporter that maintains amino acid homeostasis. *Science* 337:351-354.
- Loat CS, Asbury K, Galsworthy MJ, Plomin R, Craig IW. 2004. X inactivation as a source of behavioural differences in monozygotic female twins. *Twin Research* 7:54-61.
- Lonardo F, Di Natale P, Lualdi S, Acquaviva F, Cuoco C, Scarano F, Maioli M, Pavone LM, Di Gregorio G, Filocamo M, Scarano G. 2014. Mucopolysaccharidosis type II in a female patient with a reciprocal X;9 translocation and skewed X chromosome inactivation. *Am J Med Genet A* 164:2627-2632.
- Lübke T, Lobel P, Sleat DE. 2009. Proteomics of the lysosome. *Biochim Biophys Acta* 1793:625-635.
- Lukusa T, Fryns JP. 2008. Human chromosome fragility. *Biochim Biophys Acta* 1779:3-16.
- Lyon MF. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190:372-373.
- Lyon MF. 1998. X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet* 80:133-137.
- Machado FB, Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, Alves da Silva AF, Radic CP, De Brasi CD, Rios ÁF, de Sousa Lopes SM, da Silveira LS, Ruiz-Miranda CR, Ramos ES, Medina-Acosta E. 2014. 5^{me} CpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. *PloS One* 9:e103714.
- Maier EM, Kammerer S, Muntau AC, Wichers M, Braun A, Roscher AA. 2002. Symptoms in carriers of adrenoleukodystrophy relate to skewed X inactivation. *Ann Neurol* 52:683-688.
- Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, Ries M, Gal A, Beck M, Roscher AA, Muntau AC. 2006. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 95:30-38.
- Majer F, Pelak O, Kalina T, Vlaskova H, Dvorakova L, Honzik T, Palecek T, Kuchynka P, Masek M, Zeman J, Elleder M, Sikora J. 2014. Mosaic tissue distribution of the tandem duplication of *LAMP2* exons 4 and 5 demonstrates the limits of Danon disease cellular and molecular diagnostics. *J Inher Metab Dis* 37:117-124.
- Manara R, Rampazzo A, Cananzi M, Salviati L, Mardari R, Drigo P, Tomanin R, Gasparotto N, Priante E, Scarpa M. 2010. Hunter syndrome in an 11-year old girl on enzyme replacement therapy with idursulfase: brain magnetic resonance imaging features and evolution. *J Inher Metab Dis* 33 Suppl 3:S67-72.
- Manco L, Pereira J, Relvas L, Rebelo U, Crisóstomo AI, Bento C, Ribeiro ML. 2011. Chronic hemolytic anemia is associated with a new glucose-6-phosphate dehydrogenase in-frame deletion in an older woman. *Blood Cells Mol Dis* 46:288-293.

- Mangs AH, Morris BJ. 2007. The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future. *Curr Genomics* 8:129-136.
- Marks H, Kerstens HH, Barakat TS, Splinter E, Dirks RA, van Mierlo G, Joshi O, Wang SY, Babak T, Albers CA, Kalkan T, Smith A, Jouneau A, de Laat W, Gribnau J, Stunnenberg HG. 2015. Dynamics of gene silencing during X inactivation using allele-specific RNA-seq. *Genome Biol* 16:149.
- McHugh CA, Chen CK, Chow A, Surka CF, Tran C, McDonel P, Pandey-Jones A, Blanco M, Burghard C, Moradian A, Sweredoski MJ, Shishkin AA, Su J, Lander ES, Hess S, Plath K, Guttman M. 2015. The *Xist* lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* 521:232-236.
- Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Linq C, Rooimans MA, Bier P, Hoatlin M, Pals G, de Winter JP, Wang W, Joenje H. 2004. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 36:1219–1224.
- Meikle PJ, Whittle AM, Hopwood JJ. 1995. Human acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Kinetic characterization and mechanistic interpretation. *Biochem J* 308:327-333.
- Mengel-From J, Thinggaard M, Christiansen L, Vaupel JW, Orstavik KH, Christensen K. 2012. Skewed X inactivation and survival: a 13-year follow-up study of elderly twins and singletons. *Eur J Hum Genet* 20:361-364.
- Migeon BR, Chowdhury AK, Dunston JA, McIntosh I. 2001. Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. *Am J Hum Genet* 69:951-960.
- 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.
- Minks J. 2007. Stanovení zešikmení inaktivace chromosomu X u žen. Diplomová práce, VŠCHT Praha.
- Minks J, Robinson WP, Brown CJ. 2008. A skewed view of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* 118:20-23.
- Minks J, Baldry SE, Yang C, Cotton AM, Brown CJ. 2013. XIST-induced silencing of flanking genes is achieved by additive action of repeat A monomers in human somatic cells. *Epigenetics Chromatin* 6:23.
- Miyawaki Y, Suzuki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Suzuki N, Katsumi A, Naoe T, Yamamoto K, Matsushita T, Takamatsu J, Kojima T. 2010. Severe hemophilia A in a Japanese female caused by an F8-intron 22 inversion associated with skewed X chromosome inactivation. *Int J Hematol* 92:405–408.
- Moriyama Y, Takano T, Ohkuma S. 1982. Acridine orange as a fluorescent probe for lysosomal proton pump. *J Biochem* 92:1333-1336.
- Morleo M, Franco B. 2008. Dosage compensation of the mammalian X chromosome influences the phenotypic variability of X-linked dominant male-lethal disorders. *J Med Genet* 45:401-408.

- Morrone A, Cavicchi C, Bardelli T, Antuzzi D, Parini R, Di Rocco M, Feriozzi S, Gabrielli O, Barone R, Pistone G, Spisni C, Ricci R, Zammarchi E. 2003. Fabry disease: molecular studies in Italian patients and X inactivation analysis in manifesting carriers. *J Med Genet* 40:e103.
- Mossman J, Blunt S, Stephens R, Jones EE, Pembrey M. 1983. Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal translocation disrupting the Hunter gene. *Arch Dis Child* 58:911-915.
- 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.
- Muenzer J, Hendriksz CJ, Fan Z, Vijayaraghavan S, Perry V, Santra S, Solanki GA, Mascelli MA, Pan L, Wang N, Sciarappa K, Barbier AJ. 2016. A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. *Genet Med* 18:73-81.
- Mukhtar A, Dabbous H, El Sayed R, Aboulfetouh F, Bahaa M, Abdelaal A, Fathy M, El-Meteini M. 2013. A novel mutation of the ornithine transcarbamylase gene leading to fatal hyperammonemia in a liver transplant recipient. *Am J Transplant* 13:1084-1087.
- Mušálková D. 2011. Návrh metody pro stanovení zešikmení X-inaktivace. Diplomová práce. VŠCHT Praha.
- Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. 2009. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 137:560-570.
- Nguyen DK, Distèche CM. 2006. High expression of the mammalian X chromosome in brain. *Brain Res* 1126:46-49.
- Novelli M, Cossu A, Oukrif D, Quaglia A, Lakhani S, Poulsom R, Sasieni P, Carta P, Contini M, Pasca A, Palmieri G, Bodmer W, Tanda F, Wright N. 2003. X-inactivation patch size in human female tissue confounds the assessment of tumor clonality. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3311-3314.
- Ohno S. 1967. Sex chromosomes and sex-linked genes. Berlin, Springer.
- Ohsumi Y, Ishikawa T, Kato K. 1983. A rapid and simplified method for the preparation of lysosomal membranes from rat liver. *J Biochem* 93:547-556.
- Okamoto I, Patrat C, Thépot D, Peynot N, Fauque P, Daniel N, Diabanquouaya P, Wolf JP, Renard JP, Duranthon V, Heard E. 2011. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 472:370-374.
- Okumura K, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Ozeki M, Yamamoto K, Katsumi A, Matsushita T, Naoe T, Kojima T. 2008. Skewed X chromosome inactivation in fraternal female twins results in moderately severe and mild haemophilia B. *Haemophilia* 14:1088-1093.
- O'Rawe JA, Wu Y, Dörfel MJ, et al. 2015. *TAF1* variants are associated with dysmorphic features, intellectual disability, and neurological manifestations. *Am J Hum Genet* 97:922-932.
- Orstavik KH, Orstavik RE, Naumova AK, D'Adamo P, Gedeon A, Bolhuis PA, Barth PG, Toniolo D. 1998. X chromosome inactivation in carriers of Barth syndrome. *Am J Hum*

- Genet 63:1457-1463.
- Orstavik KH. 2009. X chromosome inactivation in clinical practice. *Hum Genet* 126:363-373.
- 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.
- Park C, Carrel L, Makova KD. 2010. Strong purifying selection at genes escaping X chromosome inactivation. *Mol Biol Evol* 27:2446-2450.
- Pascal E, Tjian R. 1991. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* 5:1646–1656.
- Pavlova A, Brondke H, Müsebeck J, Pollmann H, Srivastava A, Oldenburg J. 2009. Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females. *J Thromb Haemost* 7:976–982.
- Peeters SB, Cotton AM, Brown CJ. 2014. Variable escape from X-chromosome inactivation: identifying factors that tip the scales towards expression. *Bioessays* 36:746-756.
- Pegoraro E, Vettori A, Valentino ML, Molon A, Mostacciolo ML, Howell N, Carelli V. 2003. X-inactivation pattern in multiple tissues from two Leber’s hereditary optic neuropathy (LHON) patients. *Am J Med Genet A* 119A:37-40.
- Pelizzola M, Ecker JR. 2011. The DNA methylome. *FEBS Lett* 585:1994-2000.
- Perry P, Wolff S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251:156-158.
- Philips AK, Sirén A, Avela K, Somer M, Peippo M, Ahvenainen M, Doagu F, Arvio M, Kaariainen H, Van Esch H, Froyen G, Haas SA, Hu H, Kalscheuer VM, Jarvela I. 2014. X-exome sequencing in Finnish families with intellectual disability – four novel mutations and two novel syndromic phenotypes. *Orphanet J Rare Dis* 9:49.
- Piña-Aguilar RE, Zaragoza-Arévalo GR, Rau I, Gal A, Alcántara-Ortigoza MA, López-Martínez MS, Santillán-Hernández Y. 2013. Mucopolysaccharidosis type II in a female carrying a heterozygous stop mutation of the iduronate-2-sulfatase gene and showing a skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet* 56:159-162.
- Pinto LL, Vieira TA, Giugliani R, Schwartz IV. 2010. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. *Orphanet J Rare Dis* 5:14.
- Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. 2012. Lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol* 199:723-734.
- Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, Winter RM, Willard HF. 1997. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet* 17:353-356.
- Poupetova H, Ledvinova J, Berna L, Dvorakova L, Kozich V, Elleder M. 2010. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inherit Metab Dis* 33:387-396.
- Prothero KE, Stahl JM, Carrel L. 2009. Dosage compensation and gene expression on the mammalian X chromosome: one plus one does not always equal two. *Chromosome Res* 17:637-648.
- Pu J, Schindler C, Jia R, Jarnik M, Backlund P, Bonifacino JS. 2015. BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning. *Dev Cell* 33:176-188.

- Puck JM, Nussbaum RL, Conley ME. 1987. Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* 79:1395-1400.
- Puck JM, Stewart CC, Nussbaum RL. 1992. Maximum-likelihood analysis of human T-cell X chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 50:742–748.
- Pugh BF, Tjian R. 1991. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* 5:1935–1945.
- 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.
- Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. 2014. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159:1665-1680.
- Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of β -glucocerebrosidase. *Cell* 131:770-783.
- Reddy DB, Klings ES. 2013. An unusual case of altered mental status in a 33 year old patient. *Am J Respir Crit Care Med* 187:A2981.
- Redonnet-Vernhet I, Ploos van Amstel JK, Jansen RP, Wevers RA, Salvayre R, Levade T. 1996. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *J Med Genet* 33:682-688.
- Renault NK, Dyack S, Dobson MJ, Costa T, Lam WL, Greer WL. 2007. Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females. *Eur J Hum Genet* 15:628–637.
- 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.
- Richards CS, Watkins SC, Hoffman EP, Schneider NR, Milsark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM. 1990. Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 46:672-681.
- 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.
- Roberts SH, Upadhyaya M, Sarfarazi M, Harper PS. 1989. Further evidence localising the gene for Hunter's syndrome to the distal region of the X chromosome long arm. *J Med Genet* 26:309-313.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ et al. 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434:325-337.
- Rupert JL, Brown CJ, Willard HF. 1995. Direct detection of non-random X chromosome inactivation by use of a transcribed polymorphism in the XIST gene. *Eur J Hum Genet* 3:333-343.
- Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagné C, Toliat MR, Nürnberg G, Wittkamp T, Buers I, Sharifi A, Stucki M, Becker C, Baumgartner M, Robenek H, Marquardt T, Höhne W, Gasnier B, Rosenblatt DS, Fowler B, Nürnberg P. 2009. Identification of a putative

- lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet* 41:234-239.
- Saftig P, Klumperman J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:623-635.
- Sandovici I, Naumova AK, Leppert M, Linares Y, Sapienza C. 2004. A longitudinal study of X inactivation ratio in human females. *Hum Genet* 115:387-392.
- Sands MS, Davidson BL. 2006. Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther* 13:839-849.
- 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.
- Schmidt M, Du Sart D. 1992. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *Am J Med Genet* 42:161-169.
- 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.
- Sebesta I, Stiburkova B, Dvorakova L, Hrebicek M, Minks J, Stolnaja L, Vernerova Z, Rychlik I. 2008. Unusual presentation of Kelley-Seegmiller syndrome. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27:648-655.
- Segatori L. 2014. Impairment of homeostasis in lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* 66:472-477.
- Seila AC, Calabrese JM, Levine SS, Yeo GW, Rahl PB, Flynn RA, Young RA, Sharp PA. 2008. Divergent transcription from active promoters. *Science* 322:1849-1851.
- 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.
- Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:283-296.
- Sharp A, Robinson D, Jacobs P. 2000. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* 107:343-349.
- Sharp AJ, Stathaki E, Migliavacca E, Brahmachary M, Montgomery SB, Dupre Y, Antonarakis SE. 2011. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome Res* 21:1592-1600.
- Shi D, Morizono H, Yu X, Tong L, Allewell NM, Tuchman M. 2001. Human ornithine transcarbamylase : crystallographic insights into substrate recognition and conformational changes. *Biochem J* 354:501-509.
- Shiojiri N, Imai H, Goto S, Ohta T, Ogawa K, Mori M. 1997. Mosaic pattern of ornithine transcarbamylase expression in *spf^{fash}* mouse liver. *Am J Pathol* 151:413-421.

- Siintola E, Topcu M, Aula N, Lohi H, Minassian BA, Paterson AD, Liu XQ, Wilson C, Lahtinen U, Anttonen AK, Lehesjoki AE. 2007. The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *Am J Hum Genet* 81:136-146.
- Sikora J, Leddy J, Gulinello M, Walkley SU. 2016. X-linked Christianson syndrome: heterozygous female Slc9a6 knockout mice develop mosaic neuropathological changes and related behavioral abnormalities. *Dis Model Mech* 9:13-23.
- Simon MD, Pinter SF, Fang R, Sarma K, Rutenberg-Schoenberg M, Bowman SK, Kesner BA, Maier VK, Kingson RE, Lee JT. 2013. High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature* 504:465-469.
- Singer-Sam J, LeBon JM, Tanguay RL, Riggs AD. 1990. A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA in a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 18:687.
- Sleat DE, Jadot M, Lobel P. 2007. Lysosomal proteomics and disease. *Proteomics Clin Appl* 1:1134-1146.
- Sleat DE, Ding L, Wang S, Zhao C, Wang Y, Xin W, Zheng H, Moore DF, Sims KB, Lobel P. 2009. Mass spectrometry-based protein profiling to determine the cause of lysosomal storage diseases of unknown etiology. *Mol Cell Proteomics* 8:1708-1718.
- Smale ST, Kadonaga JT. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72:449-479.
- Sohn YB, Kim SJ, Park SW, Park HD, Ki CS, Kim CH, Huh SW, Yeau S, Paik KH, Jin DK. 2010. A mother and daughter with p.R443X mutation of mucopolysaccharidosis type II: genotype and phenotype analysis. *Am J Med Genet A* 152A:3129-3132.
- Spatz A, Borg C, Feunteun J. 2004. X-chromosome genetics and human cancer. *Nat Rev Cancer* 4:617-629.
- Splinter E, de Wit E, Nora EP, Klous P, van de Werken HJ, Zhu Y, Kaaij LJ, van Ijcken W, Gribnau J, Heard E, de Laat W. 2011. The inactive X chromosome adopts a unique three-dimensional conformation that is dependent on *Xist* RNA. *Genes Dev* 25:1371-1383.
- 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.
- Sudbrak R, Wieczorek G, Nuber UA, Mann W, Kirchner R, Erdogan F, Brown CJ, Wöhrle D, Sterk P, Kalscheuer VM, Berger W, Lehrach H, Ropers HH. 2001. X chromosome-specific cDNA arrays: identification of genes that escape from X-inactivation and other applications. *Hum Mol Genet* 10:77-83.
- Sukegawa K, Song XQ, Masuno M, Fukao T, Shimozawa N, Fukuda S, Isogai K, Nishio H, Matsuo M, Tomatsu S, Kondo N, Orii T. 1997. Hunter disease in a girl caused by R468Q mutation in the iduronate-2-sulfatase gene and skewed inactivation of the X chromosome carrying the normal allele. *Hum Mutat* 10:361-367.
- Sukegawa K, Matsuzaki T, Fukuda S, Masuno M, Fukao T, Kokuryu M, Iwata S, Tomatsu S, Orii T, Kondo N. 1998. Brother/sister siblings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation. *Clin Genet* 53:96-101.
- 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.
- Sun BK, Tsao H. 2008. X-chromosome inactivation and skin disease. *J Invest Dermatol* 128:2753-2759.
- 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.
- Symons LJ, Jonas AJ. 1987. Isolation of highly purified rat liver lysosomal membranes using two Percoll gradients. *Anal Biochem* 164:382-90.
- Szelinger S, Malenica I, Corneaux JJ, Siniard AL, Kurdoglu AA, Ramsey KM, Schrauwen I, Trent JM, Narayanan V, Huentelman MJ, Craig DW. 2014. Characterization of X chromosome inactivation using integrated analysis of whole-exome and mRNA sequencing. *PLoS One* 9:e113036.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Taute A, Wätzig K, Simons B, Lohaus C, Meyer H, Hasilik A. 2002. Presence of detergent-resistant microdomains in lysosomal membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 298:5-9.
- Thouin MM, Giron JM, Hoffman EP. 2003. Detection of nonrandom X chromosome inactivation. *Curr Protoc Hum Genet* 35:9.7.1-9.7.6.
- Tollefsbol T. 2011 *Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics*. London, Academic Press. 624 pp.
- Tomoda K, Takahashi K, Leung K, Okada A, Narita M, Yamada NA, Eilertson KE, Tsang P, Baba S, White MP, Sami S, Srivastava D, Conklin BR, Panning B, Yamanaka S. 2012. Derivation conditions impact X-inactivation status in female human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11:91-99.
- Torres RJ, Puig JG. 2007. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2:48.
- Torres RJ, Garcia MG, Puig JG. 2012. Carrier and prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan disease due to a defect in HPRT gene expression regulation. *Gene* 511:306-307.
- Tsai YC, Simoneau AR, Spruck CH III, Nichols PW, Steven K, Buckley JD, Jones PA. 1995. Mosaicism in human epithelium: macroscopic monoclonal patches cover the urothelium. *J Urol* 153:1697-1700.
- Tuchman M, Tsai MY, Holzkneccht RA, Brusilow SW. 1989. Carbamyl phosphate synthetase and ornithine transcarbamylase activities in enzyme-deficient human liver measured by radiochromatography and correlated with outcome. *Pediatr Res* 26:77-82.
- Tuchman M, Plante RJ, McCann MT, Qureshi AA. 1994. Seven new mutations in the human ornithine transcarbamylase gene. *Hum Mutat* 4:57-60.
- Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S, Bodamer OA. 2005. Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr Neurol* 32:270-272.
- Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Woedl S, Dufke C, Bauer C, Kehrer M, Evers C, Moog U, Oehl-Jaschkowitz B, Di Donato N, Maiwald R, Jung C, Kuechler A, Schulz S, Meinecke P, Spranger S, Kohlhase J, Seidel J, Reif S, Rieger M, Riess A, Sturm M, Bickmann J, Schroeder C, Dufke A, Riess O, Bauer P. 2015. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 23:1513-1518.

- Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne JM, Leuer M, Delpech M, Negrier C. 2002. Skewed X-chromosome inactivation in monozygotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A. *Blood* 100:3034–3036.
- Vallot C, Huret C, Lesecque Y, Resch A, Oudrhiri N, Bennaceur-Griscelli A, Duret L, Rougeulle C. 2013. XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nat Genet* 45:239-241.
- Vallot C, Ouimette JF, Makhlof M, Féraud O, Pontis J, Come J, Martinat C, Bennaceur-Griscelli A, Lalande M, Rougeulle C. 2015. Erosion of X chromosome inactivation in human pluripotent cells initiates with XACT coating and depends on a specific heterochromatin landscape. *Cell Stem Cell* 16:533-546.
- Veitia RA, Veyrunes F, Bottani S, Birchler JA. 2015. X chromosome inactivation and active X upregulation in therian mammals: facts, questions, and hypotheses. *J Mol Cell Biol* 7:2-11.
- Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, McMillan D, Alsop AE, Grützner F, Deakin JE, Whittington CM, Schatzkammer K, Kremitzki CL, Graves T, Ferguson-Smith MA, Warren W, Marshall Graves JA. 2008. Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Res* 18:965-973.
- Viggiano E, Ergoli M, Picillo E, Politano L. 2016. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 135:685-698.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, Riggs AD, Orkin SH. 1987. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* 47:4806-4813.
- 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.
- Wakabayashi T, Shimada Y, Akiyama K, Higuchi T, Fukuda T, Kobayashi H, Eto Y, Ida H, Ohashi T. 2015. Hematopoietic stem cell gene therapy corrects neuropathic phenotype in murine model of mucopolysaccharidosis Type II. *Hum Gene Ther* 26:357-366.
- Wakiya T, Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Yamada N, Okada N, Ushijima K, Otomo S, Sakamoto K, Murayama K, Takayanagi M, Hakamada K, Yasuda Y, Mizuta K. 2012. Impact of enzyme activity assay on indication in liver transplantation for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab* 105:404-407.
- Wang RY, Lelis A, Mirocha J, Wilcox WA. 2007. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genet Med* 9:34-45.
- Wang X, Miller DC, Clark AG, Antczak DF. 2012. Random X inactivation in the mule and horse placenta. *Genome Res* 22:1855-1863.
- Wang Z, Yan A, Lin Y, Xie H, Zhou C, Lan F. 2013. Familial skewed X chromosome inactivation in adrenoleukodystrophy manifesting heterozygotes from a Chinese pedigree. *PLoS One* 8:e57977.
- 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.

- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D. 2005. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 37:853-862.
- 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.
- Willemsen R, Bontekoe CJ, Severijnen LA, Oostra BA. 2002. Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Hum Genet* 110:601-605.
- Winchester B, Young E, Geddes S, Genet S, Hurst J, Middleton-Price H, Williams N, Webb M, Habel A, Malcolm S. 1992. Female twin with Hunter disease due to nonrandom inactivation of the X-chromosome: a consequence of twinning. *Am J Med Genet* 44:834-838.
- 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.
- Xu N, Tsai C, Lee JT. 2006. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science* 311:1149-1152.
- Yang C, Chapman AG, Kelsey AD, Minks J, Cotton AM, Brown CJ. 2011. X-chromosome inactivation: molecular mechanisms from the human perspective. *Hum Genet* 130:175-185.
- Yang F, Babak T, Schendure J, Disteche CM. 2010. Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome Res* 20:614-622.
- Yaplito-Lee J, Chow CW, Boneh A. 2013. Histopathological findings in livers of patients with urea cycle disorders. *Mol Genet Metab* 108:161-165.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134.
- Yildirim E, Kirby JE, Brown DE, Mercier FE, Sadreyev RI, Scadden DT, Lee JT. 2013. Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice. *Cell* 152:727-742.
- 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.
- Yu W, Lin Y, Yao J, Huang W, Lei Q, Xiong Y, Zhao S, Guan KL. 2009. Lysine 88 acetylation negatively regulates ornithine carbamoyltransferase activity in response to nutrient signals. *J Biol Chem* 274:13669-13675.
- Zahorakova D, Lelkova P, Gregor V, Magner M, Zeman J, Martasek P. 2016. *MECP2* mutations in Czech patients with Rett syndrome and Rett-like phenotypes: novel mutations, genotype-phenotype correlations and validation of high-resolution melting analysis for mutation scanning. *J Hum Genet* 61:617-625.
- Zhang H, Li J, Zhang X, Wang Y, Qiu W, Ye J, Han L, Gao X, Gu X. Analysis of the IDS gene in 38 patients with Hunter syndrome: the c.879G>A (p.Gln293Gln) synonymous variation in a female create exonic splicing. *PloS One* 6:e22951.

- Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. 2008. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* 322:750-756.
- Zhu J, He F, Hu S, Yu J. 2008. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 24:481-484.

