

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**Charakterizace promotorových oblastí genů *HGSNAT* a *GBA*, a příspěvek  
ke studiu patogeneze MPS IIIC a Gaucherovy choroby**

Mgr. Eva Richtrová

2014

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

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

Školící pracoviště: Ústav dědičných metabolických poruch

Školitel: MUDr. Martin Hřebíček, Ph.D.

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

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Cíle a pracovní hypotézy</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Metody</b> .....	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>11</b>
<b>4.1</b>	<b>Gen <i>GBA</i> má alternativní promotor, jehož vlastnosti a exprese jsou charakteristické pro housekeeping geny</b> .....	<b>11</b>
4.1.1	Gen <i>GBA</i> má pět transkripčních variant .....	11
4.1.2	Gen <i>GBA</i> má alternativní promotor P2 .....	12
4.1.3	Gen <i>GBA</i> má několik začátků transkripce .....	12
4.1.4	Expres z P1 a P2 v různých tkáních .....	13
4.1.5	Změny v sekvenci P1, P2 a exonů -1 a -2 u pacientů .....	13
4.1.6	Analýza vazby transkripčních faktorů v P2 .....	14
4.1.7	Expres z P1 a P2 během diferenciaci monocytů na makrofágy .....	14
<b>4.2</b>	<b>Promotor genu <i>HGSNAT</i> neobsahuje TATA box a má několik začátků transkripce</b> .....	<b>15</b>
4.2.1	Gen <i>HGSNAT</i> má dva hlavní začátky transkripce .....	15
4.2.2	Promotor <i>HGSNAT</i> se nachází v 1054 bp úseku ve směru 3'-5' od exonu 1 .....	15
4.2.3	Analýza vazby transkripčních faktorů v promotoru .....	16
4.2.4	Promotor <i>HGSNAT</i> má charakter promotorů housekeeping genů .....	17
4.2.5	Změny v sekvenci <i>HGSNAT</i> promotoru u pacientů .....	17
<b>4.3</b>	<b>Myší model ukazuje MPS IIIC jako neurodegenerativní poruchu s mitochondriální dysfunkcí</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4</b>	<b>Izolace lysosomálních membrán z kultivovaných buněk</b> .....	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>Použitá literatura</b> .....	<b>21</b>
<b>7</b>	<b>Seznam publikací, které jsou podkladem dizertace</b> .....	<b>23</b>

## Abstrakt

Patogeneze mukopolysacharidózy IIIC (MPS IIIC) a Gaucherovy choroby nebyla na molekulární úrovni doposud zcela objasněna, stejně jako nejsou známy důvody pro výrazně rozdílné fenotypové projevy u pacientů nesoucích stejný genotyp. Protože varianty v regulačních oblastech genů mohou být příčinou výše zmíněné fenotypové variability, zabývala jsem se studiem doposud necharakterizovaných promotorových oblastí genů *HGSNAT* a *GBA*, které jsou mutovány u těchto dvou lysosomálních onemocnění. Prokázala jsem existenci alternativního promotoru genu *GBA* (P2) a dále se zabývala studii, které by mohly objasnit jeho fyziologickou funkci a případně i roli při patogenezi Gaucherovy choroby. Zjistila jsem, že alternativní promotor genu *GBA* není tkáňově specifický a nevede k variabilní expresi mRNA pro glukocerebrosidázu u pacientů se stejným genotypem a výrazně odlišnými fenotypovými projevy. P2 není různě využíván během diferenciaci monocytů na makrofágy, ani u makrofágů odvozených od kontrolních osob a od pacientů s Gaucherovou chorobou, u kterých je stádání přítomno hlavně v buňkách makrofágového původu. Nepodařilo se tedy nalézt změny svědčící pro možnou úlohu P2 v patogenezi nemoci. Dále jsem charakterizovala promotorovou oblast genu *HGSNAT* a prokázala jsem, že vazba transkripčního faktoru Sp1 je důležitá pro jeho expresi. Varianty sekvence nalezené v promotoru *HGSNAT* u pacientů neměly vliv na jeho expresi. Oba promotory mají charakter promotoru housekeeping genů, neobsahují TATA box, mají několik začátků transkripce, nemetylovaný CpG ostrůvek a několik vazebných míst pro Sp1. Mají shodné rysy s řadou promotorů genů kódujících jiné lysosomální enzymy.