8 Seznam publikací a prezentací

8.1 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)

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)

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)

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)

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)

8.2 Seznam publikací, které se nevztahují k dizertační práci

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

8.3 Seznam ústních prezentací

- SVV 2012, Praha: „Biologický význam epigenetických modifikací a možnosti jejich analýzy“
- SVV 2012, Praha: „The single life“ (Journal club)
- 14. Studentská vědecká konference 2013, Praha: „Návrh metody pro stanovení zešíkmení X-inaktivace“
- SVV 2014, Praha: „Inaktivace chromosomu X - mosaika pod mikroskopem“ (Journal club)
- 16. Studentská vědecká konference 2015, Praha: „Nové metody pro stanovení zešíkmení inaktivace chromosomu X a jejich praktické využití“
- 40. FEBS Kongres 2015, Berlín, Německo: „Analysis of XCI mosaicism in the liver from a patient with OTC deficiency“
- SVV 2015, Praha – Vazebné proteiny Xist RNA (Journal club)

8.4 Seznam posterových sdělení

- 18. ESGLD Workshop 2011, Långvik, Finsko: „Variability of X-inactivation and multiple tissues of unaffected females as a groundwork for evaluation of X-inactivation studies in Fabry disease“
- ICHG 2011, Montreal, Kanada: „Skewing of X-chromosome inactivation in tissues: Is HUMARA assay in blood a reliable proxy?“
- 28. Pracovní dny – Dědičné metabolické poruchy 2013, Tábor, ČR: „Návrh nových metod pro stanovení zešíkmení inaktivace chromosomu X“
- 19. ESGLD Workshop 2013, Leibnitz, Rakousko: „Characterization of NPC1 expression on mRNA and protein level in a cohort of Niemann-Pick type C disease patients“, „New assays for measurement of X-inactivation skewing in patients with Fabry disease and other X-linked disorders“
- 29. Pracovní dny – Dědičné metabolické poruchy 2014, Donovaly, SR: „Velmi vzácná manifestace mukopolysacharidózy typu II u dívky“, „Charakterizace exprese NPC1 na úrovni transkriptu a proteinu u skupiny pacientů s Niemann-Pickovou chorobou typu C“
- Lysosomal biology meeting and 13th International symposium on MPS and related diseases 2014, Costa do Sauípe, Brazílie: „Mouse model of mucopolysaccharidosis III type C: distribution and characterization of the storage process in brain and peripheral tissues. A histopathological and electron microscopical study“, „Development of novel DNA-based X-inactivation assays and their application in a carrier with Hunter syndrome“
- FEBS Advanced Lecture Course: 360 Degree Lysosome 2014, Izmir, Turkey: „Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis and practical applications“
- 30. Pracovní dny – Dědičné metabolické poruchy 2015, Dolní Morava, ČR: „Niemann-Pickova choroba typu C: komplexní analýza důsledků mutací v genu NPC1 na úrovni mRNA a proteinu“
- 40. FEBS Kongres 2015, Berlín, Německo: „Analysis of XCI mosaicism in the liver from a patient with OTC deficiency“
- 20. ESGLD 2015, Neapol, Itálie: „Targeted re-sequencing in the diagnostic work-flow of neurodegenerative metabolic diseases with Mendelian inheritance – a pilot study“, „Niemann-Pick disease type C: complex analysis of the effect of mutations in NPC1 gene on the mRNA and protein levels“
- 31. Pracovní dny – Dědičné metabolické poruchy 2016, Bratislava, Slovensko: „Metodické přístupy ke stanovení zešíkmení X-inaktivace“
- 12. ICCB 2016, Praha, ČR: „Analysis of XCI ratios in the liver and several other tissues from a heterozygous patient with OTC deficiency“

9 Přílohy

Short Communication

Rapid Isolation of Lysosomal Membranes from Cultured Cells

(lysosomes / lysosomal membrane / methionine methyl ester / gradient centrifugation)

D. MUŠÁLKOVÁ, J. LUKÁŠ, F. MAJER, O. HŘEBÍČEK, E. SVOBODOVÁ,
L. KUCHAR, J. HONZÍKOVÁ, H. HŮLKOVÁ, J. LEDVINOVÁ, M. HŘEBÍČEK

Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

Abstract. We present a simple method for enrichment of lysosomal membranes from HEK293 and HeLa cell lines taking advantage of selective disruption of lysosomes by methionine methyl ester. Organelle concentrate from postnuclear supernatant was treated with 20 mmol/l methionine methyl ester for 45 min to lyse the lysosomes. Subsequently, lysosomal membranes were resolved on a step sucrose gradient. An enriched lysosomal membrane fraction was collected from the 20%/35% sucrose interface. The washed lysosomal membrane fraction was enriched 30 times relative to the homogenate and gave the yield of more than 8 %. These results are comparable to lysosomal membranes isolated by magnetic chromatography from cultured cells (Dietrich et al., 1998). The procedure effectively eliminated mitochondrial contamination and minimized contamination from other cell compartments. The enriched fractions retained the ability to acidify membrane vesicles through the activity of lysosomal vacuolar ATPase. The method avoids non-physiological overloading of cells with superparamagnetic particles and appears to be quite robust among the tested cell lines. We expect it may be of more general use, adaptable to other cell lines and tissues.

Received February 8, 2012. Accepted June 26, 2012.

This study was supported by the grant NS10342-3 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and partially by SVV2012/2645.

Corresponding author: Martin Hřebíček, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, Prague 2, Czech Republic. Phone: (+420) 2 2496 7208; Fax: (+420) 2 2496 7119; e-mail: martin.hrebicek@lf1.cuni.cz

Abbreviations: EDTA – ethylenediamine tetraacetic acid, HRP – horseradish peroxidase, LAMP1 – lysosomal associated membrane protein 1, LM – lysosomal membranes, MME – methionine methyl ester, PBS – phosphate-buffered saline, SDH – succinate dehydrogenase, TEA – triethanolamine-EDTA-acetic acid.

Introduction

Lysosomal membranes (LM) are often isolated from biological material for proteomic studies (Schröder et al., 2007a,b; Callahan et al., 2009) or for the study of individual lysosomal membrane proteins (Meikle et al., 1995; Taute et al., 2002). Hypotonic lysis of lysosome-enriched fractions from isopycnic centrifugation on density gradients is a frequently used method for preparation of LM (Meikle et al., 1995). Lysosomes can be purified to high purity by well-established procedures from some animal tissues, for instance from rat liver, which was the principal source of lysosomes for most of the structural and biochemical studies of the organelle. Isolation from other tissues may require procedures tailored to achieve the required enrichment or yield (which are almost as a rule inversely related variables). The ability to isolate the organelles from readily available tissues is especially important in the study of human cells and general isolation procedures may need to be optimized for a specific tissue or for preservation of lysosomal functions (Graham, 2009) – hence the number of papers describing isolation of lysosomes from different tissues or cell lines. We have aimed to develop a simple method for isolation of human lysosomal membranes, which would allow us to perform biochemical studies on lysosomal ghosts – lysosomal membrane vesicles without lysosomal matrix proteins.

Lysosomes, mitochondria, and peroxisomes have similar and partially overlapping densities in sucrose and to a lesser extent in other gradient media, making their full separation based on density alone very difficult. The resolution of lysosomes, however, can be significantly improved by several techniques. Density perturbation of lysosomes in gradients can greatly enhance their separation from other organelles (Graham, 2009). Highly purified lysosomes were isolated from animal tissues by density shift of lysosomes after treatment of animals with Triton WR1339 (Leighton et al., 1968) or dextran (Arai et al., 1991). Mitochondria swell in the presence of calcium ions and become less dense, and addition of CaCl_2 in 1 millimolar final concentration to postnuclear supernatant improves their separation from lysosomes in Percoll gradients (Arai et al., 1991).

LM were also successfully isolated by magnetic chromatography after treatment of cultured skin fibroblasts with superparamagnetic magnetite/dextran nanoparticles; lysosomes containing endocytosed particles were retained on the magnetic column and LM were obtained after on-column hypotonic lysis of lysosomes (Dietrich et al., 1998).

Lysis of lysosomes and separation of lysosomal membranes by centrifugation is another technique suitable for enrichment of LM even from complex organelle fractions. Ohsumi et al. (1983) directly treated postnuclear supernatant from rat liver with a hypotonic buffer to lyse lysosomes and collected enriched LM by a four-step differential centrifugation procedure. Also, methyl esters of certain amino acids can be used for selective rupture of lysosomes (Goldman and Kaplan, 1973). They readily cross the lysosomal membrane and enter lysosomes, where they are converted to free amino acids, presumably by lysosomal hydrolases. Accumulation of free amino acids leads to lysosomal swelling and rupture across a wide concentration range. This property was used for disruption of the lysosomal function in tissues (Reeves et al., 1981) and for enrichment of LM from lysosomes (Symons and Jonas, 1987; Schröder et al., 2007a).

Here we present a simple method for isolation of LM from HEK293 and HeLa cell lines taking advantage of selective disruption of lysosomes by methionine methyl ester, which produces lysosomal membrane vesicles retaining the ability to acidify their content.

Material and Methods

HEK293 or HeLa cells from 12–22 confluent 75 cm² flasks were washed twice by PBS, collected by scraping, washed once in isotonic TEA buffer (10 mmol/l triethanolamine, 1 mmol/l EDTA Na₂, 10 mmol/l acetic acid, pH 7.2) with 250 mmol/l sucrose and homogenized in the total volume of 8 ml of the same buffer by 10 strokes of tight-fitting pestle B in the glass Dounce homogenizer (Kontes, Kimble Chase Kontes, Vineland, NJ). The homogenization and all further manipulations were performed at 4 °C unless specified otherwise. The homogenate was centrifuged for 10 min at 1,000 × *g* in a swing-out rotor in a tabletop centrifuge; the supernatant was collected and the pellet was re-homogenized by three strokes in the Dounce homogenizer in a total volume of 5 ml of TEA and centrifuged in the same conditions. Both portions of postnuclear supernatant were combined and centrifuged for 15 min at 11,000 × *g* to collect the organelle pellet. The organelle pellet was re-suspended in 8 ml of isotonic HEPES buffer (10 mmol/l HEPES, pH 7.2, 250 mmol/l sucrose, 1 mmol/l EDTA Na₂) and 20 mmol/l methionine methyl ester (MME, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Schröder et al., 2007a) and incubated for 45 min at room temperature with stirring. After that the suspension was placed on ice, protease inhibitors were added (Complete, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) to a 1× final concentration,

and the suspension was centrifuged at 20,000 × *g* for 20 min. The pellet was resuspended in 8 ml of isotonic HEPES buffer.

The degree of lysosomal lysis was estimated from the amount of hexosaminidase activity released into the supernatant. Samples (200 µl) were taken at 15 min intervals, stored on ice after the addition of protease inhibitors (Complete, Roche), and centrifuged at 25,000 × *g* for 25 min. Supernatants were collected and hexosaminidase and glucocerebrosidase activity was measured as described below.

A linear sucrose gradient was prepared from 15 ml of 32.5 % (w/v) sucrose and 15 ml of 55.5% (w/v) sucrose using a gradient mixer. The gradient was overlaid with 8 ml of MME-treated organelle suspension. Alternatively, a step sucrose gradient was constructed in the following manner: 6 ml of 41% or 35% (w/v) sucrose in 10 mmol/l HEPES buffer was overlaid with 5 ml of 20% sucrose in the same buffer and, finally, by 5 ml of methionine methyl ester-treated organelle suspension. The gradients were centrifuged at 112,700 × *g*_{max} in SW 32 or SW 32.1 (Beckman-Coulter, München, Germany) overnight without braking and sixteen 1 ml fractions were collected from the top of the step gradient or the band at the 20/41% sucrose interface was collected by a cannula. The linear gradient was fractionated into nineteen 2 ml fractions from the top. The fractions with the highest glucocerebrosidase specific activity were diluted 10 or more times with 10 mmol/l Tris buffer pH 7.2, pelleted by ultracentrifugation at 250,000 × *g*_{max} for 2 h in 70 Ti rotor (Beckman-Coulter), and flash frozen in liquid nitrogen.

ATP-dependent acidification of lysosomal ghosts prepared by MME-dependent lysis of organelle suspension was determined by the acridine orange absorbance decrease assay as described previously (Dell'Antone, 1979; Moriyama et al., 1982). The reaction solution (1 ml) contained 20 mmol/l HEPES buffer, pH 7.2, 0.2 mol/l sucrose, 50 mmol/l kalium chloride, and 20 µmol/l acridine orange (Sigma-Aldrich). The absorbance of acridine orange was followed at 492 nm at room temperature using a Shimadzu UV-2550 photometer (Shimadzu, Duisburg, Germany) with slits set to 5 nm. Lysosomal membranes (10 µg of protein) were added and the absorbance at 492 nm was allowed to stabilize before the addition of ATP (sodium salt, Sigma-Aldrich) and MgCl₂, both to a final concentration of 2 mmol/l. Decrease of the absorbance at 492 nm was followed for more than 2 minutes, after which ammonium sulphate was added to a final concentration of 10 mmol/l and absorbance changes were followed for at least another minute.

The amount of lysosomal membrane protein LAMP1 in fractions during purification was determined by Western blotting. Ten µg of protein from each fraction were separated on a 7–15% gradient SDS-PAGE gel according to Laemmli (1970) and transferred onto PVDF Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA) by semi-dry blotting. The membrane was blocked with 3%

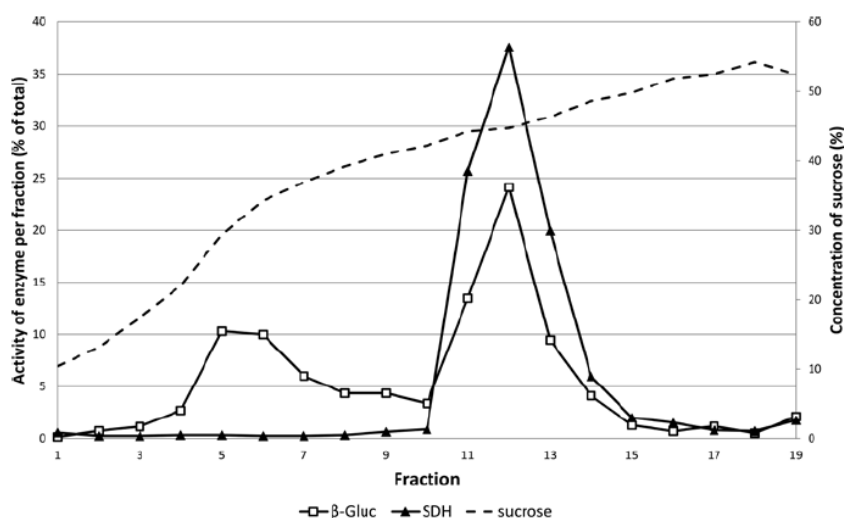


Fig. 1. Resolution of LM fraction from HeLa cells on the linear sucrose gradient

Organelle concentrate prepared from postnuclear supernatant was treated with 20 mmol/l MME for 45 min, overlaid onto linear 32.5%–55.5% sucrose gradient and centrifuged overnight at $112,700 \times g_{\max}$. In fractions the activity of glucocerebrosidase (β -Gluc) and succinate dehydrogenase (SDH) was determined and expressed as percents of the total activity. Sucrose concentration is shown in percents (w/v).

BSA and 0.05% Tween 20-phosphate-buffered saline. The membrane was probed with anti-LAMP1 rabbit polyclonal antibody (1 : 5000, a kind gift of Dr. Carlsson, University of Umea, Sweden) at room temperature for 1 h, washed four times with PBS-Tween and then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1 : 3000, Thermo Scientific, Rockford, IL) in PBS-Tween containing 1% BSA. After washing, the blot was developed with an enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Thermo Scientific).

The activities of marker enzymes succinate dehydrogenase, acid and alkaline phosphatase, catalase, and NADPH – cytochrome *c* reductase were determined as described by Graham (1993). Glucocerebrosidase and total hexosaminidase activity was measured fluorimetrically (Wenger and Williams, 1991). Glucocerebrosidase, which does not have any transmembrane domains, is considered a peripheral lysosomal membrane protein and was used as a marker of lysosomal membrane (Schröder et al., 2007b). Sucrose concentrations in gradient fractions were determined by refractometry. Protein concentrations were measured using the Bradford method (Bradford, 1976).

Results and Discussion

We first attempted to obtain enriched LMs from MME-treated postnuclear supernatant by differential centrifugation according to Ohsumi et al. (1983). The fractions we obtained, however, contained multiple marker enzyme activities and specific activities of lysosomal markers did not suggest enrichment of LM (data not shown). We have therefore fractionated the MME-lysate on a linear 32.5%–55.5% sucrose gradient. There were two peaks of glucocerebrosidase activity – the first

at about 30–41% and the second, which also contained significant mitochondrial contamination, at approximately 45% (Fig. 1). We have designed a step gradient (lysate/20% sucrose/41% sucrose) and collected a glucocerebrosidase-enriched membrane fraction from the 20%/41% sucrose interface. The fraction still contained some mitochondrial contamination, which was essentially eliminated by lowering sucrose concentration from 41% to 35% in the gradient – at the same time leading to a decreased yield of enriched LM (Fig. 2).

Lysosomal marker enzyme activity was enriched in the LM fraction recovered from the 20%/35% sucrose interface. We have also followed the amounts of prototypical lysosomal membrane protein LAMP1 (Schröder et al, 2010) in fractions by Western blotting, showing enrichment of the antigen during the purification process (Fig. 3). Glucocerebrosidase activity was enriched on average 15 times (7–22 times, 7 experiments in total); washing of the fraction in 10 mmol/l Tris further increased its specific activity approximately twice (Table 1). In a typical experiment, the postnuclear supernatant contained 89 % of the glucocerebrosidase activity, while organelle pellet retained 77 % activity. The highest of the 20%/35% interface fractions (fraction 11, enrichment relative to the homogenate 14 \times) contained 12 % of the homogenate glucocerebrosidase activity. The washed pellet from this fraction represented 8.8 % of the initial activity. Contaminating activities were generally low (less than 1 %) with the exception of catalase (2.6 %), suggesting mild contamination with peroxisomes (Table 1). While highly purified LM preparations contain plasma membrane marker proteins (Schröder et al., 2010), presumably originating from the plasma membrane portions entering the endosomal/lysosomal system via endocytosis, it should be noted that

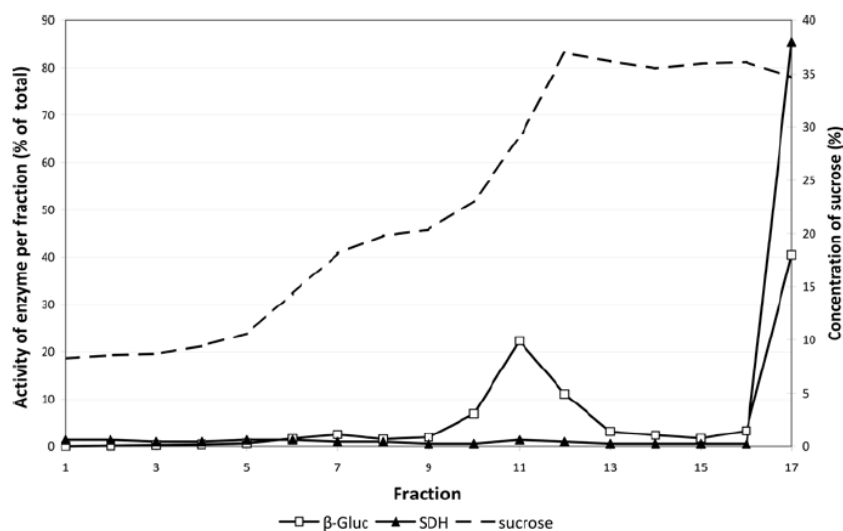


Fig. 2. Resolution of LM fraction from HeLa cells on the step sucrose gradient

MME-treated organelle concentrate was resolved on the step gradient created by overlaying 20% sucrose over 35% sucrose. The gradient was centrifuged overnight at $112,700 \times g_{max}$. In fractions the activity of glucocerebrosidase (β -Gluc) and succinate dehydrogenase (SDH) was determined and expressed as percents of the total activity. Concentration of sucrose is shown in percents (w/v).

some plasma membrane fragments may also focus on the 20%/35% (41%) sucrose interface (Scott et al., 1993) as LM, as was noted in some experiments. Spurious contamination of the LM fraction by plasma membrane arguably may occur as a result of the more vigorous homogenization.

We have determined activities of total hexosaminidase, a lysosomal matrix enzyme, in $25,000 \times g$ supernatants of samples taken during MME treatment of the organelle concentrate as a measure of lysosomal lysis. The supernatant of the sample taken after 15 min contained 36.7 % of total hexosaminidase activity of the sample subjected to MME. The samples taken at 30, 45, and 60 min retained 39.0 %, 47.6 %, and 54.4 % of the initial hexosaminidase activity, respectively. At the same time the total hexosaminidase activity in the sample decreased by 13 % (9.81 nmol/ml/min at 0 min to 8.54 nmol/ml/min at 60 min). The increased concentration of MME (50 mmol/l) did not result in higher release of hexosaminidase into the supernatant. Glucocerebrosidase activity did not increase in the supernatant during the MME treatment. On the basis of these results, 45 min were chosen for MME treatment as a compromise between higher degree of lysosomal lysis and the risk of proteolysis.

We have not attempted to further enrich the core lysosomal membrane proteins by removing peripheral membrane proteins or loosely bound matrix proteins by high-salt washing, although these proteins may contaminate the enriched lysosomal fractions to a significant level. It is of interest that matrix proteins may associate, even temporarily, with the lysosomal membrane (Jadot et al., 1979) and some lysosomal proteins, including glucocerebrosidase, apparently exist in luminal and membrane-bound form (Imai, 1985).

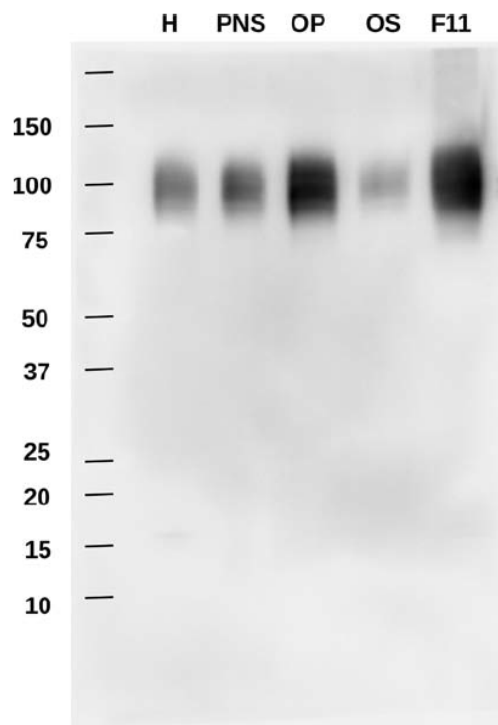


Fig. 3. Western blotting of subcellular fractions with anti-LAMP1 antibody

Ten μ g of protein from each fraction were loaded to individual lanes. From the left: homogenate (H), post-nuclear supernatant (PNS), organelle pellet (OP), post-organelle supernatant (OS), and washed lysosomal membranes (F11). Positions of molecular weight markers in kilodaltons are shown on the left. Note the typical blurred appearance of the bands, which is assumed to be due to differential glycosylation.

Table 1. Purification of lysosomal membranes from HeLa cells. Typical values for protein concentration and glucocerebrosidase activity are shown.

Fraction	Protein		Glucocerebrosidase		
	Total (mg)	Yield (%)	Yield (%)	Specific activity (nmol/mg/min)	Purification factor
Homogenate	49.5	100.0	100.0	1.31	1.0
Nuclear pellet	8.1	16.4	8.4	0.67	-
Postnuclear supernatant	37.8	76.3	88.6	1.53	1.2
Organelle pellet	9.7	19.6	77.1	5.17	3.9
Postorganellar supernatant	21.3	43.1	11.2	0.34	-
LM Fraction (Fraction 11 from the sucrose gradient **)	0.4	0.9	12.0	18.24	13.9
Washed LM fraction	0.1	0.3	8.8	38.5	29.6

* Organelle pellet was divided into two portions overlaid over two identical sucrose gradients. The values here are averaged from both gradients.

** Fraction 11 of the sucrose gradient had the highest specific glucocerebrosidase activity and was considered the LM fraction (see Fig. 2).

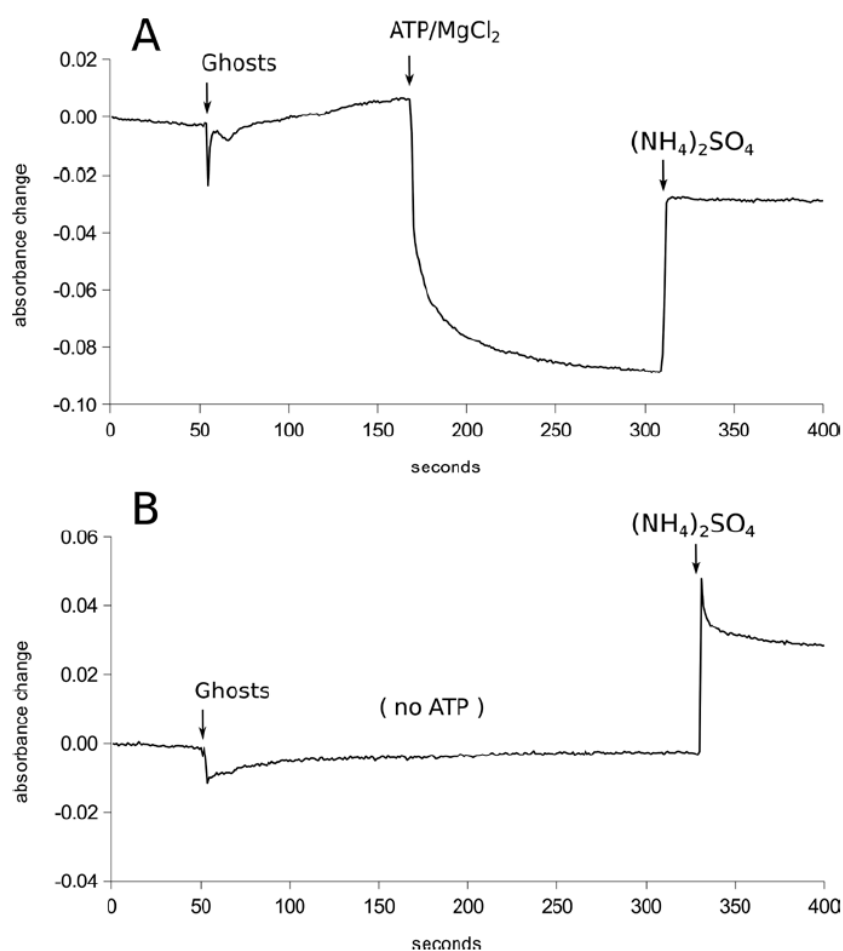


Fig. 4. Acidification of lysosomal ghosts after the addition of ATP

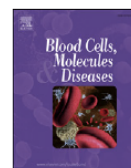
Acidification of washed lysosomal membrane vesicles was measured as the decrease of acridine orange absorbance at 492 nm. The reaction solution (1 ml) contained 20 mmol/l HEPES buffer, pH 7.2, 0.2 mol/l sucrose, 50 mmol/l potassium chloride, and 20 μ mol/l acridine orange (Sigma-Aldrich). Lysosomal ghosts (10 μ g of protein) were added (Ghosts) and the following reagents were added at the time points depicted by arrows: ATP and $MgCl_2$ (panel A), both to a final concentration of 2 mmol/l, and ammonium sulphate to a final concentration of 10 mmol/l. When ATP was omitted (panel B), the decrease of absorbance did not occur.

The washed lysosomal membranes were acidified after the addition of ATP (Fig. 4). The activity of the multi-protein complex of vacuolar ATPase, the proton pump residing in the lysosomal membrane which is responsible for the acidification of lysosomes, was apparently preserved in samples of enriched lysosomal membrane fractions. Addition of ammonium sulphate (final concentration 10 mmol/l) resulted in alkalization of the membrane vesicles (Fig. 4).

We have sought to develop a simple method for the isolation of LM that would not require non-physiological overloading of the lysosomal/endosomal system with particles or detergents as the resulting cells are clearly abnormal. In our hands, the method of Ohsumi et al. (1983), originally optimized for rat liver tissue and based on hypotonic treatment of postnuclear supernatant followed by differential centrifugation, did not provide LM in sufficient yields and purity from HEK293 cells. Osmotic lysis of lysosomes with methyl esters of leucine or methionine, highly specific for the target organelle, was chosen for the release of LM, which were subsequently resolved on the step sucrose gradient. The enriched LM fraction could easily be collected from the 20%/35% interface. The procedure effectively eliminated mitochondrial contamination, minimized contamination from other cell compartments and appeared to be sufficiently robust. While it did not yield LM of very high purity, the enrichment was comparable to the magnetic chromatography technique developed by Dietrich et al. (1998). The method yielded similar results both for HEK293 and HeLa cell lines, suggesting that it may be adapted to other cell lines or possibly tissues.

References

- Arai, K., Kanaseki, T., Ohkuma, S. (1991) Isolation of highly purified lysosomes from rat liver: identification of electron carrier components on lysosomal membranes. *J. Biochem.* **110**, 541-547.
- Bradford, M. M. (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.
- Callahan, J. W., Bagshaw, R. D., Mahuran, D. J. (2009) The integral membrane of lysosomes: its proteins and their roles in disease. *J. Proteomics* **72**, 23-33.
- 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, A. W., Hasilik, A., Winchester, B. G. (1998) Application of magnetic chromatography to the isolation of lysosomes from fibroblasts of patients with lysosomal storage disorders. *FEBS Lett.* **441**, 369-372.
- Goldman, R., Kaplan, A. (1973) Rupture of rat liver lysosomes mediated by L-amino acid esters. *Biochim. Biophys. Acta* **318**, 205-216.
- Graham, J. M. (1993) The identification of subcellular fractions from mammalian cells. In: *Biomembrane Protocols: I. Isolation and Analysis, Methods in Molecular Biology* **19**, eds. Graham J. M., Higgins J. S., pp. 1-18, Humana Press, Totowa, NJ.
- Graham, J. M. (2009) Subcellular fractionation and isolation of organelles. In: *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ.
- Imai, K. (1985) Characterization of β -glucosidase as a peripheral enzyme of lysosomal membranes from mouse liver and purification. *J. Biochem.* **98**, 1405-1416.
- Jadot, M., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S., Wattiaux, R. (1997) Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids. *Eur. J. Biochem.* **249**, 862-869.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, S., De Duve, C. (1968) The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J. Cell. Biol.* **37**, 482-513.
- Meikle, P. J., Whittle, A. M., Hopwood, J. J. (1995) Human acetyl-coenzyme A: α -glucosaminide N-acetyltransferase. Kinetic characterization and mechanistic interpretation. *Biochem. J.* **308** (Pt 1), 327-333.
- Moriyama, Y., Takano, T., Ohkuma, S. (1982) Acridine orange as a fluorescent probe for lysosomal proton pump. *J. Biochem.* **92**, 1333-1336.
- Ohsumi, Y., Ishikawa, T., Kato, K. (1983) A rapid and simplified method for the preparation of lysosomal membranes from rat liver. *J. Biochem.* **93**, 547-556.
- Reeves, J. P., Decker, R. S., Crie, J. S., Wildenthal, K. (1981) Intracellular disruption of rat heart lysosomes by leucine methyl ester: effects on protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4426-4429.
- 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, B. A., Wrocklage, C., Hasilik, A., Saftig, P. (2010) The proteome of lysosomes. *Proteomics* **10**, 4053-4076.
- Scott, L., Schell, M. J., Hubbard, A. L. (1993) Isolation of plasma membrane sheets and plasma membrane domains from rat liver. In: *Biomembrane Protocols: I. Isolation and Analysis, Methods in Molecular Biology* **19**, eds. Graham J. M., Higgins, J. S. pp. 59-69, Humana Press, Totowa, NJ.
- Symons, L. J., Jonas, A. J. (1987) Isolation of highly purified rat liver lysosomal membranes using two Percoll gradients. *Anal. Biochem.* **164**, 382-390.
- Taute, A., Wätzig, K., Simons, B., Lohaus, C., Meyer, H., Hasilik, A. (2002) Presence of detergent-resistant microdomains in lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 5-9.
- Wenger, D. A., Williams, C. (1991) Screening for lysosomal disorders. In: *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: a Laboratory Manual*, ed. Hommes F. A., pp. 587-617, Wiley-Liss, New York, NY.



Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis



Dita Musalkova, Jakub Minks, Gabriela Storkanova, Lenka Dvorakova, Martin Hrebicek^{*}

Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Revised 23 February 2014

Accepted 23 April 2014

Available online 20 November 2014

(Communicated by J.T. Prchal, M.D., 23 April 2014)

Keywords:

X-chromosome inactivation

Skewing

DNA methylation

Androgen receptor

Trinucleotide repeats

Blood cells

ABSTRACT

The HUMARA assay, the most common method for evaluation of X-inactivation skewing in blood cells, has been reported to be usable in only about 80% of females, emphasizing the need for alternative methods for testing of HUMARA-uninformative individuals. We conducted an *in silico* search for potentially polymorphic tri-to-hexanucleotide repeats in the proximity of CpG islands located in 5' regions of X-chromosome genes to design five candidate assays (numbered I, II, III, IV, and V) combining methylation-specific restriction digest with PCR amplification in a manner similar to the HUMARA assay. The results obtained by these assays in 100 healthy females were compared to X-inactivation skewing measured by the AR-MSP method which is based on methylation-specific PCR amplification of the first exon of the AR gene. On the basis of statistical evidence, three of the novel assays (II, IV, and V), which were informative in 18%, 61%, and 55% of females in the cohort, respectively, may be used as alternatives or conjointly with the HUMARA assay to improve its reliability. The three new assays were combined with the HUMARA assay into a novel X-inactivation test leading to the increase of informative females in the cohort from 67% to 96%.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

In placental mammals, the dosage compensation that equalizes the expression of X-linked genes between sexes is achieved by inactivation of one of the X chromosomes in female cells [1]. This process occurs early in the embryonic development and is normally random with the paternal and the maternal X chromosomes having the same chance of being inactivated. The inactive state of the X chromosome is maintained by epigenetic regulation and is stably inherited through the subsequent cell divisions. As a result, females are mosaics of two cell populations with different active X chromosomes. Their size is usually equal but in some women the ratio may significantly differ from the 50:50 average and this deviation is referred to as skewing of X-inactivation. The reason for this phenomenon may be solely stochastic processes or genetic differences that influence the course of X-inactivation. However, the most common basis of significant skewing is the secondary cell selection. X-chromosome inactivation (XCI) patterns are most often tested in DNA isolated from nucleated blood cells, apparently because of the ease with which they can be obtained. Determination of the XCI pattern is important in a number of disorders affecting blood cells because skewing is known to affect the clinical manifestation of these diseases,

including hemophilia A [2–8] and B [9, 10], Wiskott–Aldrich syndrome [11–13], G6PD deficiency [14], sideroblastic anemia [15, 16], etc. X-inactivation studies are also used to determine the clonality of hematological malignancies [17, 18] and they can be helpful when identifying carrier females of e.g. Fanconi anemia B or X-SCID because of extremely skewed X-inactivation as a result of selective pressure against cells carrying the mutation on the active X chromosome [19–21]. While X-inactivation skewing in affected solid organs and tissues is frequently just extrapolated from blood cells, for disorders affecting hematopoiesis the analysis in blood cells is directly relevant.

Assays currently used for determining X-inactivation patterns are indirect and distinguish maternal X chromosomes from the paternal by leveraging either single nucleotide polymorphisms (SNP) or much more informative short tandem repeats (STR). The active chromosome (X_a) can be discriminated from the inactive (X_i) due to the differences in DNA methylation and also in gene expression [22]. Nevertheless, methylation-based assays are much more common because DNA is easily accessible and more stable than RNA. The most extensively used method (the HUMARA assay) takes advantage of a highly polymorphic (CAG)_n repeat in the first exon of the human androgen receptor gene (AR) located near several methylation-sensitive restriction enzyme sites that are differentially methylated on the active and the inactive X chromosome [23]. A number of similar methods have been devised but their use is limited, mainly because they lack the HUMARA assay's ease of performance, robustness or a highly informative repeat. MAOA assay [24] requires an additional enzyme digestion step, HPRT assay

^{*} Corresponding author at: Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Fax: +420 224967119.
E-mail address: martin.hrebicek@lf1.cuni.cz (M. Hrebicek).

[25] is based on the more laborious Southern blot hybridization, *HPRT* and *PGK* assays [26] are based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) and thus are less informative, *FMR1* assay [27] can be complicated by differential amplification of alleles and though *M27β* assay [28] uses hypervariable locus, its methylation status is inconsistent. Recently, several new assays targeting *ZNF261* [29], *ZDHHC15*, *SLITRK4* and *PCSK1N* loci [30] emerged but they make use of dinucleotide repeats, which generally leads to higher amount of stutter peaks. The HUMARA method still remains the best option and the *AR* locus was also used to design a new method – AR-MSP [31] involving methylation-specific PCR (MSP) after chemical modification of DNA, which completely omits the use of restriction enzymes.

While the HUMARA assay is well validated and suitable for routine measurement of X-inactivation skewing, it cannot be used for all patients. Uninformative patients form a significant part of the population as the polymorphism in the *AR* locus is informative only in about 80% of females [32]. Obviously, there is a need for alternative methods that allow for an analysis of X inactivation in females when the HUMARA assay cannot be used.

Materials and methods

DNA samples

Genomic DNA was isolated according to standard procedures from lymphocytes separated on Ficoll-Paque cushions (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) from peripheral blood of 100 healthy female volunteer donors aged 9 to 72 (mean age 36.5 years; median age 35 years), five adult male donors and eighteen members of five families. All donors were Caucasians from the Czech population. The study was approved by the local ethics committee and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all subjects.

Bioinformatic study and primer design

The search for new loci was performed using the Galaxy platform [33–35]. The whole X chromosome (NCBI36/hg18 assembly) was screened for regions that contain a CpG island in close proximity (300 bp maximum) to a simple repeat (located by Tandem Repeats Finder programme) with the repetition length between 3 and 6 bp. Dinucleotide repeats were not included in the search. Regions located in the pseudoautosomal regions PAR1 and PAR2 that escape inactivation [36] were omitted from further processing. Genomic contexts of the other regions were checked using the UCSC genome browser [37] and only sequences lying in the presumed promoter regions were selected for evaluation because, unlike the active X, the CpG islands in the promoter regions of X-linked genes on the inactive X chromosome are generally hypermethylated [38]. As the data about the variability of the selected STR regions were not available in the literature and databases

that were at our disposal, the variability was predicted using the SERV software package [39]. Only sequences with VARscore > 0.9 were chosen. Afterward, promoter regions of genes reported to escape X-inactivation [40–42] were excluded. Nineteen loci that fulfilled all the above requirements were selected for further investigation and primers were designed using Primer-BLAST [43]. Suitable methylation-sensitive and other restriction enzymes were found using Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>).

Selection of the primers and determination of XCI pattern

Primers were used to amplify 24 female DNA samples to find out if there was variability in the length of the PCR products. Amplification with the five sets of primers (numbered I, II, III, IV, and V, Table 1) generated specific products with variable length as confirmed by amplification of an independent group of samples obtained from five families (examples in Supplementary Fig. S1).

Samples of genomic DNA isolated from 100 control individuals were PCR amplified using the five sets of primers to identify informative samples which were subsequently used for X-inactivation assays. XCI ratio was calculated as the ratio of the peak area of two alleles of the analyzed polymorphic repeat after the digestion with methylation-sensitive restriction enzyme *HpaII* or *HhaI*. This intermediate result was corrected by the ratio of the peak area of two alleles in the undigested sample to avoid an error caused by preferential amplification of one of the alleles. The ratio was calculated for informative heterozygotes in which PCR products differed by two or more repeats. In addition, one control male sample was included in every batch of samples to confirm the complete digestion by methylation-sensitive restriction enzyme (Fig. 1, Supplementary Fig. S2).

Specifically, 200 ng of analyzed DNA was digested overnight at 37 °C with 10 U of methylation-sensitive enzyme together with 1–3 U of an auxiliary restrictase (New England Biolabs, Ipswich, MA) in the corresponding NEB buffer and 100 µg/ml BSA if needed (details in Table 1). The same amount of DNA was treated with the auxiliary enzyme alone. This enzyme, which was added to the reaction mix to reduce the complexity of genomic DNA, had restriction sites outside the PCR product and was not sensitive to methylation, digesting thus both active and inactive X alleles equally. The enzymes were inactivated at 95 °C for 10 min and 30 ng of digested DNA was PCR amplified with the designed primers (Applied Biosystems, Foster City, CA). One of the primers in each set was fluorescently labeled with 6-FAM or HEX dye (Table 1). PCR reactions were performed in 10 µl total reaction volume containing 1× PC2 buffer (50 mM Tris–HCl pH 9.1, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 150 µg/ml BSA), 200 µM dNTP's, 0.3 µM primers, 10% DMSO, 240 mU of KlenTaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) and 2.2 mU of Deep Vent polymerase (New England Biolabs). The DNA was amplified in C1000 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Denaturation (94 °C for 2 min) was followed by 35 cycles consisting of 94 °C for 5 s and 68 °C for 20–25 s and by a final extension

Table 1
PCR primers and enzymes used in individual assays.

Set	Gene	Repeat	Primers	Restriction enzymes used	Length of the product (observed)
I	<i>RPS6KA3</i>	CGG/GCGGCA ^a	5'-6-FAM-CAC AGC CAT CTT CTG CCA CGG G-3' 5'-AAG AAA GGG GCG AGA CCC GGT-3'	<i>HpaII</i> + <i>RsaI</i>	~305–311
II	<i>CNKS2</i>	GCA	5'-6-FAM-CGA GCG GGC AAG TTG GCT GA-3' 5'-TGT CGG GTC TCG CGG CTG TA-3'	<i>HpaII</i> + <i>RsaI</i>	~278–308
III	<i>RPS6KA6</i>	CCG	5'-HEX-AGG GCT CGT CCT GAG GAG CG-3' 5'-CGA GCG GCT GTC GTT GTG GT-3'	<i>HhaI</i> + <i>RsaI</i>	~306–324
IV	<i>TMEM185A</i> ^b , <i>FAM11A</i>	CCG	5'-HEX-GGC CCC TCA GGT TCA TGG CG-3' 5'-CCC TCG TAC GGA AGC CCG GA-3'	<i>HpaII</i> + <i>HpyCH4III</i>	~243–279
V	<i>HMG3</i> , <i>DKFZp779G118</i>	CCG	5'-6-FAM-GTG GAG GCA GCT AGC GCG AG-3' 5'-GCT CGG GGA ACG CGT TGG AA-3'	<i>HpaII</i> + <i>HpyCH4III</i>	~286–322

^a The CGG repeat region includes a smaller GCGGCA repeat region.

^b This gene is known for association with the CpG island of the fragile site FRAXF.

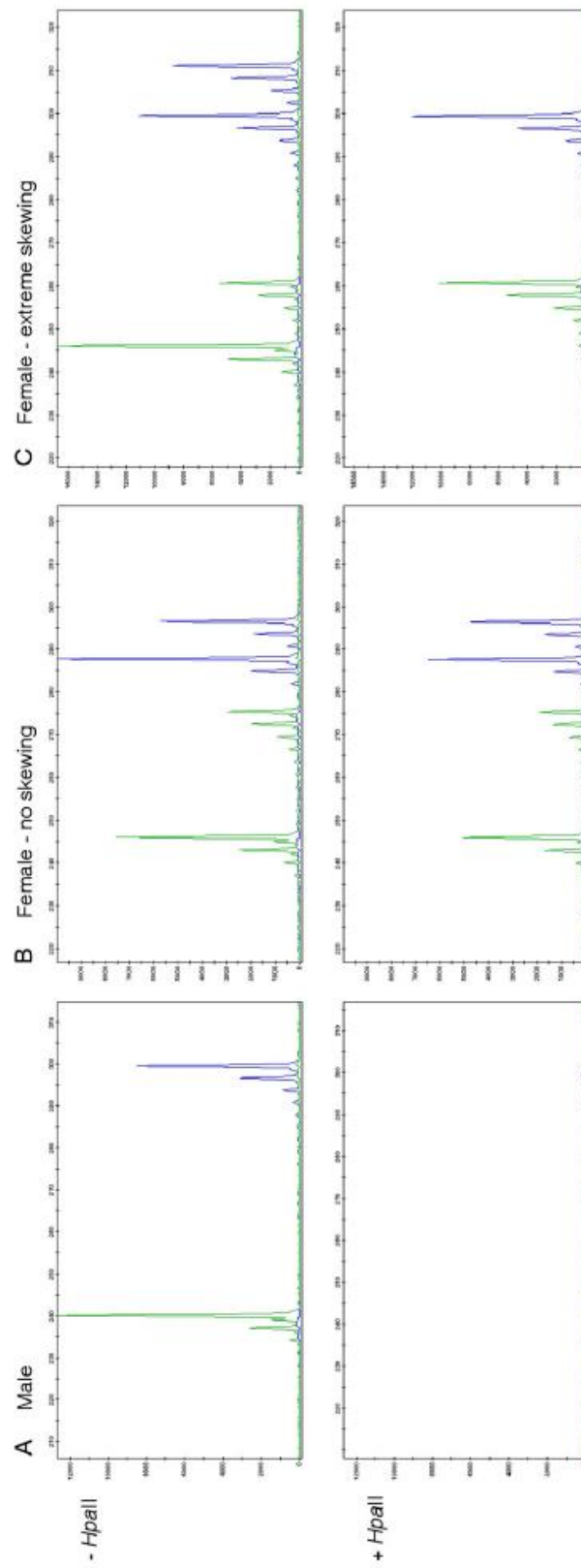


Fig. 1. Results of the fragment analysis – assay IV (green) and V (blue). Undigested (–HpaII) and digested (+HpaII) samples were PCR amplified with the respective primer sets and the resulting products of primer set IV and V for individual samples were mixed before separation by the capillary electrophoresis. The analysis was conducted with GeneMapper software (Applied Biosystems). (A) In contrast with undigested sample, HpaII-digested DNA sample from male individual could not be amplified by PCR. (B) Results of the analysis in female individual with no skewing of X-chromosome inactivation shows similar proportions of products in digested and undigested sample. (C) Results of the analysis in female individual with extreme skewing of X-chromosome inactivation show that one of the pair of alleles observed in undigested sample is completely missing in the digested sample.

at 68 °C for 30 min. The resulting PCR products were separated on a 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) as an internal size standard. The peak area was measured using GeneMapper software v4.1 (Applied Biosystems).

The XCI ratio determined by the assay was calculated as previously described in [44]. The final X-inactivation pattern is expressed as the ratio of the longer:shorter allele; the value given is the average of two measurements. Because it was not known if the alleles from different loci were in *cis*, direct comparison of the XCI ratios was not possible. The results were expressed as the deviation from the average ratio (50:50) on a scale from 0 to 50%, where 0% corresponded to equal expression from both alleles, and 50% represented expression solely from one allele.

Determination of XCI pattern using the AR locus

X-chromosome inactivation was determined by the previously published AR-MSP method in the AR locus [31]. Samples modified by bisulfite treatment were PCR amplified with two primer sets AR-M and AR-U that specifically amplify the methylated sequence on Xi and the unmethylated sequence on Xa, respectively. PCR products were separated by capillary electrophoresis and the XCI ratio was calculated from the peak areas according to the formula published in the literature [31].

In 18 samples, we also compared the results with the conventional HUMARA method, which combines PCR with methylation-sensitive restriction digest of genomic DNA. Primer sequences and reaction conditions were the same as published [45] with the upper primer being fluorescently labeled with HEX dye.

Determination of XCI pattern using transcription-based assays

XCI patterns in the HUMARA-informative samples were also determined using the transcription-based assays targeting exonic SNPs in *ZNF75D* (rs1129093), *IDS* (rs11549009), *MAGED2* (rs1043031 and rs1043034) and *MED12* (rs5030619) genes. Details of the procedures are described in Supplementary Methods.

Statistics

Statistical analysis (Pearson correlation, method comparison) was performed using XLSTAT software package (Addinsoft, New York, NY). Agreement of the assays and repeatability was determined according to the Bland–Altman method [46].

Results

Novel methylation-sensitive restriction/PCR-based XCI assays were based on five sets of primers (numbered I, II, III, IV, and V) selected in preliminary experiments as described above. The assays were evaluated

for agreement with the established XCI assay, the HUMARA (AR-MSP) method and, where possible, also with each other (Supplementary Fig. S3). The results are summarized in Supplementary Table S1. Positions of the amplified loci on the X chromosome and the targeted genes and repeats are shown in Fig. 2A and in Table 1, respectively.

None of the studied loci could be amplified by PCR from male DNA samples digested with methylation-sensitive restriction enzymes (Fig. 1A, Supplementary Fig. S2A, Fig. 2B) indicating that the loci are not methylated on the single male active X chromosome.

Heterozygosity of the new loci

The heterozygosity of the selected loci was investigated in 100 females. Assays that used primer sets I, II, III, IV, and V were informative in 13, 18, 24, 61, and 55 samples, respectively. The AR locus was informative in 67 samples from the same cohort. Samples were considered informative if the difference in the length of alleles was two or more repeats.

Repeatability of the assays

The repeatability of the results obtained with different assays was evaluated by the coefficient of repeatability [46] that represents the value below which the absolute difference between two repeated test results may be expected to lie with 95% probability. The coefficient of repeatability was 8,6% for the AR-MSP assay, 3,6% for the conventional HUMARA assay (similar result in [47]), 6,6% for assay I, 3,6% for assay II, 7,0% for assay III, 8,1% for assay IV and 12,9% for assay V, confirming that the assays provided consistent results. Only the results obtained by assay V were less repeatable than those obtained with the AR-MSP assay.

Concordance of the results obtained with different assays

The AR-MSP method was previously shown to provide results consistent with the conventional HUMARA assay [31]. We compared XCI patterns obtained by the AR-MSP assay with those acquired by the conventional HUMARA assay (scale 0–100%). The mean of differences (MD) was 0,5% (standard deviation [SD] \pm 7,9%) and we observed very high correlation (Pearson correlation coefficient $r = 0,926$, $p < 0,0001$, $n = 18$) between the methods. To support the assumption of trueness of the XCI patterns determined by the AR-MSP method we also compared the results to those determined by transcription-based assays. The assays were highly correlated and in good agreement (see Supplementary Fig. S4). For further work the AR-MSP was thus considered to be the reference method for comparison with the novel methods (Fig. 3). The methods were evaluated according to the Bland–Altman method [46].

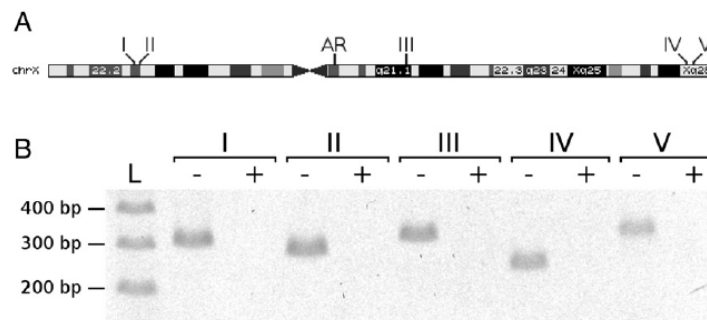


Fig. 2. (A) Location of the selected loci on the X chromosome (adapted from the UCSC Genome Browser). (B) Representative results of individual assays for samples obtained from healthy men. Lanes with + or – signs indicate whether DNA was predigested with methylation-sensitive restriction enzyme (*HpaII/HhaI*) or not. Lane L, ladder.