Při studiu myšího modelu MPS IIIC jsem detekovala v mozcích deficitních myší známky zvýšené autofagie, která zřejmě hraje roli při patogenezi choroby. Dále jsem se podílela na optimalizaci metody pro izolaci lysosomálních membrán, která bude využita pro biochemické studie N-acetyltransferázy, enzymu deficitního u MPS IIIC, který nebyl zcela charakterizován.

## Abstract

Pathogenesis of mucopolysaccharidosis type IIIC (MPS IIIC) and Gaucher disease has not been yet fully clarified, and the causes of phenotypical variability between the patients with the same genotype in Gaucher disease remain obscure. Because the variants in the regulatory regions of genes can cause phenotypical differences mentioned above, I have studied promoter regions of *HGSNAT* and *GBA* genes mutated in these lysosomal disorders. I have shown that there is an alternative promoter of *GBA* (P2). Additional studies were aimed to elucidate possible physiological functions of P2, and its possible role in the pathogenesis of Gaucher disease. I have found that P2 is not tissue specific, and that its variants do not influence the variability of phenotype in Gaucher patients with the same genotype. P2 is used differentially neither during the differentiation of monocytes to macrophages nor in macrophages from controls and Gaucher patients, in whom there is a prominent storage only in cells of macrophage origin. We have thus not found any changes that would suggest a role for P2 in the pathogenesis of Gaucher disease.

I have characterized the promoter region of *HGSNAT* and shown that the binding of Sp1 transcription factor is important for its expression. Sequence variants found in *HGSNAT* promoter in patients did not influence its expression. Both promoters have features common with the majority of housekeeping gene promoters, as they do not contain TATA box, have multiple transcription initiation sites, contain an unmethylated CpG island and have multiple binding sites for transcription factor Sp1. They share the same features with many promoters of genes encoding other lysosomal enzymes.

I have studied the MPS IIIC mouse model and detected increased autophagy in the brains of *HGSNAT* deficient mice, which apparently plays a role in the pathogenesis of MPS IIIC.

I have also participated in the optimization of a method for isolation of lysosomal membranes, which will be used for biochemical study of N-acetyltransferase, the enzyme deficient in MPS IIIC, which has not been completely characterized.

## 1 Úvod

**Lysosomální střádavá onemocnění** (LSDs) tvoří skupinu více než 50 dědičných onemocnění, pro které je charakteristické hromadění neodbouraných makromolekul v lysosomech zejména v důsledku poruchy degradační funkce endosomálně lysosomálního systému.

LSDs jsou členěny do skupin podle biochemických vlastností neodbouraného materiálu na lipidózy, mukopolysacharidózy, glykoproteinózy, glykogenózy a další [1].

Jedná se o vzácná onemocnění, ale sumárně se v naší populaci vyskytují s frekvencí 1:7000 živě narozených dětí [2, 3]. Mají široké spektrum klinických příznaků, mohou se objevit kdykoli od novorozeneckého období až do pozdní dospělosti. Časně formy mívají těžký průběh s rychlou progresí. Postiženy jsou často metabolicky aktivní orgány a tkáně - kostní dřev, játra, kosti, kosterní svaly, myokard, CNS.

U LSDs může docházet k poruchám autofagie v důsledku akumulace autofagosomů způsobené jejich defektní fúzí s lysosomy. Lysosomy hrají zásadní roli v autofagii, fúzí s autofagosomy a umožňují tak degradaci jejich obsahu. Autofagie byla analyzována u celé řady LSDs s různě závažnými fenotypovými projevy, v různých tkáních a typech střádavých molekul. U většiny případů bylo zaznamenáno zhoršení autofagie způsobené hromaděním polyubikvitinylovaných proteinů a nefunkčních mitochondrií [4]. Porucha autofagie se může podílet na patologickém hromaděním špatně odbouratelných proteinů v neuronech u LSDs.