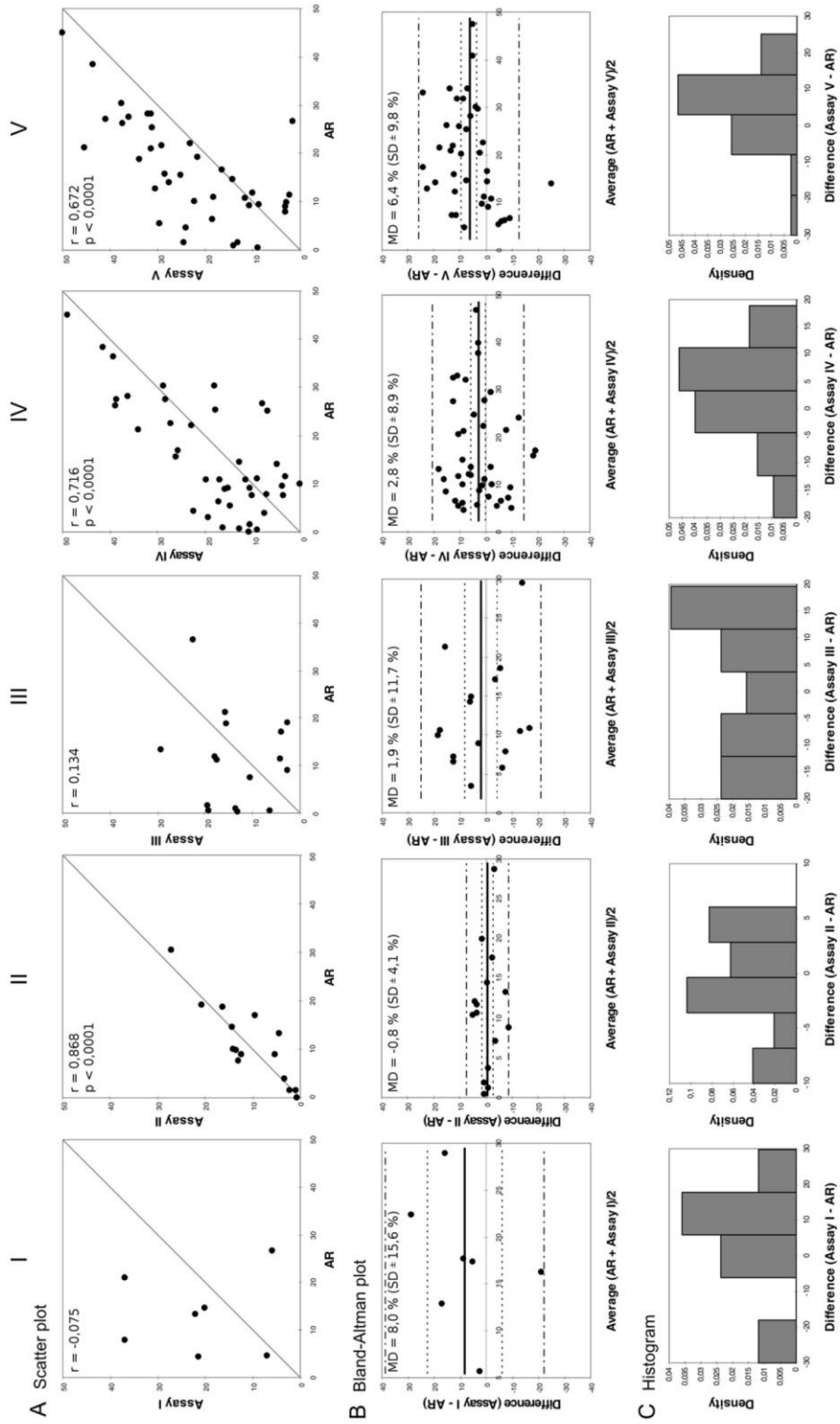


Fig. 3. Comparison of the results obtained with individual assays and the AR-MSP assay. Each column is dedicated to one novel assay. (A) Scatter plots supplemented with the line of equality and Pearson correlation coefficient (r) with significance (p). (B) Bland–Altman plots showing the mean of differences – the bias (solid line), 95% confidence interval for the bias (dashed line), 95% limits of agreement (dash-dotted line). Values of the means of differences (MD) and standard deviations (SD) are specified in the upper part of the plots. (C) Histograms of the differences for evaluation of normality of distributions. The outlier noted in the Discussion section is the point most distant from the average in the graphs of the middle panel in assays I, IV, and V.

Because of the low level of heterozygosity of the locus amplified by primer set I, we could compare results of only seven DNA samples and these did not correlate with the AR-MSP assay ($r = -0,075$). However, five samples not informative for the AR locus were also compared to the other new assays as indicated in Supplementary Fig. S3 and this showed by contrast very good agreement. Similar results were obtained for assay III. In comparison with assay I, it was more informative, but it possibly suffered from a lack of highly skewed samples to compare. Correlation with the AR-MSP assay was very weak ($r = 0,134$), mean of differences was 1,9% (SD $\pm 11,7\%$). On the other hand, the correlation observed for assay II and the AR-MSP was high ($r = 0,868$, $p < 0,0001$). Mean of differences was $-0,8\%$ (SD $\pm 4,1\%$). Correlation observed for assay IV was also high ($r = 0,716$, $p < 0,0001$). Mean of differences was 2,8% (SD $\pm 8,9\%$). The assay using primer set V showed moderate correlation ($r = 0,672$, $p < 0,0001$). Mean of differences (bias) was 6,4% (SD $\pm 9,8\%$). In contrast to previous assays, confidence interval for bias did not include zero, which suggests that there is a positive bias. Histograms of the differences (Fig. 3C) are more relevant in assay IV and V that have more available data points and indicate normal distributions.

On the basis of the presented evidence, the best assay as for agreement with the AR-MSP assay is assay II that has a reasonably low SD leading to narrow 95% limits of agreement (mean $\pm 1,96 \cdot$ SD). Unfortunately, this method is not widely applicable due to poorly polymorphic STR. On the other hand, assays IV and V make use of much more variable STRs but suffer from higher SD and thus wider 95% limits of agreement. Therefore, some level of discordance must be expected when using these assays. Our data do not clearly support use of assays I and III as viable methods for determination of X-inactivation.

Discussion

In our study, a combination of the AR locus with loci used by primer sets II, IV, and V for X-inactivation studies significantly increased the amount of informative females from 67% (AR-based assay only) to 96%. Moreover, 69% of samples can be evaluated by two or more assays, thus increasing the reliability of the result (Supplementary Table S1). The novel assays are conveniently all based on trinucleotide repeats, which have a lower risk of distortions due to stutter artifacts than dinucleotide repeats.

In general, there was a good agreement between the AR-based assay and the selected assays, which can thus be used interchangeably with AR-based methods. Assay V, however, showed a mild positive bias. This means that this method tended to give slightly higher values of skewing than the AR-based assay and novel assays II and IV. In a similar case, Bland and Altman [46] suggested adjustment of the results by subtracting the bias which may be a suitable way to treat the results of assay V. Pearson correlation coefficients of the difference versus average data showed no significant trend (data not shown) in the differences between methods as the average increased, implying that the bias is constant across the whole range.

Interestingly, one of the samples (No. 79 in Supplementary Table S1) gave consistently discordant results between the AR-MSP assay and the new assays I, IV, and V (Fig. 3). We determined the XCI pattern in this sample with the conventional HUMARA method and this result was in concordance with the AR-MSP assay. Consequently, we did not exclude this sample as an outlier, although the cause of the discordant results was not obvious. Nevertheless, it is of interest that the same sample provided discordant results when comparing the AR-MSP assay with the transcription-based assays (Supplementary Fig. S4).

Discrepancies between individual assays have been previously described in the literature [29, 30]. These inconsistent results may arise when the methylation status of studied CpG sites fails to correlate with X-chromosome inactivation or due to other technical reasons. The presence of stutter peaks may also to some level contribute to the inconsistency. Therefore, introduction of new assays in determination

of XCI patterns is not only useful for assessing uninformative samples but also for confirmation of XCI patterns determined by conventional methods. As the results of assays based on testing of methylation patterns in individual X-linked genes are only approximations of true values of X-inactivation skewing, we chose to evaluate the methods using the Bland–Altman method [46], which is the statistical tool of choice for comparison of similar indirect methods.

The HUMARA method is often considered the “reference” X-inactivation assay, because its results generally agree with the X-inactivation, although there are significant caveats associated with the acceptance of the results as the true measure of X-inactivation skewing. The test is by far most frequently performed in blood cells and the result is considered to be similar to the desired XCI ratio in more relevant but less accessible tissues. Swierczek et al. [48] found that allelic expression of human androgen receptor was not fully consistent with the DNA-methylation based assay. They proposed that the crux of the problem may lie in the fact that the HUMARA assay does not evaluate DNA methylation in the AR promoter but in the distant first exon of the gene. The discrepancy can occur when the methylation from the promoter does not extend to the first exon of the gene. In contrast, Mossner et al. [49] pointed out to possible technical problems in the study of Swierczek et al. as the explanation. The issue is apparently not settled, but it is important to note that the discrepancy was observed only in a subset of individuals and both studies evaluated only about thirty females each. Although the explanation proposed by Swierczek et al. is merely a speculation, it would well explain the discrepancy in the individual discussed above between AR-based methods and our new assays, which evaluate methylation of CpGs located in promoters.

Conveniently, when combining assays II, IV, and V with the HUMARA assay, just two restriction digest mixtures for one sample are needed and PCR products of individual primer sets can be mixed thanks to the use of different fluorescent dyes and product sizes. The assays presented here could be also used in other applications, where AR-based assays are applied, e.g. to evaluate clonality of neoplastic tissue, yet the main benefit of the new combined X-inactivation test is the potential for testing of X-inactivation patterns in a high proportion of HUMARA-uninformative females. Our novel assays appeared robust and well-suited for routine analysis, however, before their application in the clinical practice they may require further validation in a larger cohort and/or selected disease population.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2014.10.001>.

Acknowledgments

This work was supported by grant IGA MZ NT14015-3/2013 from the Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic, grant GAUK No. 42314 from the Grant Agency of Charles University in Prague, and also by projects PRVOUK-P24/LF1/3, SVV 260 022 and MH CZ-DRO VFNG4165. The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] M.F. Lyon, Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.), *Nature* 190 (1961) 372–373.
- [2] R. Favier, J.M. Lavergne, J.M. Costa, et al., Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female, *Blood* 96 (2000) 4373–4375.
- [3] S. Valleix, C. Vinciguerra, J.M. Lavergne, et al., Skewed X-chromosome inactivation in monozygotic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A, *Blood* 100 (2002) 3034–3036.
- [4] M.P. Biccocchi, B.R. Migeon, M. Pasino, et al., Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A, *Eur. J. Hum. Genet.* 13 (2005) 635–640.
- [5] N.K. Renault, S. Dyack, M.J. Dobson, et al., Heritable skewed X-chromosome inactivation leads to haemophilia A expression in heterozygous females, *Eur. J. Hum. Genet.* 15 (2007) 628–637.
- [6] C.M. Bennett, E. Boye, E.J. Neufeld, Female monozygotic twins discordant for hemophilia A due to nonrandom X-chromosome inactivation, *Am. J. Hematol.* 83 (2008) 778–780.

- [7] A. Pavlova, H. Brondke, J. Müsebeck, et al., Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 976–982.
- [8] Y. Miyawaki, A. Suzuki, Y. Fujimori, et al., Severe hemophilia A in a Japanese female caused by an F8-intron 22 inversion associated with skewed X chromosome inactivation, *Int. J. Hematol.* 92 (2010) 405–408.
- [9] K. Okumura, Y. Fujimori, A. Takagi, et al., Skewed X chromosome inactivation in fraternal female twins results in moderately severe and mild hemophilia B, *Haemophilia* 14 (2008) 1088–1093.
- [10] J.M. Esquilin, C.M. Takemoto, N.S. Green, Female factor IX deficiency due to maternally inherited X-inactivation, *Clin. Genet.* 82 (2012) 583–586.
- [11] N. Andreu, N. Pujol-Moix, L. Martínez-Lostao, et al., Wiskott–Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation, *Blood Cells Mol. Dis.* 31 (2003) 332–337.
- [12] V. Daza-Cajigal, N. Martínez-Pomar, A. García-Alonso, et al., X-linked thrombocytopenia in a female with a complex familial pattern of X-chromosome inactivation, *Blood Cells Mol. Dis.* 51 (2013) 125–129.
- [13] B. Boonyawat, S. Dhanraj, F. Al Abbas, et al., Combined de-novo mutation and non-random X-chromosome inactivation causing Wiskott–Aldrich syndrome in a female with thrombocytopenia, *J. Clin. Immunol.* 33 (2013) 1150–1155.
- [14] L. Manco, J. Pereira, L. Relvas, et al., Chronic hemolytic anemia is associated with a new glucose-6-phosphate dehydrogenase in-frame deletion in an older woman, *Blood Cells Mol. Dis.* 46 (2011) 288–293.
- [15] M. Cazzola, A. May, G. Bergamaschi, et al., Familial-skewed X-chromosome inactivation as a predisposing factor for late-onset X-linked sideroblastic anemia in carrier females, *Blood* 96 (2000) 4363–4365.
- [16] M. Aivado, N. Gattermann, A. Rong, et al., X-linked sideroblastic anemia associated with a novel ALAS2 mutation and unfortunate skewed X-chromosome inactivation patterns, *Blood Cells Mol. Dis.* 37 (2006) 40–45.
- [17] M. Boudewijns, J.J. van Dongen, A.W. Langerak, The human androgen receptor X-chromosome inactivation assay for clonality diagnostics of natural killer cell proliferations, *J. Mol. Diagn.* 9 (2007) 337–344.
- [18] G.L. Chen, J.T. Prchal, X-linked clonality testing: interpretation and limitations, *Blood* 110 (2007) 1411–1419.
- [19] A.R. Meetei, M. Levitus, Y. Xue, et al., X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B, *Nat. Genet.* 36 (2004) 1219–1224.
- [20] S.T. Holden, J.J. Cox, I. Kesterton, et al., Fanconi anaemia complementation group B presenting as X linked VACTERL with hydrocephalus syndrome, *J. Med. Genet.* 43 (2006) 750–754.
- [21] J.M. Puck, C.C. Stewart, R.L. Nussbaum, Maximum-likelihood analysis of human T-cell X chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 50 (1992) 742–748.
- [22] R. Kutsche, C.J. Brown, Determination of X-chromosome inactivation status using X-linked expressed polymorphisms identified by database searching, *Genomics* 65 (2000) 9–15.
- [23] R.C. Allen, H.Y. Zoghbi, A.B. Moseley, et al., Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation, *Am. J. Hum. Genet.* 51 (1992) 1229–1239.
- [24] R.W. Hendriks, Z.Y. Chen, H. Hinds, et al., An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the monoamine oxidase A gene, *Hum. Mol. Genet.* 1 (1992) 187–194.
- [25] B. Vogelstein, E.R. Fearon, S.R. Hamilton, et al., Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome, *Cancer Res.* 47 (1987) 4806–4813.
- [26] D.G. Gilliland, K.L. Blanchard, J. Levy, et al., Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 6848–6852.
- [27] L. Carrel, H.F. Willard, An assay for X inactivation based on differential methylation at the fragile X locus, FMR1, *Am. J. Med. Genet.* 64 (1996) 27–30.
- [28] Y. Boyd, N.J. Fraser, Methylation patterns at the hypervariable X-chromosome locus DXS255 (M27B): correlation with X-inactivation status, *Genomics* 7 (1990) 182–187.
- [29] C. Beever, B.P. Lai, S.E. Baldry, et al., Methylation of ZNF261 as an assay for determining X chromosome inactivation patterns, *Am. J. Med. Genet. A* 120A (2003) 439–441.
- [30] B. Bertelsen, Z. Tümer, K. Ravn, Three new loci for determining X chromosome inactivation patterns, *J. Mol. Diagn.* 13 (2011) 537–540.
- [31] T. Kubota, S. Nonoyama, H. Tonoki, et al., A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR, *Hum. Genet.* 104 (1999) 49–55.
- [32] J.M. Amos-Landgraf, A. Cottle, R.M. Plenge, et al., X chromosome inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females, *Am. J. Hum. Genet.* 79 (2006) 493–499.
- [33] J. Goecks, A. Nekrutenko, J. Taylor, et al., Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences, *Genome Biol.* 11 (2010) R86.
- [34] D. Blankenberg, G. Von Kuster, N. Coraor, et al., Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 89 (2010) 19.10.1–19.10.21.
- [35] B. Giardine, C. Riemer, R.C. Hardison, et al., Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis, *Genome Res.* 15 (2005) 1451–1455.
- [36] A.H. Mangs, B.J. Morris, The human pseudoautosomal region (PAR): origin, function and future, *Curr. Genomics* 8 (2007) 129–136.
- [37] W.J. Kent, C.W. Sugnet, T.S. Furey, et al., The human genome browser at UCSC, *Genome Res.* 12 (2002) 996–1006.
- [38] A.J. Sharp, E. Stathaki, E. Migliavacca, et al., DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes, *Genome Res.* 21 (2011) 1592–1600.
- [39] M. Legendre, N. Pochet, T. Pak, et al., Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability, *Genome Res.* 17 (2007) 1787–1796.
- [40] C. Park, L. Carrel, K.D. Makova, Strong purifying selection at genes escaping X chromosome inactivation, *Mol. Biol. Evol.* 27 (2010) 2446–2450.
- [41] L. Carrel, H.F. Willard, X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females, *Nature* 434 (2005) 400–404.
- [42] R. Sudbrak, G. Wieczorek, U.A. Nuber, et al., X chromosome-specific cDNA arrays: identification of genes that escape from X-inactivation and other applications, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 77–83.
- [43] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, et al., Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics* 13 (2012) 134.
- [44] M.M. Thouin, J.M. Giron, E.P. Hoffman, Detection of nonrandom X chromosome inactivation, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 35 (2003) 9.7.1–9.7.6.
- [45] O. Racchi, R. Mangerini, D. Rapezzi, et al., X chromosome inactivation patterns in normal females, *Blood Cells Mol. Dis.* 24 (1998) 439–447.
- [46] J.M. Bland, D.G. Altman, Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet* 1 (1986) 307–310.
- [47] L. Busque, Y. Paquette, S. Provost, et al., Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies, *Blood* 113 (2009) 3472–3474.
- [48] S.J. Swierczek, L. Piterkova, J. Jelinek, et al., Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state, *Blood* 119 (2012) e100–e109.
- [49] M. Mossner, F. Nolte, G. Hütter, et al., Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay, *J. Med. Genet.* 50 (2013) 108–117.



Hyperuricemia and gout due to deficiency of hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase in female carriers: New insight to differential diagnosis



Eva Kostalova^a, Karel Pavelka^b, Hana Vlaskova^a, Blanka Stiburkova^{a,b,*}

^a Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

^b Institute of Rheumatology, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2014

Received in revised form 25 November 2014

Accepted 25 November 2014

Available online 1 December 2014

Keywords:

Gout

Hyperuricemia

Hypoxanthine–guanine

phosphoribosyltransferase deficiency

Lesch–Nyhan syndrome

Purine metabolism

ABSTRACT

Background: X-linked hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency in an inherited disorder of purine metabolism is usually associated with the clinical manifestations of hyperuricemia. A variable spectrum of neurological involvement occurs predominantly in males. Females are usually asymptomatic. Carrier status cannot be confirmed by biochemical and enzymatic methods reliably.

Methods: We studied clinical, biochemical and molecular genetic characteristics of Czech families with hyperuricemia and HPRT deficiency. We analyzed age at diagnosis, clinical symptoms, uricemia, urinary hypoxanthine and xanthine, HPRT activity in erythrocytes, mutation in the *HPRT1* gene, X-inactivation, and major urate transporters.

Results: A mutation in the *HPRT1* gene in family A was confirmed in one boy and four females. Three females with hyperuricemia had normal excretion of purine. One female was normouricemic. An 8-month-old boy with neurological symptoms showed hyperuricemia, increased excretion of urinary hypoxanthine and xanthine and a very low HPRT activity in erythrocytes. We have found three other unrelated female carriers with hyperuricemia and normal excretion of hypoxanthine and xanthine among other families with HPRT deficiency.

Conclusions: HPRT deficiency needs to be considered in females with hyperuricemia with normal excretion of purine metabolites. Familial hyperuricemia and/or nonfamilial gout should always be further investigated, especially in children.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency is an X-linked inherited metabolic disorder (OMIM 308000) classified into distinguished forms. Partial HPRT deficiency, also known as Kelley–Seegmiller syndrome (#300323), is usually associated with the clinical manifestations of purine overproduction which results in increased uric acid synthesis (hyperuricemia/gout, urolithiasis, nephrolithiasis and kidney stones); however, a variable spectrum of neurological manifestations, such as motor disability and intellectual impairment, is available (Lesch–Nyhan variants). Classical features of severe deficiency, Lesch–Nyhan syndrome (#300322), are moreover characterized by self-injurious behavior.

As a first step, the diagnosis of HPRT is determined by hyperuricemia and hyperuricosuria with urinary hypoxanthine and xanthine elevation. Secondly, HPRT deficiency is confirmed by low HPRT activity in erythrocytes. Finally, the results are confirmed by molecular genetics. Treatment controlling uric acid overproduction with allopurinol or febuxostat is available; however, allopurinol has not usually been considered to cause behavioral and neurological symptoms [1,2]. A recently reported treatment with S-adenosylmethionine in children with the Lesch–Nyhan syndrome showed a dramatic reduction of self-injurious and aggressive behavior, as well as a milder reduction of dystonia [3].

The human *HPRT1* gene is located on chromosome Xq26.1 and comprises 9 exons and 8 introns. The HGPRT enzyme (EC 2.4.2.8) has a central role in purine metabolism: catalysis of purine salvage and conversion of hypoxanthine to inosine monophosphate and guanine to guanosine monophosphate. At present, 410 mutations in the *HPRT1* gene causing variable disease phenotype (186 missense/nonsense, 59 splicing, 55 small deletions, 23 small insertions, 13 small indels, 65 gross deletions, 6 gross insertions/duplications, 3 complex rearrangements) have been described (HGMD® Professional 2014.2, June 2014).

Abbreviations: HPRT, hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase; HUMARA, human androgen receptor gene; MRI, brain magnetic resonance imaging; PCR, polymerase chain reaction

* Corresponding author at: Institute of Rheumatology, Na Slupi 4, 128 50 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 234075319; fax: +420 224914451.

E-mail address: stiburkova@revma.cz (B. Stiburkova).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.11.026>

0009-8981/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

We report on a Czech family that X-linked HPRT deficiency may present as hyperuricemia and/or gout in both male and female carriers. They represent as a case on how unreliable the diagnostics of carriers are on biochemical and enzymatic levels only.

2. Materials and methods

2.1. Clinical and biochemical findings

The proband, a female A II/1 (Fig. 1), was brought to our laboratory at the same time as her nephew A III/4. The female A II/1 has been analyzed for hyperuricemia at the age of 19 years. She developed the first clinical gout attack at the age of 33 years in classical I. MTP joint localization. Since then, she had 8 gout attacks lasting usually for 1–2 weeks. She has been treated by 200 mg allopurinol daily and she has used colchicine during attacks. Without allopurinol treatment, she had hyperuricemia with normal purine excretion. Her 8-month-old nephew A III/4 was born after 34 weeks of uncomplicated pregnancy with Apgar score of 9–10–10. Abnormal development associated with hypotonia was noted at 3 months of age. His milestones were delayed. Intermittent action dystonia has developed. His mother (A II/2) observed orange crystals in the diaper once at the time when treatment with allopurinol began. Renal ultrasound at the age of 13 months was suspicious of incipient nephrocalcinosis without nephrolithiasis. Brain magnetic resonance imaging (MRI) showed normal results. At the age of 24 months, the patient sometimes bites buccal mucosa as compulsive self-injurious behavior characteristic for Lesch–Nyhan syndrome. Detailed purine metabolic investigations were performed as we reported previously [4,5].

2.2. Molecular genetic analysis

All tested individuals provided their informed consent (approved by the Ethics Committee of the authors' home institution) to participation in the analyses and the presentation of results. Genomic DNA and total RNA were extracted from peripheral white blood cells for sequencing. Genomic DNA was extracted also from urine and buccal swabs

for X-inactivation analyses. Genomic DNA was isolated using QIAamp columns (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) or NucleoSpin Blood (Macherey–Nagel GmbH, Düren, Germany). Total RNA was extracted by BiOstic Blood Total RNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). mRNA was reverse-transcribed using High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

All coding exons of the *HPRT1* gene and selected exons of the *SLC2A9*, *SLC22A12*, *SLC17A3* and *ABCG2* genes have been amplified from genomic DNA. For transcript analyses, cDNA was used for PCR amplification in 2 RT-PCR products. Primer specification and reaction conditions are available upon request. PCR and RT-PCR products were purified using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) and directly sequenced on a capillary sequencer 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

The X-chromosome inactivation status was analyzed by studying the methylation of HpaII sites in the first exon of the human androgen receptor gene (*HUMARA*), which correlates with X-chromosome inactivation [6]. The novel STR polymorphic sites were used by Musalkova et al. [7].

3. Results

3.1. Biochemical analysis

The proband of family A II/1, her daughter A III/1 and her niece A III/3 had hyperuricemia with normal urinary excretion of hypoxanthine and xanthine. Her 8-month-old nephew III/4 demonstrated hyperuricemia, hyperuricosuria and increased urinary excretion of hypoxanthine and xanthine. The HPRT activity in erythrocytes was 5 nmol/h/mgHb and confirmed HPRT deficiency. One female (A II/2) was normouricemic. The patient A I/1 has been treated for hyperuricemia and gout since the age of 53 years. He does not have family mutation in the *HPRT1* gene. Pedigree and family data are shown in Fig. 1 and Table 1.

Subsequently, we analyzed biochemical and clinical data from other families with HPRT deficiency. We found three other unrelated heterozygous female carriers (a 12-year-old girl B, an infant C and an adult

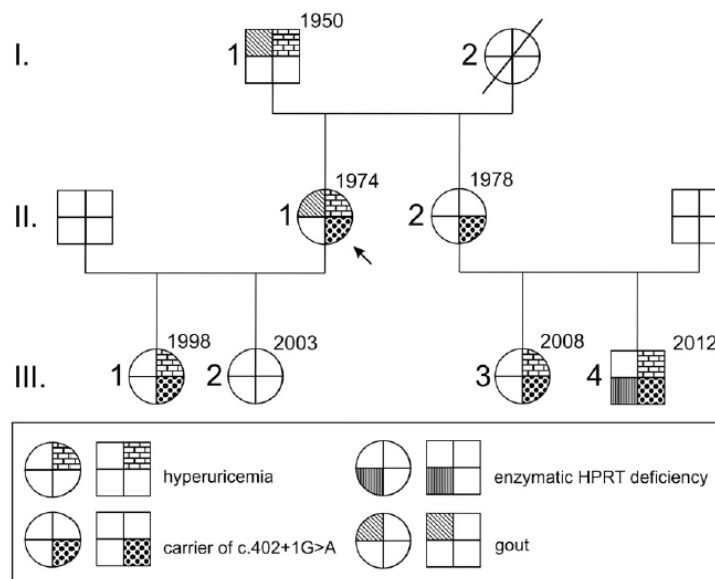


Fig. 1. Family A pedigree.

Table 1
Clinical, biochemical and molecular genetic findings in family A and selected unrelated females with HPRT deficiency.

Clinical, biochemical and molecular genetic findings in family A and selected unrelated females with HPRT deficiency											
P	Sex	Age at dg	Clinical symptoms	sUA (μmol/l)	uHyp		HPRT in ery (nmol/h/mg Hb)	Mutations in the <i>HPRT1</i> gene			
					uXan (mmol/mol Creat)			rs1165165 (<i>SLC17A3</i>)	rs2231142 (<i>ABCG2</i>)	rs16890979 (<i>SLC2A9</i>)	
A II/1	F	39 yrs	gout	478	11.2	6.9	216	<i>HPRT1</i> : c.[402+1G>A];[-]	c.[298G>A];[-]	c.[421C>A];[-]	c.[844G>A];[-]
A II/2	F	35 yrs	-	287	7.2	4.8	190	<i>HPRT1</i> : c.[402+1G>A];[-]	c.[298G>A];[-]	c.[-];[-]	c.[844G>A];[-]
A III/1	F	15 yrs	-	372	7.4	20.4	214	<i>HPRT1</i> : c.[402+1G>A];[-]	c.[298G>A];[-]	c.[-];[-]	c.[844G>A];[844G>A]
A III/3	F	5 yrs	-	420	11.9	18.4	164	<i>HPRT1</i> : c.[402+1G>A];[-]	c.[298G>A];[-]	c.[-];[-]	c.[-];[-]
A III/4	M	8 mos	LND	494	11.3	64.9	5	<i>HPRT1</i> : c.[402+1G>A];[0], splice	c.[-];[0]	c.[-];[0]	c.[844G>A];[-]
A I/1	M	63 yrs	gout	365*	13.9*	13.2*	193	<i>HPRT1</i> : c.[-];[0]	c.[298G>A];[0]	c.[421C>A];[0]	c.[-];[-]
B	F	12 yrs	-	412	14.2	11.3	88	<i>HPRT1</i> : c.[158T>C];[-], p.V53A	nd	nd	nd
C	F	3 mos	-	408	28.4	21.5	nd	<i>HPRT1</i> : g.[1484_22498delinsTCTGCCTCGA];[=]del of exons 2–3, del 21014 bp, ins 10 bp	nd	nd	nd
D	F	55 yrs	-	374	15.3	13.0	203	<i>HPRT1</i> : c.[215A>G];[-], p.Y72C	nd	nd	nd

sUA = serum urate (ref. ranges 120–340); uHyp = urine hypoxanthine (ref. ranges <30); uXan = urine xanthine (ref. ranges <25); HPRT in ery = HPRT activity in erythrocytes (ref. ranges 50–500); Creat = creatinine; P = patient; A, B, C, D = notation of family; dg = diagnosis; M = male; F = female; yrs = years; mos = months; - = asymptomatic; LND = Lesch-Nyhan disease; nd = not done; * under allopurinol treatment.

woman D) with hyperuricemia and normal excretion of hypoxanthine and xanthine. They were clinically asymptomatic when the diagnosis was confirmed. Biochemical, clinical and genetic data are summarized in Table 1. The female carrier B was from the family with a symptomatic carrier (her sister) who has been treated for gout since the first gout attack at the age of 9 years. The female carrier C was from the family with a male patient with classic Lesch–Nyhan syndrome. The proband from the family D was an adult man with arthritis, nephrolithiasis and hyperuricemia.

3.2. Molecular genetic analysis

The *HPRT1* gene analysis in family A showed the previously described splicing mutation c.402+1G>A [8]. The first analyzed person was the boy with HPRT deficiency (III/4). The hemizygoty of c.402+1G>A was detected in his genomic DNA isolated from leukocytes. We analyzed a predicted splice defect in transcript due to c.402+1G>A (substitution on donor splice site). cDNA was used for PCR amplification with one pair of specific primers; we detected 3 PCR products on horizontal agarose gel electrophoresis (Fig. 2). No correctly spliced RNA variant was observed on sequencing electropherogram. Three abnormal splicing variants were identified: a) r.384_385ins384+103_384+140; r.402_403ins402+1_402+67; r.402+1g>a. This splice variant contains an insertion of 38 bp from intron 4 between exons 4 and 5 and an insertion of 67 bp from intron 5 between exons 5 and 6 together with the presence of mutation r.402+1g>a; b) r.385_402del. This splice variant contains a deletion of exon 5; and c) r.385_485del. This splice variant contains a deletion of exons 5 and 6. Heterozygoty for family mutation c.402+1G>A was confirmed in patient's mother (A II/2), patient's 4-year-old sister (A III/3), mother's sister (A II/1) and her 15-year-old daughter (A III/1).

The results of X-inactivation patterns in the family showed the calculated ratio of 0.4:99.6% (SD ± 0.1%) in the patient A II/1 and 1.5:98.5% and 0.2:99.8% in the patient A II/2, respectively, with the

paternal wt allele being more active, which can be described as extreme skewing of X-inactivation. These results were obtained from genomic DNA from leukocytes. We received different results from genomic DNA from urine (45:55%) or buccal swabs (49:51%) in the patient A II/2.

Analysis of urate transporters in the proband (A II/1) revealed heterozygoty for three non-synonymous allelic variants: c.844G>A

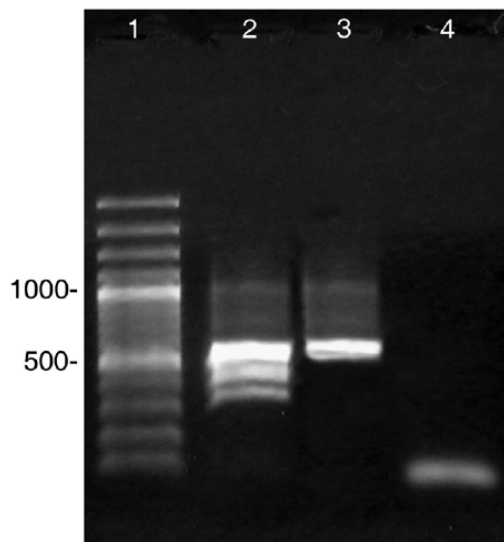


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product. Lane 1 – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (thick bands: 500 bp and 1000 bp); lane 2 – RT-PCR products from the affected boy from family A (III/4 in pedigree), there are 3 abnormal splice variants; lane 3 – wt control (PCR product is 526 bp long); lane 4 – blank control.

(rs16890979, p.V2821) in *SLC2A9*, c.421C>A (rs2231142, p.Q141K) in *ABCG2* and c.298G>A (rs1165165, p.A100T) in *SLC17A3*. Variants rs16890979 and rs2231142 are associated with hyperuricemia [10,11]; however, segregation analysis of the family did not confirm these variants as being probably disease-associated polymorphism (Table 1).

4. Discussion

HPRT deficiency shows an X-linked recessive inheritance pattern; thus, Lesch–Nyhan syndrome occurs almost exclusively in males. Female carriers are usually asymptomatic; fewer than ten clinically affected females were described previously [6,8,9]. Carrier diagnosis is an important issue for most families with HPRT deficiency and carrier status cannot be confirmed by biochemical and enzymatic methods in most of the cases. Accurate carrier diagnosis can be performed by molecular genetics; however, in about 5% of patients, no molecular defect is found [10,11].

In our reported family with HPRT deficiency, we have found a full spectrum of Lesch–Nyhan syndrome in male probands. However, we identified three female carriers with normal excretion of hypoxanthine and xanthine, normal activity of HPRT in erythrocytes, and hyperuricemia and/or gout. Our results of the X-inactivation study in this family showed an extremely skewed inactivation ratio (1:99) in favor of the wild-type allele in both affected females. Although these results from genomic DNA from leukocytes show an extreme skewing, it is noteworthy that the results of X-inactivation from genomic DNA from urine or buccal swabs are random.

Serum uric acid concentration is a complex phenotype influenced by both genetic and environmental factors, as well as their interactions. Hyperuricemia may be the result of an overproduction and/or inefficient renal excretion. Therefore, we also studied major urate transporters in the observed family [12,13]. However, no allelic variants in *SLC2A9*, *SLC22A12*, *SLC17A3* and *ABCG2* segregated with hyperuricemia were found.

Abnormal findings in our family raise the question of whether the reported biochemical abnormalities are in agreement with the carrier status of HPRT deficiency. There have been only a few studies of purine metabolism in HPRT carriers. One comprehensive study [14] showed that an elevated hypoxanthine and/or xanthine excretion rate differentiates most heterozygotes for HPRT deficiency from non-carrier women, and thus could be useful for carrier diagnosis. However, we found physiological purine metabolite levels in three carriers. Moreover, we confirmed these unexpected findings by identification of three other unrelated female carriers with different mutations in the *HPRT1* gene and normal excretion of xanthine and hypoxanthine and hyperuricemia in our cohort of 6 families with HPRT deficiency.

5. Conclusions

Our unusual findings expand the differential diagnosis of hyperuricemia and gout in females. HPRT deficiency is considered to be a rare disorder, and most physicians will likely see only a few cases during their careers. We believe that this case is important for several reasons. First, it highlights the fact that HPRT deficiency may present as hyperuricemia and/or gout and that the presence of non-articular symptoms and increased uric acid in serum in females should alert the rheumatologist to its possible presence. Second, familial hyperuricemia and/or gout are an important clue and should always be further investigated. Third, HPRT deficiency should also be considered in females with hyperuricemia and normal excretion of xanthine and hypoxanthine. Simple treatment regimens such as a low-purine diet combined with a treatment with allopurinol or febuxostat allow better control of the disease and prevent the development of serious renal and arthritic

complications. The key to identifying this purine disorder is greater awareness among rheumatologists, nephrologists and urologists – its diagnosis and therapeutic management require a multidisciplinary approach.

Authors' contributions

All the authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content and all the authors approved the final version to be published. Study conception and design: SB; clinical observation: KE, PK; acquisition of data: VH, KE, SB; analysis and interpretation of data: KE, VH, PK, SB.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dita Musalkova, MSc. for a part of X-inactivation assay. This study was supported by the grants from the Ministry of Health of the Czech Republic (RVO VF64165 and the project for conceptual development of Research organization 023728 Institute of Rheumatology) and by institutional support provided by the program at Charles University in Prague PRVOUK-P24/LF1/3.

References

- [1] Simmonds HA, Reiter S, Davies PM, Cameron JS. Orotidine accumulation in human erythrocytes during allopurinol therapy: association with high urinary oxypurinol-7-riboside concentrations in renal failure and in the Lesch–Nyhan syndrome. *Clin Sci (Lond)* 1991;80:191–7.
- [2] Duley JA, Christodoulou J, de Brouwer AP. The PRPP synthetase spectrum: what does it demonstrate about nucleotide syndromes? *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2011;30:1129–39.
- [3] Chen BC, Balasubramaniam S, McGown IN, O'Neill JP, Chng GS, Keng WT, et al. Treatment of Lesch–Nyhan disease with S-adenosylmethionine: experience with five young Malaysians, including a girl. *Brain Dev* 2014;36:593–600.
- [4] Stiburkova B, Krijt J, Vyletal P, Bartl J, Gerhatova E, Korinek M, et al. Novel mutations in xanthine dehydrogenase/oxidase cause severe hypouricemia: biochemical and molecular genetic analysis in two Czech families with xanthinuria type I. *Clin Chim Acta* 2012;413:93–9.
- [5] Sebesta I, Stiburkova B, Dvorakova L, Hrebicek M, Minks J, Stolnaja L, et al. Unusual presentation of Kelley–Seegmiller syndrome. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008;27:648–55.
- [6] Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992;51:1229–39.
- [7] Musalkova D, Minks J, Storkanova G, Dvorakova L, Hrebicek M. Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells Mol Dis* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2014.10.001> pii: S1079-9796(14)00109-0, [in press].
- [8] Jinnah HA, De Gregorio L, Harris JC, Nyhan WL, O'Neill JP. The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *Mutat Res* 2000;463:309–26.
- [9] De Gregorio L, Nyhan WL, Serafin E, Chamoles NA. An unexpected affected female patient in a classical Lesch–Nyhan family. *Mol Genet Metab* 2000;69:263–8.
- [10] Dawson PA, Gordon RB, Keough DT, Emmerson BT. Normal HPRT coding region in a male with gout due to HPRT deficiency. *Mol Genet Metab* 2005;85:78–80.
- [11] Nguyen KV, Naviaux RK, Paik KK, Nyhan WL. Lesch–Nyhan syndrome: mRNA expression of HPRT in patients with enzyme proven deficiency of HPRT and normal HPRT coding region of the DNA. *Mol Genet Metab* 2012;106:498–501.
- [12] Dehghan A, Köttgen A, Yang Q, Hwang SJ, Kao WL, Rivadeneira F, et al. Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet* 2008;372:1953–61.
- [13] Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Takada Y, et al. Identification of ABCG2 dysfunction as a major factor contributing to gout. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2011;30:1098–104.
- [14] Puig JG, Mateos FA, Torres RJ, Buño AS. Purine metabolism in female heterozygotes for hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Eur J Clin Invest* 1998;28:950–7.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim



Corrigendum

Corrigendum to “Hyperuricemia and gout due to deficiency of hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase in female carriers: New insight to differential diagnosis”
[Clin. Chim. Acta 440 (2015) 214–217]



Eva Kostalova^a, Karel Pavelka^b, Hana Vlaskova^a, Dita Musalkova^a, Blanka Stiburkova^{a,b,*}

^a Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

^b Institute of Rheumatology, Prague, Czech Republic

The authors regret the omission of the co-author Dita Musalkova in the article. Also the Acknowledgements section should read:
This study was supported by the grants from the Ministry of Health of the Czech Republic (RVO VFN64165 and the project for conceptual development of Research organization 023728 Institute of Rheumatology), by the institutional support provided by the program at Charles University in Prague PRVOUK-P24/LF1/3 and partly also by the grant GAUK No. 42314 from the Grant Agency of Charles University in Prague.
The authors apologize for any inconvenience caused.

Original Article

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

(mucopolysaccharidosis II / Hunter syndrome / iduronate sulphatase deficiency / X-chromosome inactivation / induced pluripotent stem cells)

M. ŘEBOUN¹, J. RYBOVÁ¹, R. DOBROVOLNÝ¹, J. VČELÁK², T. VESELKOVÁ¹, G. ŠTORKÁNOVÁ¹, D. MUŠÁLKOVÁ¹, M. HŘEBÍČEK¹, J. LEDVINOVÁ¹, M. MAGNER³, J. ZEMAN², K. PEŠKOVÁ¹, L. DVOŘÁKOVÁ¹

¹Institute of Inherited Metabolic Disorders, ²Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

³Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Abstract. Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is an X-linked lysosomal storage disorder resulting from deficiency of iduronate-2-sulphatase activity. The disease manifests almost exclusively in males; only 16 symptomatic heterozygote girls have been reported so far. We describe the results of X-chromosome inactivation analysis in a 5-year-old girl with clinically severe disease and heterozygous mutation p.Arg468Gln in the *IDS* gene. X inactivation analysed at three X-chromosome loci showed extreme skewing (96/4 to 99/1) in two patient's cell types. This finding correlated with exclusive expression of the mutated allele. Induced pluripotent stem cells (iPSC) generated from the patient's peripheral blood demonstrated characteristic pluripotency markers, defi-

ciency of enzyme activity, and mutation in the *IDS* gene. These cells were capable of differentiation into other cell types (cardiomyocytes, neurons). In MPS II iPSC clones, the X inactivation ratio remained highly skewed in culture conditions that led to partial X inactivation reset in Fabry disease iPSC clones. Our data, in accordance with the literature, suggest that extremely skewed X inactivation favouring the mutated allele is a crucial condition for manifestation of MPS II in females. This suggests that the X inactivation status and enzyme activity have a prognostic value and should be used to evaluate MPS II in females. For the first time, we show generation of iPSC from a symptomatic MPS II female patient that can serve as a cellular model for further research of the pathogenesis and treatment of this disease.

Received December 22, 2015. Accepted February 16, 2016.

This study was supported by the Ministry of Health, Czech Republic (IGA MZ CR NT14015-3/2013, MZ CR – RVO VFN 64165, MZ CR – RVO EÚ, 00023761) and by project reg. No. CZ.2.16/3.1.00/24012 from OP Prague Competitiveness.

Corresponding author: Lenka Dvořáková, Institute of Inherited Metabolic Disorders, Laboratory of DNA Diagnostics, bldg E1A, Ke Karlovu 455/2, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Phone: (+420) 224 967 701; Fax: (+420) 224 967 168; e-mail: lenka.dvorakova@lf1.cuni.cz

Abbreviations: DMB – dimethylmethylene blue, DMSO – dimethyl sulphoxide, ERT – enzyme replacement therapy, FBS – foetal bovine serum, IDS – iduronate-2-sulphatase, iPSC – induced pluripotent stem cells, LIF – leukaemia inhibitory factor, MPS II – mucopolysaccharidosis type II, PBMC – peripheral blood mononuclear cells, SNP – single-nucleotide polymorphism, XCI – X-chromosome inactivation.

Introduction

Mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome, MPS II, OMIM 309900) is an X-linked lysosomal storage disorder caused by deficiency of iduronate-2-sulphatase activity (IDS, EC 3.1.6.13). Iduronate-2-sulphatase encoded by the *IDS* gene (Xq27-q28) catalyses the first step in the sequential degradation of heparan sulphate and dermatan sulphate, and its deficiency leads to the lysosomal accumulation of these glycosaminoglycans (Neufeld and Muenzer, 2001).

Children with MPS II have a normal appearance at birth and the disease manifests usually in late infancy or toddler age. The signs and symptoms include coarse facial features, short stature with joint stiffness, dysostosis multiplex, hepatosplenomegaly, and cognitive decline. The prognosis depends on the severity of the disease,

and is poor especially in children with severe form associated with death in the second decade of life (Neufeld and Muenzer, 2001)

Enzyme replacement therapy improves the visceral disease; however, it has no effect on the CNS. The first study on intrathecal idursulfase-IT in children has been published recently (Muenzer et al., 2016) and lentiviral isogenic haematopoietic stem cell gene therapy was described as a promising approach for correction of neuronal manifestation in MPS II mice by ameliorating lysosomal storage and autophagic dysfunction in the brain (Wakabayashi et al., 2015).

Recently, the possibility of using autologous induced pluripotent stem cells (iPSC) instead of haematopoietic stem cells for cell-based therapy received a great deal of attention. In female heterozygotes with X-linked diseases, individual cells are either functionally normal or deficient based on the origin of inactivated X chromosome (mutant or normal), and the X-chromosome inactivation (XCI) remains conserved in daughter cells. Selected iPSC clones or differentiated cells with favourable XCI skewing could possibly serve as suitable material for cell therapy without the need for gene manipulations (Bhatnagar et al., 2014).

The prevalence of MPS II is estimated to be 0.43–1.09 per 100,000 live births in five different countries (Poupetova et al., 2010). The vast majority of MPS II patients are males, while only 16 symptomatic MPS II female patients have been reported in the literature so far.

Three of these affected females had structural abnormality of the X chromosome impairing *IDS* expression of the wild-type allele, while two others had both *IDS* alleles defective. In the remaining 11 patients, the cause of MPS II manifestation was the presence of one mutated *IDS* allele in combination with highly skewed XCI leaving only the mutated allele active (Jurecka et al., 2012; Pina-Aguilar et al., 2013; Lonardo et al., 2014); other cases are reviewed in Tuschl et al. (2005) and Scarpa et al. (2011).

Here, we describe the first MPS II female patient in the Czech Republic. We show extremely skewed XCI favouring the mutated allele as the apparent epigenetic cause of the clinical manifestation. For the first time we

demonstrate iPSC generated from the MPS II patient cells. This cellular model will serve for future research into the pathogenesis and treatment of MPS II.

Material and Methods

Ethics

The study was approved by the ethics committee of the General University Hospital in Prague (The Ethics Committee Approval number 41/12) and was conducted in agreement with institutional guidelines. Written informed consent was obtained from both adult study participants. On behalf of the patient, written informed consent was obtained from her parents.

Molecular analyses

Genomic DNA was extracted from whole blood and from the urinary sediment using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). DNA from buccal swabs and total RNA were isolated using a QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) and a BiOstic Blood Total RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA), respectively. Reverse transcription of RNA to cDNA was performed using a High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

PCR and reverse transcription PCR (RT-PCR) products of the *IDS* (GenBank NC_000023.11, NM_000202.6) and *LAMP2* (NM_002294.2) genes were generated according to standard PCR protocols using primers shown in Table 1. The genotypes were analysed by Sanger sequencing using a Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and a 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

For amplicon-based deep sequencing, singleplex PCR and RT-PCR products were pooled and prepared under standard protocols using the NexteraXT kit and the MiSeq reagent kit (2×250), respectively. Paired-end sequence reads were generated using the MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA). Sequencing data were demultiplexed and trimmed for low quality and duplicates using MiSeq reporter v.2.4. Secondary analysis of the cDNA data was performed using TopHat v2.0.13 (Kim

Table 1. Primer sequences used for PCR amplification

Gene		Fragment/ Exon	Sequence
<i>IDS</i>	cDNA	Fr. 4 U	TAATACGACTCACTATAG GGACCTTGTTGGAAGTTGTGT
		Fr. 4 L	TGAAACAGCTATGACCATG AAACGACCAGCTCTAACTCC
	gDNA	ex. 9a U	TAATACGACTCACTATAGTCTGCTATTGATTGGATG
		ex. 9a L	TGAAACAGCTATGACCATGGTCTATGGTGCATGGAAT
		ex. 9b U	TAATACGACTCACTATAG CGATCCGTGACTTGGA
ex. 9b L	TGAAACAGCTATGACCATG ATGGGTAATCACAAAACGAC		
<i>LAMP2</i>	cDNA	Fr.1 U	GGTCGGTGGTTCATCAGTGCT
		Fr.1 L	ATTCTGATGGCCAAAAGTTCAT
	gDNA	ex.2 U	TAATACGACTCACTATAG TTAGAGCTGGTTGAACTTC
		ex.2 L	TGAAACAGCTATGACCATG TCAAAGGATAAAGTCAATAAA

Upper (U) and lower (L) primers (excepting *LAMP2* cDNA) contain a T7 and an RP sequence, respectively, at the 5' end.

et al., 2013). The human hg19 genome sequence was used as a reference.

X-chromosome inactivation analysis

Two independent methods were used to determine the XCI pattern: a DNA-methylation based assay and a transcript expression analysis. The methylation status of polymorphic repeat regions was examined at two loci, *AR* and *CNKSR2*, using digestion with methylation-sensitive enzyme *HpaII*, as described elsewhere (Racchi et al., 1998; Musalkova et al., 2015). The DNA of the patient's father was used as a male control.

The transcriptional assay was performed similarly as described previously (Mossner et al., 2013). The RT-PCR product containing the single-nucleotide polymorphism (SNP) was used for quantification of SNP allele frequencies, which reflected the XCI ratios. The *LAMP2* gene polymorphism c.156A>T (rs12097) was selected for the assay as *LAMP2* is subject to XCI (Cotton et al., 2013), and the patient is heterozygous for this polymorphism. Instead of pyrosequencing (Mossner et al., 2013), amplicon sequencing using the Illumina platform was applied. The same procedure was used for quantification of the wt/mutated allele in the *IDS* gene transcript.

Generation of iPSC lines

The iPSC lines were generated from mononuclear cells isolated with Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to manufacturer's instructions from peripheral blood of the presented MPS II female patient. Isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were frozen in 10% dimethyl sulphoxide (DMSO) in inactivated foetal bovine serum (FBS, BenchMark™ Fetal Bovine Serum, Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) and kept in liquid nitrogen until further use. Thawed PBMCs were cultured in complete LGM medium (Lonza, Walkersville, MD) containing 0.4 µg/ml of purified no azide/low endotoxin NA/LE Mouse Anti-Human CD3 (BD Biosciences, San Jose, CA), 0.4 µg/ml of Mouse Anti-Human CD28 (BD Biosciences), and 50 ng/ml of interleukin 2 (IL2; Abbtotec, San Diego, CA) and were plated onto CD3-coated 6-well plates for five days. Reprogramming of the cells into iPSCs was performed using the CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to manufacturer's instructions. In brief, the cells were transduced at an appropriate multiplicity of infection (MOI) with each of the three reprogramming vectors (KOS MOI = 5, hc-Myc MOI = 5, hKlf4 MOI = 3) in the complete LGM medium. The free virus was removed by replacing the medium on the second day. The cells were transferred onto the layer of feeder cells (irradiated mouse embryonic fibroblasts) in the presence of HES medium (KnockOut™ESC/iPSC Medium Kit) with 8 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; Life Technologies, New York, NY) on the 4th day after the transduction. The selected colonies were picked and placed in 12-well plates containing feeder cells and then passaged with Accutase (STEMCELL Technologies Inc.,

Vancouver, BC, Canada) and the StemPro EZPassage tool (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) until the creation of stable iPSC lines.

Expression of pluripotency markers in generated iPSC was confirmed by immunostaining as previously described (Lian et al., 2013). Primary antibodies used in this study were directed to Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, cat# sc-5279), SSEA4 (Invitrogen, cat# 41-4000), anti-TRA-1-81 (Invitrogen, cat# 41-1100), Sox2 (Santa Cruz Biotechnology, cat# sc-365823), CD63 (Abcam, Cambridge, UK, cat# ab1318), heparan sulphate (Amsbio, Abingdon, UK, Cat# 370255-1) and Lin-28 (Proteintech Group, Chicago, IL, cat# 11724-1-AP). The cells were incubated with Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Invitrogen) and the nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen).

Naïve iPSC lines were established by cultivation of generated iPSC in NHSM medium containing leukaemia inhibitory factor (LIF) and small molecule inhibition of ERK1/ERK2 and GSK3β signalling, which induce conversion of primed iPSC toward naïve pluripotency, as described previously (Gafni et al., 2013).

Determination of enzyme activities

Total leukocytes were isolated from the blood anticoagulated with EDTA within 24 h of drawing using the method described by Skoog and Beck (1956). The iPSC were re-plated onto Geltrex® (Life Technologies, Grand Island, NY)-coated 6-well plates and cultivated in mTeSR™1 medium (STEMCELL Technologies Inc.) for two passages for the removal of the feeder cells. The homogenates were prepared by sonication in water. The protein concentration was determined using the method described by Hartree (1972). Iduronate-2-sulphate sulphatase activity was assayed using fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-α-L-iduronate-2-sulphate according to the method described by Voznyi et al. (2001).