**Gaucherova choroba** (GD) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené deficitem lysosomálního enzymu glukocerebrosidázy ( $\beta$ -Gluc).  $\beta$ -Gluc je odpovědná za štěpení glykolipidu relativně hojného v membránách – glukosylceramidu (glukocerebrosidu) na glukózu a ceramid. Glukosylceramid se hromadí přednostně v lysosomech cirkulujících nebo fixních makrofágů - tzv. Gaucherových buňkách, ty postupně nahrazují zdravé buňky, především v játrech, slezině a kostní dřev, mohou se však hromadit i v jiných částech těla.

**Gen pro glukocerebrosidázu** (*GBA*) se nachází na chromosomu 1q21 [5], obsahuje 11 exonů a 10 intronů, pokrývá oblast 7,2 kb. Promotor se nachází v bezprostřední blízkosti exonu 1 ve směru 3' - 5', obsahuje dva TATA boxy a dva CAT boxy, nenachází se zde žádný GC motiv pro vazbu transkripčního faktoru Sp1 [6]. V promotorové oblasti byly popsány čtyři motivy pro vazbu transkripčních faktorů AP-1, PEA3, OBP, CBP, které jsou zodpovědné za různou expresi *GBA* [7]. Další regulační elementy byly nalezeny v konzervovaných nekódujících oblastech v blízkosti *GBA* v různých buněčných liniích [8]. Přestože je  $\beta$ -Gluc exprimovaná

ve všech tkáních, množství mRNA se v různých buněčných liniích liší, což svědčí o možnosti tkáňově specifické regulace [9]. Exprese mRNA nekoreluje s enzymovou aktivitou ve všech tkáních, proto se předpokládá že, aktivita  $\beta$ -Gluc je regulována ještě jinými mechanismy [10].

**Mukopolysacharidóza IIIC (MPS IIIC)** neboli Sanfilippův syndrom typu C je vzácné autozomálně recesivní onemocnění způsobené deficitem enzymu acetyl-CoA: $\alpha$ -glukosaminid N-acetyltransferázy (N-acetyltransferázy), což vede k nedostatečné degradaci heparan sulfátu, lineárního sulfatovaného polysacharidu, který je součástí proteoglykanů na povrchu buňky nebo v extracelulární matrix. N-acetyltransferáza není na rozdíl od ostatních enzymů účastnících se degradace heparan sulfátu hydroláza, není strukturně podobná žádným známým eukaryotním či prokaryotním N-acetyltransferázám ani dalším lysosomálním proteinům. Je zakotvena v lysosomální membráně a katalyzuje acetylaci glukosaminových zbytků heparan sulfátu, který nemůže být přímo hydrolyzován. Obsahuje 11 transmembránových domén a 5 N-glykosylačních míst [11, 12].

**Gen pro N-acetyltransferázu (HGSNAT)** byl identifikován v roce 2006 dvěma nezávislými skupinami [11, 12]. Nachází se na chromosomu 8 v pericentromerické oblasti, obsahuje 18 exonů a kóduje protein o velikosti 73 kDa. Promotor genu nebyl dosud charakterizován, 5'konec transkriptu je vysoce GC bohatý. cDNA sekvence obsahuje dva ATG iniciační kodony, které jsou ve čtecím rámci [12]. V některých expresních studiích bylo považováno za iniciační kodon ATG v pozici +1 (downstream, 1. ATG) [11-13] a v některých ATG v pozici -84 (upstream) [14, 15].

Produkce lysosomálních enzymů je regulována na úrovni transkripce transkripčním faktorem EB (TFEB) [16]. V promotorech většiny lysosomálních genů byla nalezena sekvence CLEAR (*Coordinated Lysosomal Expression and Regulation*), na niž se váže TFEB a pozitivně reguluje expresi lysosomálních genů. Zvýšená exprese TFEB v buňkách zvyšuje syntézu lysosomálních proteinů a schopnost buňky odbourávat komplexní molekuly a patogenní proteiny. TFEB je hlavní regulátor buněčných degradačních drah. Aktivuje transkripci genů, které kódují proteiny účastnící se procesů spojených s lysosomy jako je autofagie, exocytóza, endocytóza, fagocytóza, imunitní odpověď a katabolismus lipidů [17]. V budoucnu by mohl sloužit jako terapeutický nástroj pro zesílení odpovědi na patogenní stádání v LSDs a neurodegenerativních chorobách.