Results

Clinical description

A 5-year-old girl was born in term as a first child of healthy, non-consanguineous Ukrainian parents. Post-natal adaptation and early development were uneventful. She used five words and started to walk at the age of 13 months. Snoring, hearing impairment and delayed speech were recognized at the age of two years. A mild improvement in hearing was observed with a hearing device; however, the speech problems persisted. Coarse facial features, gingival hyperplasia, mild hepatosplenomegaly, sternal protrusion, claw hands, lumbal hyperlordosis, large joint contractures and mild mental retardation were noted during the third year of life. At the age of 3.5 years, clinical and laboratory analyses revealed mild paleocerebellar symptoms, mild mitral regurgitation, and "dysostosis multiplex" on the X-ray survey.

Table 2. X chromosome inactivation at three X chromosome loci compared with a mutant allele in the *IDS* gene

Sample	Locus			
	Methyl sensitive		Transcript analysis	
	<i>AR</i> (Xq12) %	<i>CNSKR2</i> (Xp22.12) %	<i>LAMP2</i> (Xq24) A:T %	<i>IDS</i> (Xq28) G:A %
Proband (leukocytes)	98:2 ^a	99:1 ^a	100:0 ^b	0,5:99,5 ^b
Proband (buccal swabs)	96:4	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c
Mother (leukocytes)	n.i. ^d	70:30	n.d. ^c	n.d. ^c

^aMaternal chromosome is preferentially inactivated. ^btranscript analysis using the amplicon-based deep sequencing: number of reads Q>30 *LAMP2* (c.156A>T, rs12097) A: 3910, T: 2. The A allele was inherited from the patient's father. *IDS* (c.1403G>A) G: 18, A: 3668. Only the mutated allele is expressed. ^c not determined, ^d non-informative marker

No corneal clouding was present. Urinary excretion of heparan and dermatan sulphates were increased (60.5–65.7 g/mol creatinine; controls < 15.5). The *IDS* activity was markedly decreased in leukocytes (0.46 nmol/4 h/mg, control range: 28.1–70.4 nmol/4 h/mg) and serum (19 nmol/4 h/ml, control range: 167–475 nmol/4 h/ml). Heterozygous mutation c.1403G>A (p.Arg468Gln) was identified in the *IDS* gene. The girl is treated with enzyme replacement therapy, the glycosaminoglycan excretion decreased (19.5–22.5 g/mol creatinine), but she still has speech problems, delay of fine motor functions and a moderate delay of the gross motor development.

X-chromosome inactivation and mutation analysis in patient's tissues

Examination of the methylation status at the *AR* locus (Xq12) showed extreme skewing in both blood leukocytes and buccal swabs; the maternal allele was almost completely inactivated. Complete inactivation of the maternal allele was also observed in *CNSKR2* and apparent homozygosity for the c.156A allele inherited from the patient's father was detected in the *LAMP2* transcript. Deep sequencing of the *IDS* gene transcript revealed exclusive expression of the mutated allele (Table 2).

As the maternal allele is completely inactivated and only the mutated *IDS* is expressed, it can be deduced that the patient inherited the mutated allele from her father. However, Sanger sequencing did not identify the mutation c.1403G>A in the patient's parents. To detect possible somatic mosaicism in the parental tissues, DNA isolated from three cell types (peripheral leukocytes, urinary sediment cells and buccal swabs) was subjected to amplicon-based deep sequencing. The number of reads corresponding to the mutated allele was below the detection limit (< 0.5%) when the total sequence depth was higher than 1300 in all analysed tissues. Thus, the somatic mosaicism was not demonstrated, while germline mosaicism could not be excluded as meiotic cells from the parents were not available for analysis.

Generation of iPSC lines

Two of the multiple generated patient's iPSC lines have been used for the study. The clones were positive

for the characteristic pluripotency markers Oct3/4, SSEA4, anti-TRA-1-81, Lin28, and Sox2 (Fig. 1). The patient's iPSC lines also expressed slightly higher amounts of heparan sulphate (Fig. 2); however, the quantitative determination of GAGs in the cell lysate using dimethyl methylene blue (DMB) with spectrophotometric detection (Lopez-Marín et al., 2013) did not show significant differences. The *IDS* activities in two

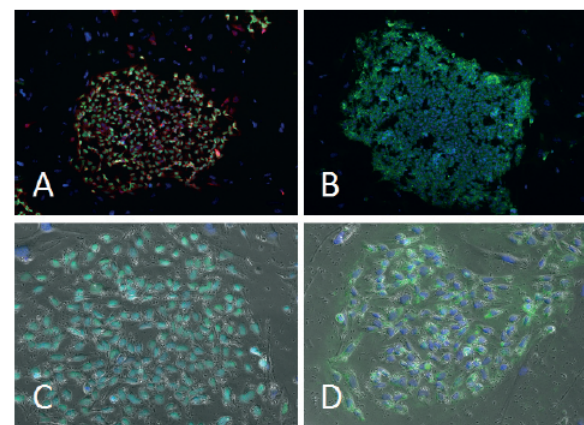


Fig 1. Characterization of iPSC colonies – pluripotency markers. **A:** Lin28 (red), Oct3/4 (green), DAPI (blue); **B:** SSEA4 (green), DAPI (blue); **C:** Sox2 (green), DAPI (blue) and **D:** anti-TRA-1-81 (green), DAPI (blue) in phase contrast image. A, B – 10× objective, C, D – 20× objective.

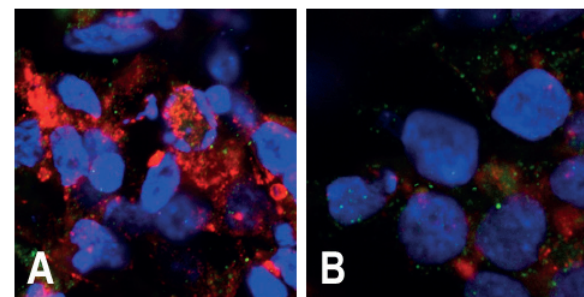


Fig 2. Detection of heparan sulphate in iPSC generated from a MPS II patient. Heparan sulphate (red), CD63 (green), DAPI (blue). **A:** MPS II patient; **B:** control; images were recorded with a laser scanning confocal microscope, 60× objective, NA 1.40

of the patient's iPSC clones were 1.49 and 2.32 nmol per mg of protein per hour, compared to 17.15 and 21.32 nmol/mg/h, respectively, in the controls. The potency to differentiate to cardiomyocytes and neuronal cells has been confirmed using previously published protocols (Stacpoole et al., 2011; Lian et al., 2013).

Analysis in two iPSC clones cultured in usual conditions showed the same XCI pattern with preferential inactivation of the maternal allele (98 : 2). Using cell culture conditions described to lead to the naïve state of iPSC with reset XCI did not result in a changed XCI ratio in the MPS II clones; however, in case of the Fabry disease heterozygote used as a control, the XCI ratio changed from 97 : 3 to 80 : 20 (Fig. 3).

Discussion

In this report we describe a 5-year-old girl with severe deficiency of IDS activity and clinical manifestation of the disease corresponding to the severe form of Hunter syndrome in boys. The disease in our patient is caused by the heterozygosity for the recurrent mutation p. Arg468Gln (Brusius-Facchin et al., 2014) in combination with highly skewed XCI resulting in exclusive expression of the mutated allele.

To reduce the risk of incorrect interpretation of the results due to chromosomal crossover or due to failure of the individual loci to correlate with XCI we performed XCI analysis using two independent methods at three X-chromosome loci. The results of methyl-sensitive methods (*AR*, *CNKSR2*) agreed well with the results of the transcription-based assay using the *LAMP2* gene polymorphism. Thus, unlike Swierczek et al. (2012), we did not observe any discrepancy among the used methods.

To date, two states of iPSC are known, referred to as primed and naïve, which differ mainly in XCI. Several attempts have been undertaken to generate a more naïve state (with two active X chromosomes in female cells) in established primed iPSC (with one inactive X chromosome) by different media formulation. In our study the XCI was analysed using the methyl-sensitive method (AR) in iPSC cultured in standard media and in naïve state-inducing media (Gafni et al., 2013). Cells derived from the MPS II patient did not show any change in the skewed XCI ratio in any culture conditions. There are three explanations for this finding: 1) the X chromosome remains inactive in the iPSC without going through the "reset" state when both X chromosomes in female cells are active, 2) the X chromosome is non-randomly inactivated after resetting XCI during iPSC reprogramming, or 3) a fraction of cells reached the stage of reprogramming in which both X chromosomes are active, but the used methyl-sensitive method is not able to detect these cells (Briggs and Reijo Pera, 2014). In any case, the iPSC derived from the MPS II patient differ from those derived from the Fabry disease heterozygote used as a control line, which responded to media change by partial change of the XCI ratio from 97 : 3 to 20 : 80.

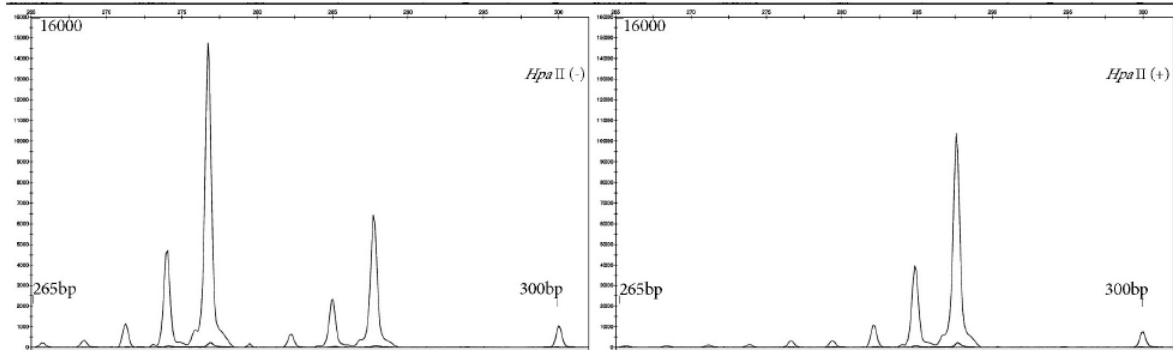
Extreme skewing of XCI in favour of the mutated allele (> 95/5) is a common feature shared by symptomatic MPS II female patients (Scarpa et al., 2011). In accordance with this XCI status, symptomatic MPS II in females is associated with profound IDS deficiency comparable to affected hemizygous males, confirming the recessive nature of the disease. A similar strict correlation is not found in Fabry disease, another X-linked lysosomal storage disorder, where the overwhelming majority of heterozygotes have intermediate levels of the deficient enzyme and develop some symptoms of the disease, although later in life than the hemizygous males (Echevarria et al., 2016). According to the threshold model of Conzelmann and Sandhoff, low levels of enzyme activity are compatible with normal levels of substrate degradation unless they cross a threshold, which, in lysosomal diseases, is usually lower than 10 % of the normal activity (Conzelmann and Sandhoff, 1983). It is important to note that in the tissues of heterozygotes of X-linked disorders, there are patches of deficient cells following the pattern of inactivation of the non-mutated chromosome. This illuminates the development of tissue pathology in Fabry heterozygotes, while carriers for autosomal recessive lysosomal diseases are free of it. The absence of symptoms in the majority of MPS II heterozygotes may be explained by the low threshold of the enzyme activity compatible with normal degradation of the substrate or by good uptake of the enzyme by the deficient cells from the surrounding cells. Notably, cultured fibroblasts from MPS II patients are able to cross-correct the IDS deficiency, unlike cultured skin fibroblasts from the Fabry patients (Fuller et al., 2015).

Our results and the review of the literature show that the clinical manifestation of MPS II in heterozygous females is associated with conditions leading to near monoallelic expression of the mutant allele and severe IDS deficiency, most often due to extremely skewed XCI. This suggests that girls with skewed XCI diagnosed postnatally might benefit from enzyme replacement therapy (ERT), which, if introduced early, may significantly improve further clinical course of the disease (Tylki-Szymanska et al., 2012; Tajima et al., 2013).

To our knowledge, we generated the first iPSC model from a symptomatic MPS II heterozygote and generally from any MPS II patient. These models are valuable for further research of MPS II pathogenesis and testing of therapeutic approaches in various cell types differentiated from iPSC clones and relevant to the disease. The iPSC lines from the presented case can also be used for general research of the mechanisms leading to extremely skewed XCI ratios, as the MPS II clones we have studied retained their XCI skewing under naïve state culture condition in contrast with control clones. Hypothetically, the iPSC clones from heterozygotes of X-linked disorders with favourable XCI and thus functionally normal can serve as a source of autologous material (haematopoietic progenitors, neurons, cardiomyocytes, etc.) for cell-based therapy (Bhatnagar et al.,

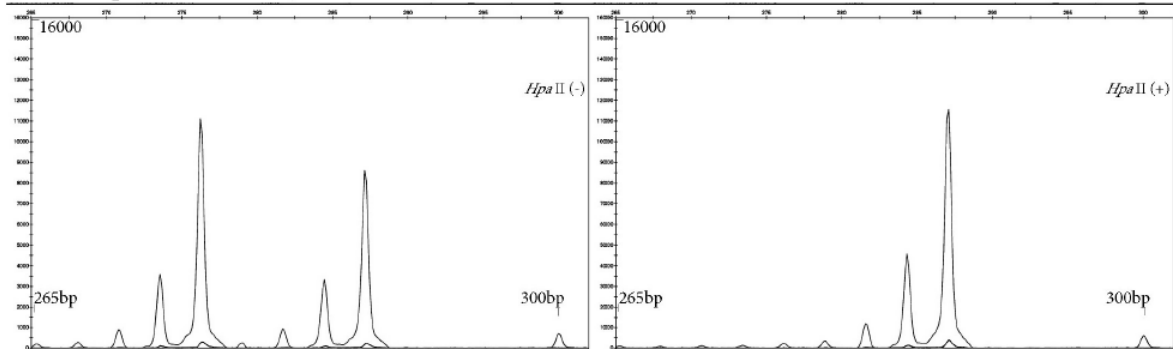
I. MPSII patient iPS cells (standard culture)

XCI value 98:2



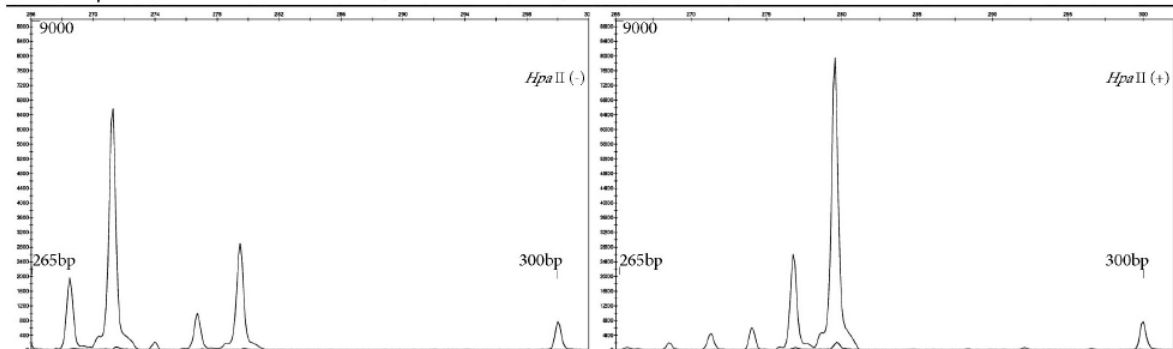
II. MPSII patient iPS cells (naïve culture)

XCI value 98:2



III. Fabry disease control iPS cells (standard culture)

XCI value 3:97



IV. Fabry disease control iPS cells (naïve culture)

XCI value 20:80

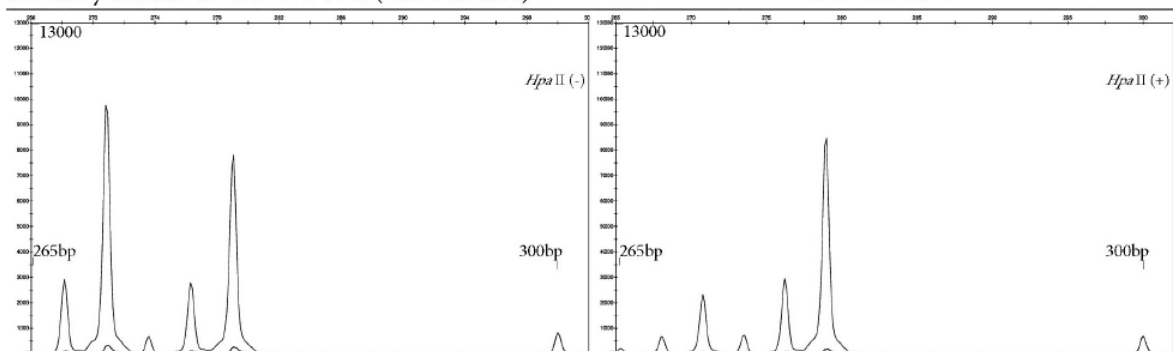


Fig 3. X chromosome inactivation analysis in the patient's iPSC generated from the MPS II patient and a Fabry disease heterozygote serving as control. Standard culture and naïve culture cells are compared. Methylation status analysis of the *AR* alleles before (*HpaII*-) and after (*HpaII*+) digestion is shown. The 300-bp peak belongs to the GeneScan 500 ROX size standard. The analysis was conducted using GeneMapper software (Applied Biosystems).

2014). These types of therapies, however, will need to await development of safe therapeutic protocols.

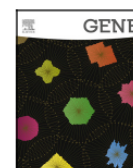
Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Helena Pouřetová for enzyme analysis, Hana Vlášková for constructive discussion, and Michaela Hnízdová Boučková and Larisa Stolnaja for excellent laboratory work. The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

- Bhatnagar, S., Zhu, X., Ou, J., Lin, L., Chamberlain, L., Zhu, L. J., Wajapeyee, N., Green, M. R. (2014) Genetic and pharmacological reactivation of the mammalian inactive X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 12591-12598.
- Briggs, S. F., Reijo Pera, R. A. (2014) X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **28**, 78-82.
- Brusius-Facchin, A. C., Schwartz, I. V., Zimmer, C., Ribeiro, M. G., Acosta, A. X., Horovitz, D., Monlleo, I. L., Fontes, M. I., Fett-Conte, A., Sobrinho, R. P., Duarte, A. R., Boy, R., Mabe, P., Ascurra, M., de Michelena, M., Tylee, K. L., Besley, G. T., Garretton, M. C., Giugliani, R., Leistner-Segal, S. (2014) Mucopolysaccharidosis type II: identification of 30 novel mutations among Latin American patients. *Mol. Genet. Metab.* **111**, 133-138.
- Conzelmann, E., Sandhoff, K. (1983) Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev. Neurosci.* **6**, 58-71.
- Cotton, A. M., Ge, B., Light, N., Adoue, V., Pastinen, T., Brown, C. J. (2013) Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. *Genome Biol.* **14**, R122.
- Echevarria, L., Benistan, K., Toussaint, A., Dubourg, O., Hagege, A. A., Eladari, D., Jabbour, F., Beldjord, C., De Mazancourt, P., Germain, D. P. (2016) X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin. Genet.* **89**, 44-54.
- Fuller, M., Mellett, N., Hein, L. K., Brooks, D. A., Meikle, P. J. (2015) Absence of α -galactosidase cross-correction in Fabry heterozygote cultured skin fibroblasts. *Mol. Genet. Metab.* **114**, 268-273.
- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A. A., Manor, Y. S., 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, J. H. (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* **504**, 282-286.
- Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.
- Jurecka, A., Krumina, Z., Zuber, Z., Rozdzyńska-Swiatkowska, A., Kloska, A., Czartoryska, B., Tylki-Szymanska, A. (2012) Mucopolysaccharidosis type II in females and response to enzyme replacement therapy. *Am. J. Med. Genet. A.* **158A**, 450-454.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S. L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36.
- Lian, X., Zhang, J., Azarin, S. M., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T. J., Palecek, S. P. (2013) Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* **8**, 162-175.
- Lonardo, F., Di Natale, P., Lualdi, S., Acquaviva, F., Cuoco, C., Scarano, F., Maioli, M., Pavone, L. M., Di Gregorio, G., Filocamo, M., Scarano, G. (2014) Mucopolysaccharidosis type II in a female patient with a reciprocal X;9 translocation and skewed X chromosome inactivation. *Am. J. Med. Genet. A.* **164A**, 2627-2632.
- Lopez-Marin, L., Gutierrez-Solana, L. G., Azuara, L. A., de Las Heras, R. S., Rodriguez, A. D., Extremera, V. C. (2013) Detection by urinary GAG testing of mucopolysaccharidosis type II in an at-risk Spanish population. *JIMD Rep.* **10**, 61-68.
- Mossner, M., Nolte, F., Hutter, G., Reins, J., Klaumunzer, M., Nowak, V., Oblander, J., Ackermann, K., Will, S., Rohl, H., Neumann, U., Neumann, M., Hopfer, O., Baldus, C. D., Hofmann, W. K., 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.
- Muenzer, J., Hendriks, C. J., Fan, Z., Vijayaraghavan, S., Perry, V., Santra, S., Solanki, G. A., Mascelli, M. A., Pan, L., Wang, N., Sciarappa, K., Barbier, A. J. (2016) A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. *Genet. Med.* **18**, 73-81.
- Musalkova, D., Minks, J., Storkanova, G., Dvorakova, L., Hrebicek, M. (2015) Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells Mol. Dis.* **54**, 210-216.
- Neufeld, E. F., Muenzer, J. (2001) The mucopolysaccharidoses. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., pp. 3421-3452, McGraw-Hill Co., New York
- Pina-Aguilar, R. E., Zaragoza-Arevalo, G. R., Rau, I., Gal, A., Alcantara-Ortigoza, M. A., Lopez-Martinez, M. S., Santillan-Hernandez, Y. (2013) Mucopolysaccharidosis type II in a female carrying a heterozygous stop mutation of the iduronate-2-sulfatase gene and showing a skewed X chromosome inactivation. *Eur. J. Med. Genet.* **56**, 159-162.
- Poupetova, H., Ledvinova, J., Berna, L., Dvorakova, L., Kozich, V., Elleder, M. (2010) The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J. Inher. Metab. Dis.* **33**, 387-396.
- Racchi, O., Mangerini, R., Rapezzi, D., Rolfo, M., Gaetani, G. F., Ferraris, A. M. (1998) X chromosome inactivation patterns in normal females. *Blood Cells Mol. Dis.* **24**, 439-447.
- Scarpa, M., Almasy, Z., Beck, M., Bodamer, O., Bruce, I. A., De Meirleir, L., Guffon, N., Guillen-Navarro, E., Hensman, P., Jones, S., Kamin, W., Kampmann, C., Lampe, C., Lavery, C. A., Teles, E. L., Link, B., Lund, A. M., Malm, G., Pitz, S., Rothera, M., Stewart, C., Tylki-Szymanska, A., van der Ploeg, A., Walker, R., Zeman, J., Wraith, J. E.,

- Hunter Syndrome European Expert Council (2011) Mucopolysaccharidosis type II: European recommendations for the diagnosis and multidisciplinary management of a rare disease. *Orphanet J. Rare Dis.* **6**, 72.
- Skoog, W. A., Beck, W. S. (1956) Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes. *Blood* **11**, 436-454.
- Stacpoole, S. R., Bilican, B., Webber, D. J., Luzhynskaya, A., He, X. L., Compston, A., Karadottir, R., Franklin, R. J., Chandran, S. (2011) Efficient derivation of NPCs, spinal motor neurons and midbrain dopaminergic neurons from hESCs at 3% oxygen. *Nat. Protoc.* **6**, 1229-1240.
- Swierczek, S. I., Piterkova, L., Jelinek, J., Agarwal, N., Hammoud, S., Wilson, A., Hickman, K., Parker, C. J., Cairns, B. R., Prchal, J. T. (2012) Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. *Blood* **119**, e100-109.
- Tajima, G., Sakura, N., Kosuga, M., Okuyama, T., Kobayashi, M. (2013) Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. *Mol. Genet. Metab.* **108**, 172-177.
- Tuschl, K., Gal, A., Paschke, E., Kircher, S., Bodamer, O. A. (2005) Mucopolysaccharidosis type II in females: case report and review of literature. *Pediatr. Neurol.* **32**, 270-272.
- Tylki-Szymanska, A., Jurecka, A., Zuber, Z., Rozdzynska, A., Marucha, J., Czartoryska, B. (2012) Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis II from 3 months of age: a 3-year follow-up. *Acta Paediatr.* **101**, e42-47.
- Voznyi, Y. V., Keulemans, J. L., van Diggelen, O. P. (2001) A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease). *J. Inherit. Metab. Dis.* **24**, 675-680.
- Wakabayashi, T., Shimada, Y., Akiyama, K., Higuchi, T., Fukuda, T., Kobayashi, H., Eto, Y., Ida, H., Ohashi, T. (2015) Hematopoietic stem cell gene therapy corrects neuropathic phenotype in murine model of mucopolysaccharidosis type II. *Hum. Gene Ther.* **26**, 357-366.



Research paper

HGSNAT has a TATA-less promoter with multiple starts of transcription

Eva Richtrova^{a,1}, Lenka S. Mrazova^{a,1}, Dita Musalkova^a, Ondrej Luksan^b, Larisa Stolnaya^a, Jakub Minks^a, Jan Lukas^a, Lenka Dvorakova^a, Milan Jirsa^b, Martin Hrebicek^{a,*}

^a Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, Prague 120 08, Czech Republic

^b Laboratory of Experimental Hepatology, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/9, Prague 140 21, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 May 2016

Received in revised form 8 July 2016

Accepted 21 July 2016

Available online 22 July 2016

Keywords:

MPS IIIC

HGSNAT

N-acetyltransferase

Promoter

Sp1

Housekeeping gene

ABSTRACT

Acetyl-CoA:α-glucosaminide *N*-acetyltransferase (*N*-acetyltransferase) is a lysosomal membrane enzyme that catalyzes a key step in the lysosomal degradation of heparan sulfate. Its deficiency causes Sanfilippo syndrome type IIIC (Mucopolysaccharidosis type IIIC, MPS IIIC). Here we characterize the promoter region of *HGSNAT*, the gene encoding *N*-acetyltransferase, which is located in the pericentromeric region of chromosome 8.