## 2 Cíle a pracovní hypotézy

Předmětem této práce byla **charakterizace promotorových oblastí dvou genů (*GBA* a *HGSNAT*)** jejichž mutace vedou k lysosomálním střídavým onemocněním (Gaucherově chorobě a mukopolysacharidóze IIIC), dále **biochemické studie na myším modelu MPS IIIC** a **purifikace lysosomálních membrán** pro budoucí charakterizaci enzymu deficitního u MPS IIIC.

Promotor genu *GBA* byl popsán v roce 1989 včetně regulačních elementů ovlivňujících genovou expresi. V různých databázích jsme však našli alternativní transkripty, které obsahují na svém 5'konci jeden nebo dva exony navíc, jejichž sekvence neodpovídá sekvenci v úseku DNA mezi již charakterizovaným promotorem a prvním exonem, což svědčilo pro hypotézu, že gen *GBA* může mít alternativní promotor. Hlavním úkolem bylo ověřit, zda tento promotor skutečně existuje a jak ovlivňuje genovou expresi *GBA* v různých tkáních. Další otázkou, kterou jsem se zabývala, byla možnost rozdílného využití obou promotorů v různých tkáních. Doposud není jasně vysvětleno, proč se vyskytují výrazně odlišné klinické průběhy Gaucherovy choroby u pacientů se stejným genotypem. Dalším dílčím úkolem této práce bylo ověřit, zda by fenotypová odlišnost nemohla být vysvětlena různou expresí mutantní glukocerebrosidázy díky variantám v obou promotorech nebo v nově nalezených nekódujících exonech.

Výrazné střídání lipidů je u Gaucherovy nemoci přítomno výhradně v makrofázích, proto jsem dále zkoumala, zda alternativní promotor není odlišně využíván při přeměně monocytů na makrofágy.

Gen *HGSNAT* byl objeven teprve v roce 2006 a není známo nic o regulaci jeho exprese. Zajímavé bylo zjištění, že cDNA sekvence obsahuje dva ATG iniciační kodony, které jsou ve čtecím rámci. Naším cílem bylo zjistit, zda jsou transkripty přepisovány z obou ATG, nebo zda je jeden z kodonů využíván přednostně. Hlavním úkolem bylo charakterizovat sekvenci promotoru a popsat regulační oblasti včetně vazebných míst pro transkripční faktory. Dále jsem ověřovala, zda změny v promotorové sekvenci ovlivňují genovou expresi *HGSNAT* u pacientů s MPS IIIC.

Dalším úkolem bylo zjistit, zda dochází ke zvýšené autofagii a abnormální ubikvitinylnaci proteinů v mozku myšího modelu MPS IIIC, což může přispět k pochopení patogenetických změn v neuronech. Podílela jsem se na detekci LC3-II v mozcích různě starých myší.



V další studii jsem se zabývala optimalizací metody pro izolaci lysosomálních membrán. Izolované lysosomální membrány nám umožní studovat lysosomální membránové proteiny, konkrétně N-acetyltransferázu.

### **3 Metody**

#### **Izolace gDNA, RNA, cDNA**

gDNA byla izolována standardní fenol-chloroformovou extrakcí [18] nebo kitem QiaAmp<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Německo), RNA podle Chomczynskiho a Sacchi [19] za použití Trizol<sup>®</sup> Reagentu (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a cDNA kitem High Capacity RNA-to-cDNA<sup>™</sup> (Life Technologies, Foster City, CA, USA). RNA z monocytů a makrofágů byla izolována kitem BiOstic<sup>®</sup> Blood Total RNA Isolation Kit (MO-BIO, Carlsbad, CA).

#### **Měření koncentrace DNA a RNA**

Koncentrace byly měřeny na přístroji Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

#### **Měření koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody Bradfordové [20] na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko).

#### **DNA elektroforéza v agarózovém gelu**

Agarózový gel byl připraven z 1% agarózy a 1x BB pufru (10mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*10H<sub>2</sub>O). Vizualizace DNA byla provedena pomocí barvičky GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) na UV transluminátoru (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée cedex, Francie).

#### **Klonování DNA a izolace plasmidů**

Klonování do TOPO<sup>®</sup> vektorů (pCR<sup>®</sup>4 a pCR<sup>®</sup>-XL) bylo provedeno klonovacím kitem TOPO<sup>®</sup> TA (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Plasmidová DNA byla izolována pomocí kitů FastPlasmid<sup>™</sup> Mini Kit (Eppendorf, Hamburg, Německo), JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Löhne, Německo) a PerfectPrep<sup>™</sup> EndoFree Plasmid Maxi Kit (Eppendorf).

#### **Polymerázová řetězová reakce**

Všechny PCR reakce byly provedeny podle obecných protokolů [21] pomocí primerů navržených v programu Oligo 6 software (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA) a syntetizovaných firmou Generi Biotech (Hradec Králové, ČR). Amplifikace probíhala na termálním cykleru DNA Engine Dyad<sup>®</sup> Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) nebo Mastercycler<sup>®</sup> nexus (Eppendorf, Hamburg, Německo).

## **Real-time PCR**

Primery a TaqMan sondy byly navrženy pomocí programu Primer Express 3.0 software a syntetizovány firmou Life Technologies (Foster City, CA, USA). Amplifikace probíhala na přístroji StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies), byl použit TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies). Kvantifikace byla provedena metodou kalibračních křivek a komparativní  $\Delta\Delta Cq$  metodou [22]. Při komparativní  $\Delta\Delta Cq$  metodě se k normalizaci používal *GAPDH* a *ACTB*. Pro výpočet stability exprese byly použity programy geNorm a NormFinder [23, 24].

## **Sekvenování**

Sekvenování bylo prováděno na kapilárních sekvenátorech ABI Prism® 3100-Avant™ Genetic Analyzer a 3500xL Genetic Analyzer (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Pro přípravu sekvenační reakce byl použit BigDye® Terminátor v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies).

## **SDS polyakrylamidová elektroforéza**

Separací i zaostřovací gel byl připraven podle Laemmli [25]. Při případě gradientového gelu byla směs míchána v gradientovém mixeru (Sigma-Aldrich) a nalévána za použití peristaltické pumpy Varioperpex® II Peristaltic Pump (LKB, Bromma, Švédsko). Elektroforéza probíhala v aparatuře MightySmall SE250 nebo SE260 (Hoefler, San Francisco, CA, USA) v pufru (192 mM glycin, 25 mM Tris base, 3,47 mM SDS).

## **Western blot**

Proteiny separované na SDS-PAGE byly přebíjeny na PVDF membránu Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA) v polosuché blotovací aparatuře PHERO-multiblot (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen, Německo). Byly použity primární protilátky anti-LAMP1 rabbit polyclonal antibody (1:5 000, darováno Dr. Carlssonem, University of Umea, Švédsko), anti-LC3 (1:2 000, Sigma-Aldrich), 12G10 anti- $\alpha$ -tubulin (DSHB, Iowa city, IA, USA) a sekundární protilátky goat anti-mouse IgG nebo goat anti-rabbit IgG (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) konjugované s reporterovým enzymem – křenovou peroxidázou (HRP). Blot byl vyvolán chemiluminiscenčním detekčním kitem SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) a detekován na přístroji ChemigeniusQ (SynGene, Cambridge, UK).

## **Bioinformatika**

K vyhledávání referenčních sekvencí, transkriptů a ESTs byly použity databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) a

UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), k identifikaci vazebných míst pro transkripční faktory TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), MatInspector (<http://www.genomatix.de/index.html>) a Alibaba2 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#alibaba2>). Alignment P2 a exonu -2 *GBA* genu byl vytvořen z alignmentu kompletních genomů dostupných z Galaxy (<http://main.g2.bx.psu.edu/>) [26].

### **Identifikace začátku transkripce**

Byla provedena metodou 5'RACE pomocí kitů GeneRacer<sup>TM</sup> kit a FirstChoice® RLM-RACE kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA).