We show that *HGSNAT* transcription is driven by a TATA-less promoter whose key elements are contained within the 1054 bp region upstream of exon 1. About 400 bases of the region's 3'-prime end overlap with an unmethylated CpG island. Reduced reporter activities from promoter serial deletion constructs suggested strong regulatory elements at positions −101 to −20 bp and −1073 to −716 bp of the downstream initiation codon (DS-ATG). Targeted mutagenesis of the first Specificity protein 1-A (Sp1-A) of the six in silico-predicted Sp1 sites in the region flanking the major transcription start sites (TSSs, +50/−101) led to a 55% decrease of reporter activity, while inactivation of each of Sp1-B and Sp1-C resulted in its almost two-fold increase. The binding of Sp1 to the region was confirmed by chromatin immunoprecipitation (ChIP). Overall, this confirms that Sp1 is important for regulation of the *HGSNAT* promoter.

Promoter fragments in antisense orientation (constructs pGL4 −20/−1305 and pGL4 +50/−1305) led to reporter activities of about 50% of the pGL4 −1305/−20 activity, implying divergent initiation of transcription at the promoter. We identified two main TSSs at positions +1 and −15 from DS-ATG using Rapid amplification of cDNA ends (5'RACE). Transcripts initiating at the TSSs thus contain only DS-ATG. Five patients from our MPS IIIC cohort ($n = 23$) carried the rs4523300 promoter variant and one the rs149596192 promoter variant. Both variants lowered the expression of the reporter down to 68% and 59%, respectively. However, white blood cell (WBC) *N*-acetyltransferase activities in individuals carrying the variants did not significantly differ from homozygotes for the wild-type alleles, suggesting only a partial impact of transcriptional regulation on *N*-acetyltransferase activities in vivo.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The *HGSNAT* gene (OMIM: *610453) encodes acetyl-CoA:α-glucosaminide *N*-acetyltransferase (*N*-acetyltransferase, HGSNAT, EC 2.3.1.78), which is a lysosomal membrane enzyme that catalyzes trans-membrane acetylation of glucosaminide moieties of heparan sulfate (Bame and Rome, 1986a; Bame and Rome, 1986b). A deficiency of *N*-acetyltransferase leads to Mucopolysaccharidosis type IIIC (MPS IIIC, Sanfilippo syndrome IIIC, OMIM: #252930), one of the four autosomal recessive enzyme defects of lysosomal heparan sulfate catabolism that present clinically as Sanfilippo syndrome (Klein et al., 1981).

HGSNAT is located in the pericentromeric region of chromosome 8 and has 18 exons. It encodes a polypeptide with 11 predicted trans-membrane domains that has multiple vertebrate orthologs and shares similarity with an uncharacterized conserved family of bacterial proteins COG4299 (Entrez Gene GeneID 138050) (Fan et al., 2006;

Hrebicek et al., 2006). Transcripts from two possible in-frame initiation codons that contained two polyadenylation signals as well as two minor shorter transcripts were amplified by RT-PCR. The 5' untranslated region was GC-rich (85%) and contained a CpG island (Hrebicek et al., 2006).

Genes encoding lysosomal proteins frequently have TATA-less promoters with unmethylated CpG islands; for instance, 82 of 97 human promoters of known lysosomal genes (Lubke et al., 2009) are listed among TATA-less and CpG-containing promoters by Eukaryotic Promoter Database (<http://epd.vital-it.ch/>), retrieved 14th June 2016, Dreos et al., 2015). Such promoters are usually associated with constitutive rather than regulated gene expression (Zhu et al., 2008).

A key step in initiation of transcription at eukaryotic promoters, the recruitment of RNA polymerase II and a multi-subunit complex of transcription factor IID (TFIID), appears to be facilitated at TATA-less promoters by Specificity protein 1 (Sp1) (Pugh and Tjian, 1991; Gill et al.,

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.051>

0378-1119/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1994; Emami et al., 1998), a member of the ubiquitous family of zinc finger-containing transcription factors Sp (Suske, 1999). Multiple binding sites for transcription factor Sp1 are a common feature of TATA-less promoters, with TSSs often located 40–80 bp downstream of the Sp1-sites (Smale and Kadonaga, 2003). It has been shown recently that transcription of most lysosomal genes is coordinated under the control of transcription factor EB (TFEB), a key regulator of lysosomal biogenesis and autophagy (Sardiello et al., 2009; Settembre et al., 2011).

Under specific conditions (e.g. stress, starvation, lysosomal dysfunction), TFEB translocates from the cytoplasm to the nucleus where it binds to CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) target sites in the promoters of lysosomal genes and upregulates their expression. TFEB translocation is dependent on its phosphorylation status, which is mediated by at least three kinases (reviewed in Settembre et al., 2013).

Variants in disease gene promoters can be pathogenic or can modify the effects of coding region variants (Viart et al., 2012). We have therefore characterized the promoter region of *HGSNAT* gene and evaluated functional impact of promoter variants found in MPS IIIC patients.

2. Materials and methods

2.1. Studied individuals

We analyzed the sequence of the *HGSNAT* promoter and coding regions in 23 MPS IIIC patients from the Czech Republic (n = 5), Belorussia (n = 1), Turkey (n = 4), United Kingdom (n = 2), USA (n = 3), Germany (n = 6), and Greece (n = 2). We received samples for diagnostic purposes and the patients were enrolled in the study on the basis of a written informed consent. We also analyzed the rs4523300 and rs149596192 variants, and *N*-acetyltransferase activity in white blood cells (WBCs) from 100 anonymous control samples. The study was approved by the local ethics committee.

2.2. Generation of reporter gene constructs

We amplified PCR products containing parts of a predicted *HGSNAT* promoter using primers with overhangs carrying *KpnI* and *XhoI* sites (forward and reverse primers, respectively). The amplified regions are depicted in Fig. 1A and B. If not stated otherwise, all promoter sequences are numbered from the downstream initiation codon (DS-ATG). Primer sequences derived from the genomic sequence of chromosome 8 (GenBank accession No. NG_009552.1) and the annealing temperatures are listed in Table 1.

We then gel-purified the amplified promoter fragments using a Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and cloned them directly into a TA cloning vector pCR®4 or pCR®-XL-TOPO® (Life Technologies, Foster City, CA, USA). We released the inserts having the correct sequences by double digestion with *KpnI* and *XhoI* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and subcloned them in both sense and antisense orientations into a pGL4.16 (luc2CP/Hygro) vector (Promega, Madison, WI, USA), at the polylinker site upstream from the firefly luciferase reporter gene, generating the pGL4 – 1305/–20, pGL4 – 1305/–101, pGL4 – 1305/+50 and –2905/–20 constructs, respectively.

We verified sequences of all constructs via dideoxy sequencing using an ABIprism® A3100 automated sequencer (Life Technologies).

2.3. Generation of serial deletions and mutations

We created serial deletions and mutations in the pGL4 – 1305/–20 by site-directed mutagenesis using a QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Deletion construct pGL4 – 1305/–61 is depicted in Fig. 1A and serial mutant constructs with different 5' end deletions (pGL4 – 1073/–20, pGL4 – 716/–20, pGL4 – 347/–20 and pGL4 – 186/–20) are depicted in

Fig. 1C. We also created constructs carrying variants rs4523300, rs149596192, and sequences disrupting Sp1 binding sites (mut Sp1-A to D). The construct pGL4 – 1305/+50 was further modified to alter the initiation ATG codon to CTG by site-directed mutagenesis (mut CTG). Primers used for mutagenesis are listed in Table 2. We confirmed the sequences of all constructs by DNA sequencing.

2.4. Cell culture, transfection and reporter analysis

We grew HepG2 (human hepatoblastoma) cells in Opti-MEM® (Agilent Technologies) medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum in 25 cm² flasks at 37 °C, and 5% CO₂. We seeded a total of 5 × 10⁴ HepG2 cells per well into 24-well culture plates 24 h prior to transfection. We transfected HepG2 cells with 166 ng per well of each construct or the empty pGL4 using the Tfx™-20 and FuGene® HD Transfection Reagent (Promega). As an internal control to normalize transfection efficiency, we co-transfected a pRL-TK vector (Promega) harboring the *Renilla* luciferase gene.

We transfected each construct in triplicate and repeated each transfection experiment independently at least three times. After 48 h, we washed transfected cells with phosphate-buffered saline (PBS) solution and lysed them with 100 µl of Passive lysis buffer (Promega). We assayed luciferase reporter activity using a Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). We measured the intensity of chemiluminescence in the supernatant using a luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

2.5. Methylation of the CpG island

We analyzed the methylation of the CpG island overlapping with the *HGSNAT* promoter (Fig. 2B) via bisulfite sequencing. We modified genomic DNA from three control individuals with bisulfite and used it as a template for amplification. PCR primers designed to anneal to the modified DNA are listed in Table 3. We gel-purified PCR products and sequenced them.

2.6. Identification of the transcription start sites

We detected *HGSNAT* transcripts 5'-ends using Rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) modification that amplifies products specifically from capped mRNAs. For 5'RACE we used a GeneRacer™ Kit and FirstChoice® RLM-RACE Kit (Life Technologies) with FirstChoice® Human Placenta Total RNA (Life Technologies) as the template. We performed the RT-PCR with a 5'RACE universal primer and gene-specific reverse primer (Table 3). We then gel-purified the PCR products using a Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and either directly sequenced them or cloned them into a TA cloning vector pCR®4-TOPO® (Life Technologies) and sequenced individual colonies.

2.7. Chromatin immunoprecipitation assay

We overexpressed Sp1 transcription factor in HEK 293 (human embryonic kidney) cells by transient transfection with pN3-Sp1 (a kind gift from Prof. Guntram Suske, University of Marburg, Germany). We performed a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay using a ChIP Kit (Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, we fixed collected cells in 1% formaldehyde for 10 min at room temperature and washed them with ice-cold PBS. We resuspended the cells in lysis buffer and sonicated them using an E210 Focused-ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA, USA) to shear DNA until the majority of DNA fragments were in the range of 100–500 bp. We incubated the chromatin with anti-Sp1 antibody (Abcam, ab133596 [EPR6661]) overnight at 4 °C along with anti-Histone H3 antibody (positive control), according to the protocol supplied by the manufacturer. We isolated immune complexes using protein A/G agarose beads, washed and eluted. We used DNA purified from the

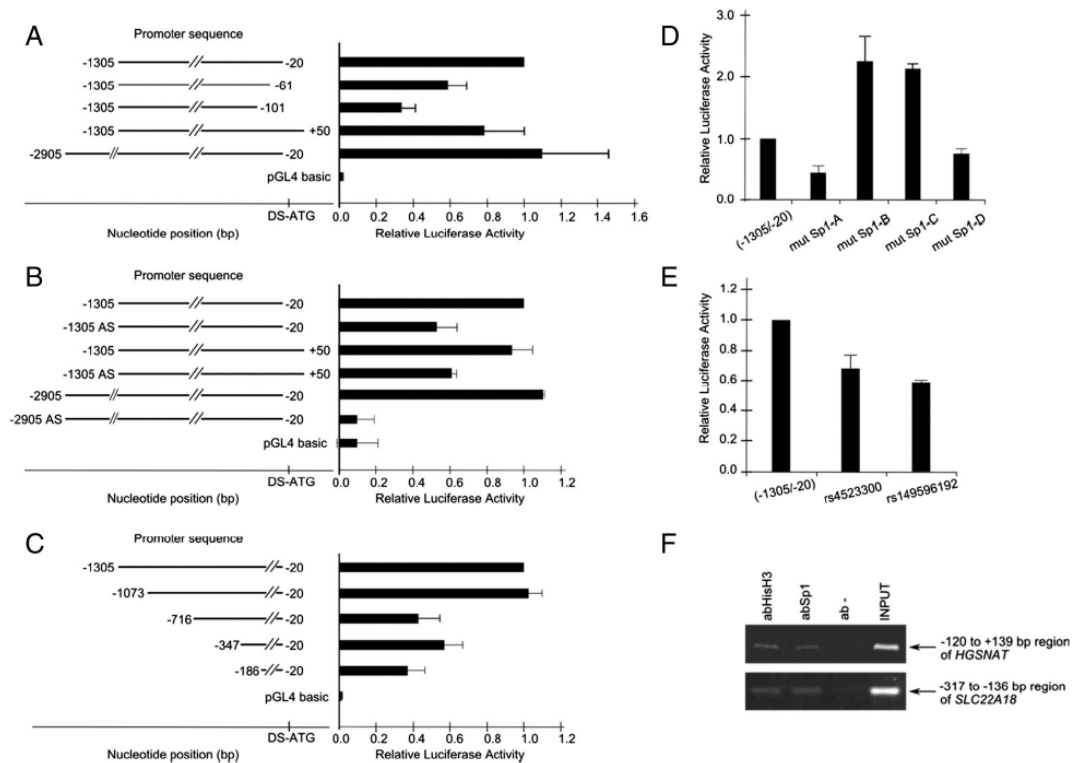


Fig. 1. The $-1073/-20$ promoter region is important for *HGSNAT* promoter activity. Luciferase reporter activities of deletion, mutated and antisense constructs (A–E), were analyzed using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System after transient transfection into HepG2 cells. The values are represented as the means \pm SD of at least two independent experiments, each performed in triplicate. The mean value of luciferase activities obtained with pGL4 ($-1305/-20$) was set at one. An empty pGL4 vector was used as a negative control and exhibited very low luciferase activity. (A) Deletion analysis in proximity of the TSSs. (B) Luciferase activity of sense and antisense (labelled AS) constructs. (C) Deletion analysis of the 5' flanking region. (D) Functional analysis of Sp1 binding sites. Each Sp1 binding site was individually mutated as shown in Fig. 2. (E) Functional analysis of variants found in MPS IIIc patients. (F) ChIP analysis of Sp1 binding in the *HGSNAT* promoter. Sheared chromatin from HepG2 cells transiently transfected with pN3-Sp1 was used for immunoprecipitation with anti-Sp1 antibody (abSp1, 2nd lane), or with the anti-Histone H3 antibody as a positive control (abHisH3, 1st lane), and without added antibody as a negative control (ab–, 3rd lane). The above immunoprecipitates and the total input DNA (INPUT) were used for PCR amplification of parts of the *HGSNAT* and *SLC22A18* promoter regions, respectively. *SLC22A18* amplification served as a Sp1 positive surrogate control. *HGSNAT* and *SLC22A18* regions are numbered from the DS-ATG in sequences NM_152419.2 and NM_002555.5, respectively.

immunoprecipitates as a template for PCR amplification using primers specific for the *HGSNAT* promoter region and containing the putative binding sites for Sp1 (Table 3; Fig. 1F). As a positive ChIP control, we amplified the part of the *SLC22A18* gene (OMIM: *602631) known to contain Sp1 sites (Table 3).

2.8. Bioinformatics - identification of putative transcription factor binding sites

We used TFSEARCH (<http://diyhl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/TFSEARCH.html>), MatInspector (https://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help).

<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#alibaba2>, Grabe, 2002) to identify probable transcription factor (TF) binding sites in the *HGSNAT* promoter. For additional searches we used matrix-scan utility from RSAT-tools suite (<http://rsat.ulb.ac.be>, Turatsinze et al., 2008) and the FIMO tool from the MEME suite (http://meme-suite.org/doc/fimo.html?man_type=web, Bailey et al., 2009), which we also used for determination of p-values.

We searched *HGSNAT* transcripts, Expressed sequence tags (ESTs) and other nucleotide sequences using GeneBank tools (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) and the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

Table 1
Primers for amplification of cloned promoter fragment. Underlined sequences are non-hybridizing overhangs.

Promoter region	Orientation	Forward primer	Reverse primer	Tm (°C)
(–20/–1305)	Sense	5'-GGTACCTTCCCGAAACAGTCCCCCTATC-3'	5'-CTCGAGGCCCTTGCCTGCCCGCTG-3'	67
(–20/–1305)	Antisense	5'-CTCGAGTTCCTCCGAAACAGTCCCCCTATC-3'	5'-GGTACCGCCCTTGCCTGCCCGCTG-3'	67
(–101/–1305)	Sense	5'-GGTACCTTCCCGAAACAGTCCCCCTATC-3'	5'-CTCGAGGTCACCGCCGCTGACTCAC-3'	67
(–101/–1305)	Antisense	5'-CTCGAGTTCCTCCGAAACAGTCCCCCTATC-3'	5'-GGTACCGTACCGCCGCTGACTCAC-3'	67
(+50/–1305)	Sense	5'-GGTACCTTCCCGAAACAGTCCCCCTATC-3'	5'-CTCGAGACGGACCGGCCAGCAGCA-3'	67
(+50/–1305)	Antisense	5'-CTCGAGTTCCTCCGAAACAGTCCCCCTATC-3'	5'-GGTACACGGACCGGCCAGCAGCA-3'	67
(–20/–2905)	Sense	5'-GGTACCTGACCCTGCTGTGAACCAACCA-3'	5'-CTCGAGGCCCTTGCCTGCCCGCTG-3'	68
(–20/–2905)	Antisense	5'-CTCGAGTACCCCTGCTGTGAACCAACCA-3'	5'-GGTACCGCCCTTGCCTGCCCGCTG-3'	68

Table 2
Primers for generation of mutant constructs in pGL4 vector.

Deletions and mutations	Mutagenic primer #1 ^a	Tm (°C)
(–61/–1305)	5'-GCGGGGCTCCGCGCTCGAGGATATCAA-3'	63
mut_ATG>CTG	5'-GCGGGGCGGCTGAGCGGGC-3'	60
(–20/–1073) ^b	5'-GCTAACTGGCCGGTACCTGGATTTAATCTGTG-3'	60
(–20/–716) ^b	5'-GCCTAACTGGCCGGTACATTGAGCTTGTACAA-3'	60
(–20/–347) ^b	5'-CCTAACTGGCCGGTACAGTTGGCAGAAATGCG-3'	60
(–20/–186) ^b	5'-TAACTGGCCGGTACTAGCATGGCCGGC-3'	60
mut_rs4523300	5'-CCAGCCTTGTGTTTGTAGATTTATCC-3'	60
mut_rs149596192	5'-CTAGCATGGCCCGCCAGCC-3'	60
mutSp1-A	5'-GTGAGCGCAGCGGAGAGATCTATGACGGGCGCGCGG-3'	60
mutSp1-B	5'-CCGAGGGGGCGATGACAGTCTCAGCATCTCCGCGGCGGAGCAGCG-3'	60
mutSp1-C	5'-CGCGGGGCGCTCCACATCTGAGCAGCGCAGGG-3'	60
mutSp1-D	5'-CGGAGCAGCGAGATCTGGTCCGAGCGGGCAGG-3'	60

^a Mutagenic primer #2 was reverse complement to mutagenic primer #1.

^b Underlined sequence anneals to pGL4 vector.

2.9. Detection of promoter variants

We amplified PCR products containing the single nucleotide variants rs4523300 and rs149596192, from genomic DNA of 100 control samples. We then digested the products using *OliI* and *MspI* restriction enzymes, respectively (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Oligonucleotide primers and annealing temperatures are listed in Table 3. The forward primer “RFLP rs4523300” was altered at one base compared to the reference sequence to create a restriction site for the *OliI* restriction enzyme (underlined, Table 3).

2.10. N-acetyltransferase activity measurements

We measured N-acetyltransferase activities in WBCs from 68 unaffected individuals (Voznyi et al., 1993). We obtained fluorogenic substrates for N-acetyltransferase (4-methylumbelliferyl-β-D-glucosaminide) and for the control enzyme, N-acetyl-β-D-glucosaminidase (4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide)

from Moscerdam (Oegstgeest, The Netherlands) and Glycosynth (Warrington, UK), respectively (Wenger and Williams, 1991). We measured protein concentration using Hartree's method (Hartree, 1972).

2.11. Statistical analysis

We used SigmaPlot software (Systat Software, San Jose, CA) for statistical evaluations of the results. For each of the five dual luciferase reporter assays was normalized activity of construct pGL4 (–1305/–20) set at one, to correlate the values of independent experiments. Continuous data underwent test for normality. Then we used one-way ANOVA, followed by Bonferroni *t*-test for multiple comparisons versus control group or Student-Neuman-Keuls tests for multiple comparisons. We used unpaired *t*-test for statistical comparisons of different genotype groups with measured N-acetyltransferase activities.

3. Results

3.1. The –1073/–20 promoter region drives transcription of HGSNAT

All constructs carrying upstream initiation codon (US-ATG) or DS-ATG produced significantly higher ($p < 0.05$) levels of reporter activity than the pGL4 empty vector (pGL4 basic) negative control. The pGL4 –1305/–20 exhibited markedly higher luciferase activity ($p < 0.05$) than the 3'-shortened construct, pGL4 –1305/–101. When we included more of both the 5' (pGL4 –2905/–20) and 3' (pGL4 –1305/+50) flanking sequences in the constructs, reporter activities did not significantly change. The pGL4 –1305/+50 and –1305/–61 showed lower luciferase activity than pGL4 –1305/–20 (Fig. 1A). These findings showed that the –1305/–20 region contained regulatory elements sufficient to drive expression of the HGSNAT gene.

The pGL4 –20/–1305 and pGL4 +50/–1305 constructs containing the promoter fragments in the antisense orientation, expressed high average luciferase activities (53% and 65% of the corresponding sense constructs, respectively) that were, unsurprisingly, significantly higher than the negative control ($p < 0.05$). However, the construct pGL4 –20/–2905 containing an extended fragment of the promoter's 5' sequence cloned in the antisense orientation produced luciferase activity comparable to the negative control (Fig. 1B).

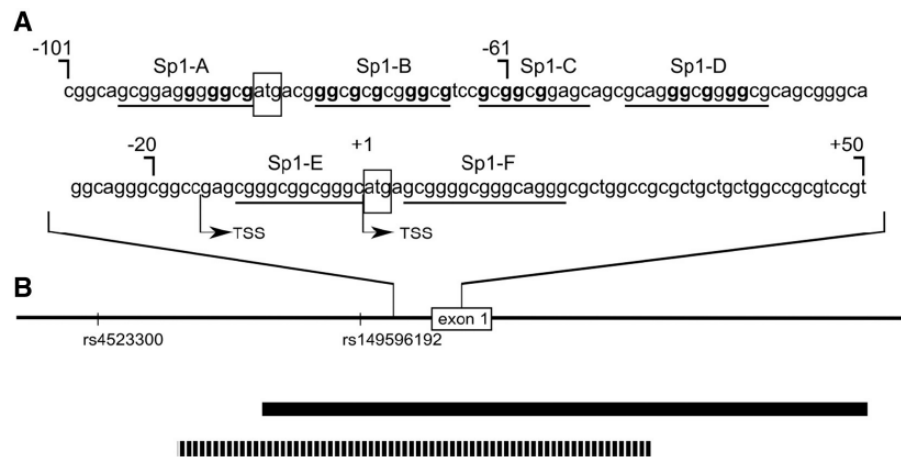


Fig. 2. (A) Region surrounding the TSSs (–101/+50). The consensus sequences for six putative Sp1 transcription factor binding sites are underlined. The mutated sequences are in bold letters. The symbol \lrcorner marks the 3' ends of promoter fragments in constructs depicted in the figure. Two potential initiation codons ATG are boxed; A of the verified start codon is designated as +1. Transcription start sites (TSSs) identified by 5'RACE analyses are represented by upward arrows. (B) Schematic view of the HGSNAT promoter and exon/intron 1 (ch8: 42,994,700–42,996,700; GRCh37/hg19). The positions of two variants, rs4523300 and rs149596192, found in patients are also denoted. The CpG island is shown as a solid bar, the unmethylated sequence verified by bisulfite sequencing is shown as a striped bar.

Table 3

PCR primers for: ¹⁾ RACE analyses; ²⁾ ChIP analyses; ³⁾ PCR-RFLP analyses. Underlined nucleotide was altered to create the restriction site for *OliI* restriction enzyme; ⁴⁾ detection of DNA methylation. Primers were designed to anneal to the modified DNA.

	Forward primer	Reverse primer	Tm (°C)
RACE HGSNAT ¹⁾	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'	5'-CCAGAACCTGAAACAAGCAGTGATAACA-3'	65
ChIP HGSNAT ²⁾	5'-GTGACTCAGGCGCGGTGAC-3'	5'-CGGTAGGAGGTGTCACCTAC-3'	58
ChIP SLC22A18 ²⁾	5'-GCTCCCGGAACCTGCGGATT-3'	5'-CTTTGCAGGGCGGGCTT-3'	60
RFLP rs4523300 ³⁾	5'-CAATTTGCATTTCCACCCTTGT-3'	5'-GTGGAAGGAGCAGGTGAG-3'	63
RFLP rs149596192 ³⁾	5'-TTTGGCAGAATGCGGCTGA-3'	5'-GCGGGGGAACCTAGGGCTT-3'	63
Meth1 HGSNAT ⁴⁾	5'-ATAGTTAAGAATGGGTGTATA-3'	5'-AACCATACTAACCTACCTAA-3'	60
Meth2 HGSNAT ⁴⁾	5'-TAAGGTAGGTTAGTATGTT-3'	5'-ATAAAAAATATACACTACCTC-3'	60
Meth3 HGSNAT ⁴⁾	5'-GAGGTGAGTGTATTTTAT-3'	5'-CCTCCTAACTACCAATTATA-3'	60

In order to identify regions involved in the regulation of *HGSNAT* promoter activity, we generated a series of constructs with serial 5' end deletions of the insert. The deletion construct pGL4 – 1073/–20 expressed luciferase activity comparable to the construct containing the whole predicted *HGSNAT* promoter (pGL4 – 1305/–20). We observed a significant drop in reporter activity ($p < 0.001$) in constructs pGL4 – 716/–20, pGL4 – 347/–20 and pGL4 – 186/–20, which indicated a strong *cis*-active regulatory element within the –1073/–716 region (Fig. 1C).

3.2. Sp1 binds to –101/–20 region in the promoter

We did not find any consensus TATA or CAAT box sequences in the –1305/–20 region by searching for potential TF binding sites. The highest scoring (p -value $< 10^{-6}$) matches included multiple Sp protein family members (SP2, SP3, SP4), REST, MAZ, AP-2, DP1, EGR1, EGR2, EGR3, and EGR4 (Supplementary Table 1). Two potential lower-scoring (p -value $> 10^{-4}$) CLEAR motifs were found –737 to –742 and –867 to –873 bp upstream of the DS-ATG.

The six potential Sp1 binding sites (Fig. 2A) were identified within 150 bp flanking the DS-ATG (–100/+50). We did not further evaluate two downstream sites (Sp1-E and Sp1-F), because the inclusion of the –20/+50 region in the constructs did not lead to significant changes of reporter activity.