### **Bisulfitové sekvenování**

gDNA byla ošetřena bisulfitem sodným (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [27], který konvertuje nemetylované cytosiny na uracily a použita jako templát pro amplifikaci promotorové oblasti obsahující CpG ostrůvky a následně sekvenována.

### **Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)**

Byla provedena pomocí ChIP kit (Abcam, Cambridge, UK). Do HepG2 byl transfekován pN3-Sp1 (darovaný od Prof. Guntrama Suskeho, Marburg, Německo) elektroporací na přístroji Neon® Transfection System (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Sonikace DNA probíhala na přístroji E210 Focused-ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA, USA). Fragmenty DNA použité pro amplifikaci promotorových oblastí *HGSNAT* a *SLC22A18* byly vycytlány protilátkou anti-Sp1 (Abcam).

### **Měření luciferázové aktivity**

Sekvence promotoru byly překlonovány pomocí restričních enzymů do vektoru pGL4.16 (Promega, Madison, WI, USA), který byl transfekován do HepG2 pomocí transfekčních činidel Tfx<sup>TM</sup> – 20 and FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega). Po 48 h inkubaci v termostatu v atmosféře syčené 5% CO<sub>2</sub>, při 37°C byly buňky použity pro měření luciferázové aktivity pomocí kitu Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Chemiluminiscence byla měřena na luminometru (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Německo). Luciferázová aktivita byla vyjádřena jako poměr luminiscence *Photinus pyralis* ku *Renilla reniformis* po odečtení pozadí (RLU, relativní luciferázová jednotka).

### **Cílená mutageneze**

Delece a substituce promotorových sekvencí byly vytvořeny kitem QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) [28].

### **Izolace a kultivace monocytů**

Monocyty byly izolovány z krve negativní selekcí komplexem protilátek obsažených v RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Kanada) a kultivovány s Human Interleukin-3 (IL-3) a Human Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) (Biochrom, Cambridge, UK) regulujícím diferenciaci monocytů na makrofágy [29].

### **Měření enzymových aktivit**

Aktivity alkalické a kyselá fosfatázy, sukcinátdehydrogenázy, katalázy a NADPH-cytochrom *c* reductázy byly měřeny podle protokolů Graham 1993 [30]. Aktivity glukocerebrosidázy, chitotriosidázy a hexosaminidázy byly měřeny fluorimetricky [31].

### **Izolace lysosomálních membrán**

HEK293 a HeLa buňky byly homogenizovány ve skleněném homogenizátoru Dounce homogenizer (Kimble Chase Kontes, Vineland, NJ, USA) a centrifugovány. Organelová peleta byla inkubována s 20 mM metyl esterem methioninu (MME) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a použita pro separaci na lineárním nebo krokovém gradientu. Lineární gradient byl připraven z 15 ml 32,5% a 15 ml 55,5% sacharózy (Lach-Ner, Neratovice, ČR) v gradientovém mixeru (Sigma-Aldrich) za použití peristaltické pumpy Varioperpex® II Peristaltic Pump (LKB, Bromma, Švédsko), krokový gradient z 6 ml 41% nebo 35% sacharózy převrstvené 5 ml 20% sacharózy. Gradienty byly centrifugovány přes noc při 112 700  $g_{max}$  v ultracentrifuze Optima L-90K, rotor SW32 nebo SW32,1 (Beckman-Coulter, München, Německo) a jednotlivé frakce byly postupně odebírány.

### **Měření změny pH pomocí akridinové oranže**

Změny pH byly měřeny pomocí akridinové oranže (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) podle metody Dell'Antone [32].

## **4 Výsledky a diskuze**

### **4.1 Gen *GBA* má alternativní promotor, jehož vlastnosti a exprese jsou charakteristické pro housekeeping geny**

#### **4.1.1 Gen *GBA* má pět transkripčních variant**

V nukleotidových databázích NCBI (GenBank, červen 2010) jsme našli pět alternativních transkriptů genu *GBA*, z nichž čtyři jsou zjevně přepisovány z alternativního promotoru,

neboť obsahují na svém 5'konci jeden nebo dva exony (-1 a -2), které neobsahují sekvenci odpovídající sekvenci v úseku DNA mezi popsaným promotorem a prvním exonem.

V databázi UCSC (Genome browser, 2010) se nachází 146 ESTs a plnodélkových klonů těchto variant, což podporuje jejich existenci. Tyto varianty nemění aminokyselinovou sekvenci a vedou ke stejnému proteinovému produktu. Sekvenováním RT-PCR produktů amplifikovaných z RNA izolované z lidské placenty jsme našli sekvence odpovídající transkripčním variantám obsahujícím exon -2 nebo oba exony -1 a -2.

#### **4.1.2 Gen *GBA* má alternativní promotor P2**

Na základě nalezení různých transkripčních variant genu *GBA* jsme ověřovali, zda tyto alternativní transkripty mohou být přepisovány z alternativního promotoru.

Pomocí luciferázové eseje jsme prokázali, že sekvence ležící ve směru 3'-5' od exonu -2 (-1509 až -353) slouží jako alternativní promotor genu *GBA* (P2 promotor). P2, jehož luminiscenční signál je asi šestkrát nižší, je tudíž *in vitro* slabším promotorem než P1. Fragment však nemusí obsahovat všechny důležité regulační elementy promotoru včetně enhancerů běžně se nacházejících tisíce bází od začátku transkripce ve směru 3'-5' a regulačních sekvencí ležících ve směru transkripce.

Pro bližší charakterizaci P2 byly provedeny cílené delece na 5'konci P2 a ukázaly, že při deleci úseku -1164 až -920 došlo k výraznému snížení luciferázové aktivity. V této oblasti se zřejmě vážou elementy pozitivně ovlivňující transkripci. Nejvyšší luciferázová aktivita byla naměřena u delečního konstruktu pGL4 -1311/-353, zatímco aktivita delečního konstruktu pGL4 -1164/-353 byla srovnatelná s celkovým úsekem promotoru P2 (-1509/-353). V oblasti -1509 až -1311 se může nacházet negativní regulátor transkripce.

Sekvenční alignment ukázal, že P2 je konzervovaný u primátů. Nenachází se u myši a dalších druhů, nenalezli jsme u nich žádné odpovídající mRNA, což znemožňuje jejich studium na myších modelech.

Bisulfitovým sekvenováním jsme prokázali, že CpG ostrůvek v oblasti P2 je nemetylovaný, což také svědčí pro aktivní promotor. Zhruba polovina promotorových oblastí u savců se nachází v oblasti CpG ostrůvků [33], které jsou nemetylované a jsou tak přístupné pro vazbu transkripčních faktorů.

#### **4.1.3 Gen *GBA* má několik začátků transkripce**

Metodou 5'RACE jsme identifikovali tři začátky transkripce nacházející se v pozicích -347, -380 a -413 bp (vztaženo k A v 1. ATG). Většina klonů měla 5'konec transkriptu v pozici -

347 a pouze několik klonů v pozicích -380 a -413. Našli jsme i dva klony se začátky transkripce v pozicích -452 a -563. Zároveň jsme byli schopni amplifikovat RT-PCR produkty více než 500 bp od 1. ATG ve směru 3'-5'. Množství transkriptů začínajících distálně ve směru 3'-5' od tří nalezených začátků transkripce jsme proto měřili pomocí real-time PCR a potvrdili jsme, že většina transkriptů začíná v pozici -347, jak bylo zjištěno pomocí 5'RACE. Transkripty začínající více než 413 bp od 1. ATG ve směru 3'-5' jsou minoritní a pravděpodobně představují tzv. promoter upstream transcripts (PROMPTs) [34].

#### **4.1.4 Exprese z P1 a P2 v různých tkáních**

Studovali jsme, jak se liší exprese transkriptů z P1 a P2 ve 20 různých tkáních a porovnávali jsme ji se dvěma běžně používanými housekeeping geny *GAPDH* a *ACTB*, které jsou exprimovány stabilně ve tkáních. Navrhnout TaqMan sondu pro transkripty z P2 bylo velmi složité z důvodu vysoké sekvenční homologie s pseudogenem *GBA*, proto jsme nejprve testovali její specificitu. Ct hodnoty získané metodou kvantitativní real-time PCR pro transkripty z P1, P2, *GAPDH* a *ACTB* sloužily pro výpočet stability exprese. Programy geNorm a NormFinder využívané pro identifikaci vhodných referenčních housekeeping genů vypočítaly podobnou stabilitu exprese transkriptů z P1 a P2 a dokonce vyšší stabilitu než u obou běžně používaných housekeeping genů.