We mutated each of the remaining sites (Sp1-A to D) to disrupt Sp1 binding and measured reporter activity of the resulting constructs. Disruption of Sp1-A and Sp1-D sites resulted in significant 55% reduction ($p < 0.05$) and non-significant 23% reduction ($p < 0.1$), respectively, in reporter activity over the wild-type construct pGL4 – 1305/–20 (Fig. 1D). Interestingly, the disruption of both Sp1-B and Sp1-C sites resulted in a statistically significant two-fold increase in reporter activity.

We confirmed that Sp1 binds to the –101/–20 region *in vivo* using chromatin immunoprecipitation with anti-Sp1 antibody (Fig. 1F). We used total input DNA (INPUT) and anti-Histone H3 antibody immunoprecipitates as PCR and immunoprecipitation-positive controls, respectively. We obtained PCR products of *HGSNAT* of expected size 258 bp from the INPUT, ChIP with anti-Sp1 antibody, and ChIP with anti-Histone H3 antibody. There was no detectable product in the negative control, i.e., the ChIP reaction mix without the anti-Sp1 antibody. Amplification of the 180 bp product from the *SLC22A18* promoter region (Ali et al., 2009) served as the positive control for Sp1 immunoprecipitation (Fig. 1F).

3.3. HGSNAT has two main transcription start sites and an unmethylated CpG island

5' RACE identified two alternative transcription start sites (TSSs) at positions +1 and –15 from the DS-ATG (Fig. 2A). Bioinformatic search (<http://genome.ucsc.edu>) revealed a 1343 bp CpG island (position –392 to +952), which encompassed both TSSs (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). The bisulfite sequencing showed that the analyzed 1052 bp fragment of the CpG island (position –581 to +474) was fully unmethylated (Fig. 2B).

3.4. The impact of HGSNAT promoter variants rs4523300 and rs149596192 on reporter and enzyme activity

We sequenced the *HGSNAT* promoter –1305/–20 region in 23 *N*-acetyltransferase deficient patients from different populations. The common variant, rs4523300, was found to be heterozygous in four patients (three of whom were siblings), and homozygous in one patient. Rare heterozygous variant rs149596192 was found in one patient.

We then evaluated the effect of the variant on the promoter activity in constructs derived from the pGL4 – 1305/–20 using the dual reporter luciferase assay. Both variants led to a statistically significant drop of reporter activity by 32% ($p < 0.05$) in case of rs4523300 and 41% ($p = 0.001$) in case of rs149596192 relative to the wild-type promoter construct (Fig. 1E).

Finally, we genotyped the rs4523300 and the rs149596192 in 100 WBCs control samples. We found 14 rs4523300 heterozygotes, 6 rs149596192 heterozygotes, and 1 homozygote for each variant in the cohort. One individual was a double heterozygote for the variant. On the basis of these results, we analyzed *N*-acetyltransferase activity in all 23 individuals carrying one or both minor alleles and 45 wild type homozygotes.

We did not find significant differences between the heterozygotes for each of the variants and the wild type homozygotes. The activities in individuals apparently carrying the variants on both alleles are within the $1.5 \times$ interquartile range (IQR) of the wild type homozygotes (Fig. 3).

4. Discussion

Several regions within the *HGSNAT* promoter had a profound influence on transcription rates in reporter assays. The –101/–20 region was important for achieving full transcriptional activity of the promoter, since reporter activity from the construct containing the region (pGL4 – 1305/–20) was significantly higher ($3.0 \times$) than the activity from the construct lacking it (pGL4 – 1305/–101) (Fig. 1A).

Disruption of three of the six predicted Sp1 sites in the –101/–20 region led to significant changes in reporter activity (Fig. 1D). Binding of Sp1 to the region was verified using ChIP. Inactivation of the Sp1-D site led only to a non-significant lowering reporter activity. Disruption of Sp1-A site resulted in a steep (55%) decrease of reporter activity, while disruption of the other two sites (Sp1-B and Sp1-C) led to its two-fold increase. Sp1 molecules binding to proximal promoters form multimeric complexes that synergistically activate transcription (Pascal and Tjian, 1991). The interplay between individual Sp1 sites is not fully understood and both increases and decreases in transcription activity were observed after inactivation of Sp1 sites in proximal promoters (Li et al., 1996; Hewetson and Chilton, 2003). Binding sites for other members of putative major vertebrate transcription factor families, including Cys2-His2 zinc finger, homeodomain, and basic helix-loop-helix transcription factors were predicted in the –1305/–20 region (Supplementary Table 1) and may participate in *HGSNAT* regulation.

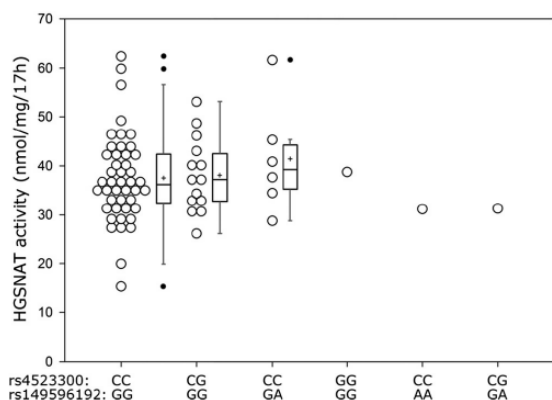


Fig. 3. The *N*-acetyltransferase activity in controls. Dot density graph supplemented with box plots shows *N*-acetyltransferase activity in 68 control samples grouped by genotype. The box limits display the 25th and 75th percentiles, whiskers represent the minimal and the maximal values within the $1.5 \times$ IQR range. Center lines are medians; "+" signs are means. Outliers are plotted as individual points.

Furthermore, the extension of the promoter fragment in the pGL4 –1305/–20 with 1.6 kb of the 5'-flanking sequence (pGL4 –2905/–20) or 70 bp of the 3'-flanking sequence (pGL4 –1305/+50) did not lead to increased luciferase activity, suggesting that the flanking sequences did not contain elements important for the promoter's activity.

Analysis of promoter 5' deletion mutants identified a *cis*-active element(s) enhancing transcriptional activity in the –1073/–716 region. Deletion of the region led to 60% decrease in reporter activity, showing that there were regulatory elements that had a major influence on the promoter's activity. Constructs carrying promoter fragments in the antisense orientation (pGL4 –20/–1305 and pGL4 +50/–1305) produced moderate levels of reporter activity (Fig. 1B). This supports divergent initiation of transcription at the promoter. Accordingly, addition of the 5'-flanking sequence (–1305/–2905) to the construct pGL4 –20/–2905 containing the extended promoter in the antisense orientation led to a dramatic decrease of activity to values comparable with the empty vector pGL4 basic.

Divergent initiation of transcription is a common feature of human promoters that is not limited to bidirectional promoters (Seila et al., 2008). Core and co-workers found that 55% of all genes displayed significant divergent transcription within 1 kb of sense-oriented TSS that could not be accounted for by bidirectional promoters (Core et al., 2008). There is no known gene that could share the *HGSNAT* promoter >5 kb upstream of *HGSNAT*, which strongly suggests that *HGSNAT* indeed does not have bidirectional but divergent promoter organization.

We used the 5'RACE to locate the capped 5' ends of *HGSNAT* transcripts and identified two main TSSs at positions +1 and –15 from the DS-ATG. Both sites were downstream of the US-ATG, showing that transcripts carrying only the DS-ATG are predominant.

Previously, we reported transcripts originating upstream of US-ATG, suggesting that there were several weaker TSSs in the region (Hrebicek et al., 2006). These transcripts, detected by RT-PCR, were likely promoter upstream transcripts (PROMPTs), which initiate in the 5'-flanking promoter region by random action of RNA polymerase II in areas with open chromatin structure (Preker et al., 2011). These transcripts were not found using 5'RACE in the present study.

Therefore, the major *HGSNAT* TSSs are the +1 and –15 bp sites, and only a minority of transcripts initiate further upstream. We conclude that the translation of *N*-acetyltransferase indeed starts mainly at the DS-ATG.

The TSSs are flanked by a fully unmethylated CpG island. The promoter conforms to the blueprint of a housekeeping gene promoter,

since it does not contain a TATA box, has an unmethylated CpG island, and has multiple Sp1 sites (Zhu et al., 2008). Almost half of the *HGSNAT* exons showed constant expression in a panel of 16 tissues in a NGS screen resolving individual exons (Eisenberg and Levanon, 2013), which is consistent with *N*-acetyltransferase's apparent role in basic cell maintenance. Variable expression levels in other exons may be explained, at least in part, by alternative splicing of *HGSNAT* transcripts (Hrebicek et al., 2006).

Expansion and upregulation of lysosomal systems are mediated by TFEB through binding sites in the majority of lysosomal gene promoters (Settembre et al., 2011). Although we found two low-scoring motifs conforming to the TFEB (CLEAR) consensus upstream in the *HGSNAT* promoter, they are less likely to be true CLEAR motifs, since relatively few of the confirmed CLEAR sites were found >300 bp upstream of TSS. Moreover, Palmieri and co-workers did not confirm binding of TFEB to the *HGSNAT* promoter, using a palette of techniques including CHIP sequencing (Palmieri et al., 2011). Interestingly, they concluded that only four of the nine genes of the heparan sulfate degradation pathway were TFEB targets.

Our search for *HGSNAT* promoter variants with functional impact identified two point changes (rs4523300 and rs149596192) that caused a significant lowering of luciferase activity in reporter assays (up to 68% and 59%, respectively). Bioinformatic searches did not predict that they inactivate TF binding sites. The rs149596192 lied at a potential Sp1 site, but the variant sequence conformed to the consensus Sp1 motif.

Next, we compared WBC *N*-acetyltransferase activity in individuals heterozygous for rs149596192 and rs4523300 to activities in individuals homozygous for the wild-type alleles. Overall, neither variant had a measurable impact on WBC *N*-acetyltransferase activity. This finding is not entirely surprising, since there is considerable variation in *N*-acetyltransferase activity in healthy controls, which may reflect both the influence of unknown factors, such as other *HGSNAT* variants as well as analytical assay errors. The decrease of reporter activity caused by variants may not have a linear relationship with *N*-acetyltransferase activity levels *in vivo*, which may be regulated at multiple levels including translation. In light of this background, the decrease in *N*-acetyltransferase activity due to rs149596192 and rs4523300 may be too small to be detected, especially in heterozygotes.

5. Conclusion

HGSNAT transcription is driven by a TATA-less promoter, whose key elements are contained within a 1054 bp region upstream of exon 1. Multiple Sp1 sites flanking the two major TSSs at positions +1 and –15 bp are important for control of transcriptional activity. The majority of transcripts contain only DS-ATG. Two common promoter variants, rs149596192 and rs4523300, lead to lower promoter reporter activities *in vitro*, but individuals carrying the variants did not express lower *N*-acetyltransferase activities in WBCs.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Věra Lánská, Statistical Unit, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague for her kind help with the statistical analysis.

This work was supported by a grant from Grant Agency of Charles University (GA UK 99107) and by Charles University institutional programs PRVOUK-P24/LF1/3, UNCE 204011, and SVV UK 260148/2015.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.051>.

References

- Ali, A.M., Bajaj, V., Gopinath, K.S., Kumar, A., 2009. Characterization of the human SLC22A18 gene promoter and its regulation by the transcription factor Sp1. *Gene* 429, 37–43.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., Noble, W.S., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37, W202–W208.
- Bame, K.J., Rome, L.H., 1986a. Acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for an active site histidine residue. *J. Biol. Chem.* 261, 10127–10132.
- Bame, K.J., Rome, L.H., 1986b. Genetic evidence for transmembrane acetylation by lysosomes. *Science* 233, 1087–1089.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T., 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933–2942.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., Lis, J.T., 2008. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845–1848.
- Dreos, R., Ambrosini, G., Perier, R.C., Bucher, P., 2015. The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 43, D92–D96.
- Eisenberg, E., Levanon, E.Y., 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* 29, 569–574.
- Emami, K.H., Burke, T.W., Smale, S.T., 1998. Sp1 activation of a TATA-less promoter requires a species-specific interaction involving transcription factor IID. *Nucleic Acids Res.* 26, 839–846.
- Fan, X., Zhang, H., Zhang, S., Bagshaw, R.D., Tropak, M.B., Callahan, J.W., Mahuran, D.J., 2006. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am. J. Hum. Genet.* 79, 738–744.
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.
- Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., Tjian, R., 1994. A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 192–196.
- Grabe, N., 2002. AlIBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. In *Silico Biology* 2, S1–15.
- Hartree, E.F., 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48, 422–427.
- Hewetson, A., Chilton, B.S., 2003. An Sp1-NF-Y/progesterone receptor DNA binding-dependent mechanism regulates progesterone-induced transcriptional activation of the rabbit RUSH/SMARCA3 gene. *J. Biol. Chem.* 278, 40177–40185.
- Hrebicek, M., Mrázová, L., Seyrantep, V., Durand, S., Roslin, N.M., Noskova, L., Hartmannova, H., Ivanek, R., Cizkova, A., Poupetova, H., et al., 2006. Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Am. J. Hum. Genet.* 79, 807–819.
- Klein, U., van de Kamp, J.J., von Figura, K., Pohlmann, R., 1981. Sanfilippo syndrome type C: assay for acetyl-CoA: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in leukocytes for detection of homozygous and heterozygous individuals. *Clin. Genet.* 20, 55–59.
- Li, R., Hodny, Z., Luciakova, K., Barath, P., Nelson, B.D., 1996. Sp1 activates and inhibits transcription from separate elements in the proximal promoter of the human adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) gene. *J. Biol. Chem.* 271, 18925–18930.
- Lubke, T., Lobel, P., Sleat, D.E., 2009. Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 625–635.
- 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.
- Pascal, E., Tjian, R., 1991. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.* 5, 1646–1656.
- Preker, P., Almvig, K., Christensen, M.S., Valen, E., Mapendano, C.K., Sandelin, A., Jensen, T.H., 2011. PROMoter upstream Transcripts share characteristics with mRNAs and are produced upstream of all three major types of mammalian promoters. *Nucleic Acids Res.* 39, 7179–7193.
- Pugh, B.F., Tjian, R., 1991. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* 5, 1935–1945.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al., 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473–477.
- Seila, A.C., Calabrese, J.M., Levine, S.S., Yeo, G.W., Rahl, P.B., Flynn, R.A., Young, R.A., Sharp, P.A., 2008. Divergent transcription from active promoters. *Science* 322, 1849–1851.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al., 2011. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332, 1429–1433.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., Ballabio, A., 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283–296.
- Smale, S.T., Kadonaga, J.T., 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 449–479.
- Suske, G., 1999. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291–300.
- Turatsinze, J.V., Thomas-Chollier, M., Defrance, M., van Helden, J., 2008. Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat. Protoc.* 3, 1578–1588.
- Viart, V., Des Georges, M., Claustres, M., Taulan, M., 2012. Functional analysis of a promoter variant identified in the CFTR gene in cis of a frameshift mutation. *Eur. J. Hum. Genet.* 20, 180–184.
- Voznyi, Y., Karpova, E.A., Dudukina, T.V., Tsvetkova, I.V., Boer, A.M., Janse, H.C., van Diggelen, O.P., 1993. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease C (MPS III C). *J. Inher. Metab. Dis.* 16, 465–472.
- Wenger, D.A., Williams, C., 1991. Screening for lysosomal disorders. In: *Hommes, F.A. (Ed.), Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual.* Wiley-Liss, New York, NY, pp. 587–617.
- Zhu, J., He, F., Hu, S., Yu, J., 2008. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet.* 24, 481–484.

Tab. S1: Souhrn výsledků naměřených u kontrolních vzorků při validaci metod pro měření poměru XCI.

Vzorek	Věk	AR	Assay I		Assay II		Assay III		Assay IV		Assay V		Počet použitelných metod (AR, II, IV, nebo V)
		XCI	Velikost (bp)	XCI	Velikost (bp)	XCI	Velikost (bp)	XCI	Velikost (bp)	XCI	Velikost (bp)	XCI	
1	39	38,6	305		287		318		276+249	41,5	319+301	43,5	3
2	16		305		287		318		276+249	N	304+301		1
3	13	10,2	305		287+281	14,2	318		249		292+319	22,2	3
4	63		305		287+284		318		276		301		0
5	72	6,6	305		284		321		249+243	17,0	316+301	18,4	3
6	32	26,4	305		284		318		273+243	38,9	319+301	37,4	3
7	33	21,2	305+311	36,8	284		318		249		313+304	31,3	2
8	47	12,8	305		287+284		318		249		313+301	30,5	2
9	33	14,3	305		284		318		255+249	4,8	319+301	27,6	3
10	27	15,7	305		287		318		276+243	26,0	310+301	25,1	3
11	35	22,8	305		287+284		318		267+243	27,1	301		2
12	32		305		284		318		249		307+304		0
13	25		305		287+284		318		279+249	0,0	298+289	4,0	2
14	30	0,7	305		287+284		318+306	19,3	249		313+301	9,0	2
15	25	11,0	305		284		318		249+243	16,8	313+301	11,6	3
16	36	25,6	305		287		321+318		276+243	17,8	313+301	31,2	3
17	26	13,5	305+311	22,1	284		318+306	29,2	249		301		1
18	30	4,2	305		305+281	3,3	321+318		273+249	7,4	301		3
19	33	13,4	305		287+281	4,4	318		249		304+301		2
20	41		305		287+284		318		249+243	N	301		1
21	41		305+311	10,8	287+284		318		270+249	4,2	313+301	9,8	2
22	34	1,7	305		308+284	2,3	318		249		313+301	13,2	3
23	39	9,1	305		287+281	5,2	318+306	2,6	270+249	15,7	304		3
24	54		305		284+281		321+318		270+249	N	301		1
25	56	0,7	305		284+281		324+318	6,4	270+249	9,0	313+310		2
26	57	17,2	305		287+281	9,4	318+306	3,9	264+243	25,6	301		3
27	56	15,7	305		287+284		318		249		301		1
28	54	11,6	305		284+281		318+306	4,2	249+243	3,0	301+316	2,3	3
29	42	11,0	305		287+284		306		270+249	11,3	301		2
30	27		305		287+281	9,9	318		279+270	7,3	313		2
31	36		305+311	37,6	284+281		318		264		301+319	42,6	1
32	36	28,4	305		287+284		318		249+243	36,2	313+307	32,0	3
33	30	45,2	305		284		318		264+249	48,9	313+301	50,0	3
34	71		305		287+284		318+306	34,7	273+249	45,0	301		1
35	9	19,4	305		287+281	20,6	318		249		313+307	21,6	3
36	35	16,9	305		287+284		318		249		313+304	16,4	2
37	34	22,2	305		287+284		318		270+249	22,9	313+301	23,2	3
38	62	7,9	305		287+281	13,0	318		270		304+301		2
39	26	27,7	305		284		318		273+249	28,2	319+301	36,1	3
40	66	0,3	305		287+281	0,7	318		249+243	10,8	301		3
41	40	9,3	305		284		318		273+243	15,1	307+301	10,6	3
42	40	11,3	305		287+284		318+306	17,4	249+243	9,1	307+304		2
43	37	8,1	305+311	36,9	287+284		318		270+249	7,1	313+301	3,2	3
44	33	2,1	305		287+284		321+318		249		304+301		1
45	41		305		281		318		270+249	32,8	313+304	33,6	2
46	25	10,1	305		284+281		318		255+249	0,1	304+301		2
47	53	9,7	305		287+284		318		249		307+301	8,6	2
48	53		305		287+284		306		249		319+289	N	1
49	52	6,7	305		284+281		318		273		301		1
50	56	14,0	305		287		318		249		304		1
51	56		305+311	35,3	287+284		318+315		249		313+301	29,7	1
52	49	21,9	305		287+284		321+318		270		313+301	29,1	2

53	48		305		284+281		318+306	35,3	270+249	37,0	304+301		1
54	51	36,6	305		287		318+306	22,5	249+243	39,3	301		2
55	13		305		287+284		321+318		243		313+301	N	1
56	30	28,3	305		287+284		318		243		313+304	31,4	2
57	35	1,1	305		284		321+306	13,6	249+243	16,3	319+304	13,9	3
58	36	1,8	305		287+281	0,8	318+306	19,5	249+243	10,6	313+304	24,4	4
59	69		305		287+284		318		270+243	22,3	313+301	25,0	2
60	43	18,9	305		296+287	16,4	318+306	15,5	249		313+301	33,7	3
61	31	7,7	305		287+284		318		249+243	10,1	304+301		2
62	16		305		287+284		318		270+249	7,1	307+301	10,2	2
63	48		305		296+284	28,8	318		249		313+304	40,1	2
64	32		305+311	N	287+284		321+318		249		301		0
65	27		305		287+284		318+306	N	249		301		0
66	20	7,7	305		287+284		318+306	10,4	249+243	3,5	301		2
67	22	11,1	305		287		318		276+243	19,8	310+301	18,3	3
68	26		305		290+287		306		279+249	17,1	313+301	40,9	2
69	30	27,3	305		290+287		318		249		307+301	40,9	2
70	43		305		287+284		318+306	5,0	249		301+286	7,3	1
71	25		305		287+284		318		270+243	N	304+301		1
72	26		305		287+284		318+309	16,3	249		313+304	22,8	1
73	37		305		284		318+306	48,8	249+243	49,9	313		1
74	33	5,6	305		287		318		270+249	14,6	322+304	29,6	3
75	38	12,1	305		287+284		315+306	17,8	249		313+304	9,9	2
76	27		305		287+284		318		249		313+301	N	1
77	24		305+311	14,2	287		318+309	14,6	249		313+301	18,4	1
78	35	27,6	305		287		318		279+249	38,5	304+301		2
79	36	26,9	305+311	5,9	284+281		318		270+243	7,8	313+301	1,6	3
80	21		305		284+281		318		249+243	N	301		1
81	21	9,7	305		287		318		276+249	3,8	319+316		2
82	22		305+311	13,1	287+281	4,0	318		249+243	0,4	304		2
83	30	0,4	305		287+284		318+306	13,0	249		304		1
84	18	4,5	305+311	21,4	287+284		321+318		270+249	22,4	301		2
85	20	15,9	305		284		318		249		313+304	28,5	2
86	18	4,7	305+311	6,9	284+281		318		249		313+304	24,0	2
87	32		305		287+284		318+306	17,9	264+243	14,2	304+301		1
88	45		305		287+284		321+318		249+243	N	301		1
89	42		305		284+281		318		270+249	N	304		1
90	35	9,2	305		287+281	12,4	318		249+243	10,6	313+304	3,1	4
91	28	21,4	305		284+281		318+306	15,8	273+249	34,0	319+301	45,3	3
92	50		305		284		318		249		313+304	N	1
93	16	25,4	305		284+281		318		270+243	6,9	304+301		2
94	19	3,3	305		284		318		270+243	19,2	304+301		2
95	19	30,6	305		287+281	27,1	318		264+249	28,8	304		3
96	19	14,8	305+311	20,0	287+281	14,3	318		249+243	12,7	304+289	14,2	4
97	54	19,2	305		287		318+306	2,6	249		307		1
98	61	10,1	305		287+281	13,4	318		249		307+301	2,9	3
99	52	0,9	305		284+281		318		243+279	12,7	304+301		2
100	36	30,6	305		287		321+318		276+243	18,0	313+301	37,5	3

N=neměřeno

Tab. S2: Souhrn hlavních výsledků naměřených u 15 vzorků jater (12 získáno od pacientky s deficitem OTC, 3 kontroly).

	Vzorek no.	XCI (% aktivních X _{WT})		průměr více metod	Exprese WT alely (%)		Western blot (relativní kvantita v %)				Aktivita						
		CNKS2R	SD		c.583G>C	c.137A>G	OTC	SD	OTC/ GAPDH	SD	CPS1	SD	μmol/ (h.mg)	SD	relativní (%)	SD	
pacientka	1A	36,8	3,6	39,2	37,1	41,8	31,9	7,3	31,0	2,5	96,5	8,2	8,6	0,7	29,2	1,4	
	1B	40,9	4,9	39,1	31,3	33,7	29,8	3,4	27,5	1,4	101,3	3,4	6,4	0,5	21,8	1,2	
	2A	25,7	1,3	30,3	17,8	20,9	27,1	3,6	18,8	2,4	101,0	8,0	4,8	0,4	16,4	0,8	
	2B	26,5	1,7	28,5	13,0	15,0	21,6	3,4	17,7	4,1	116,7	4,7	2,7	0,4	9,2	0,2	
	3A	29,9	1,2	31,4	13,1	19,2	25,8	4,7	20,7	2,3	123,4	2,0	4,2	0,9	14,0	1,2	
	3B	30,5	1,8	31,9	28,9	28,1	27,0	7,8	18,7	0,9	108,4	10,5	6,3	0,0	21,6	2,7	
	4A	23,4	0,6	25,8	17,7	20,9	24,1	3,4	16,9	1,7	120,6	6,8	3,9	0,3	13,2	0,7	
	4B	37,6	0,6	35,0	31,6	31,1	33,7	3,9	25,4	3,7	113,1	0,3	6,7	0,3	23,0	1,9	
	5A	26,4	1,1	32,1	15,0	15,2	20,7	1,2	15,3	0,5	113,9	0,7	3,7	0,6	12,5	0,3	
	5B	23,4	6,9	25,6	18,8	29,6	24,5	1,2	15,5	2,0	112,8	0,0	3,6	0,8	12,0	1,3	
	6A	34,0	6,1	33,2	50,7	53,6	37,2	4,0	24,4	2,9	111,6	1,4	9,0	0,6	31,1	6,1	
	6B	35,8	1,3	35,7	38,4	43,3	45,7	4,3	33,5	0,5	98,0	3,6	11,0	0,9	37,6	1,8	
kontrola	IV							100,0		100,0		100,0		29,5	3,8	100,0	
	V							91,9		171,9		102,2		38,7	3,2	131,7	6,1
	VI							93,6		87,8		99,9		28,3	0,1	96,6	12,8
průměr:	pacientka	30,9		32,3	26,1	29,4		29,1		22,1		109,8				20,1	
	kontroly							95,2		119,9		100,7				109,4	
	průměr u pacientky přepočteny dle průměru kontrol:							30,6		18,5		109,0				18,4	

SD...směrodatná odchylka