Zjistili jsme, že relativní exprese genu *GBA* je ve 20 různých tkáních na podobné úrovni. Přestože předchozí studie ukazují, že množství absolutní mRNA se liší v různých buněčných liniích, může být exprese  $\beta$ -Gluc částečně regulována, neboť množství mRNA exprimující se v různých tkáních vždy nekoreluje s enzymovou aktivitou. Je tedy zřejmě regulována jinými mechanismy [10]. Tyto výsledky však nejsou porovnatelné s našimi, neboť jsme neměřili absolutní množství transkriptů. Naše vzorky celkové RNA byly izolovány z normálních lidských tkání, které jsou směsí buněk různého původu. Ve výše zmíněných studiích byly použity nádorové buněčné linie, jejichž vlastnosti se liší od základních buněčných typů.

To, že jsme nenalezli podstatné rozdíly v expresi z obou promotorů v různých tkáních, prakticky vylučuje, že fyziologickou rolí P2 je tkáňově specifická exprese *GBA*.

#### **4.1.5 Změny v sekvenci P1, P2 a exonů -1 a -2 u pacientů**

Sekvenováním P1, P2 a exonů -1 a -2 u pacientů z populace Aškenázských židů s Gaucherovou chorobou, kteří jsou homozygoty pro mutaci N370S, nebyla nalezena žádná změna vedoucí k objasnění fenotypu Gaucherovy choroby. Nepotvrdila se tak hypotéza, že rozdíly v projevu Gaucherovy choroby u pacientů se stejným genotypem mohou být

způsobeny různou expresí mutantní glukocerebrosidázy díky variantám na 5' konci transkriptů a v obou promotorech. Zůstává tedy neobjasněno, jakou roli hraje P2 v regulaci exprese glukocerebrosidázy a možná i v patogenezi Gaucherovy choroby.

#### **4.1.6 Analýza vazby transkripčních faktorů v P2**

Pomocí predikčních programů bylo v P2 sekvenci nalezeno několik konzervovaných vazebných míst pro transkripční faktory. Žádný TATA box nebo CAT box nebyl nalezen, ale bylo nalezeno několik vazebných míst pro Sp1 a další transkripční faktory GATA-1, AP-1, YY1, CREB, CRE-BP, E2F. Několik vazebných míst pro Sp1, nepřítomnost TATA boxu a CpG ostrůvek, který je v oblasti P2 nemetylovaný, jsou vlastnosti charakteristické pro promotory housekeeping genů. P2 má tedy charakter promotoru housekeeping genu, zatímco P1 má jiné vlastnosti, obsahuje TATA box a nasvědčuje tomu, že se jedná o regulovaný promotor [10, 35].

V sekvenci P2 jsme našli dva potenciální CLEAR motivy, které se hojně vyskytují v promotorech lysosomálních genů. Na tuto konvenční sekvenci se váže transkripční faktor EB (TFEB), který se podílí na regulaci exprese lysosomálních genů [16]. CLEAR motivy v P2 se nacházejí v pozicích -764 a -1238, což je 417 a 891 bp ve směru 3'-5' od hlavního začátku transkripce nalezeným 5'RACE. Přestože CLEAR motivy leží obvykle v blízkosti začátku transkripce, -300 až +100 bp od 5' konce genu, byly nalezeny i distální CLEAR motivy v promotorech, které jsou zvýšeně regulovány TFEB [17].

#### **4.1.7 Exprese z P1 a P2 během diferenciacie monocytů na makrofágy**

Protože k masivnímu střádání glukosylceramidu dochází u Gaucherovy choroby pouze v buňkách makrofágového původu, které mají charakteristickou morfologii Gaucherových buněk, měřili jsme, jak se mění exprese z P1 a P2 během diferenciacie monocytů na makrofágy. V průběhu diferenciacie se exprese z obou promotorů vztažená na množství celkové RNA zvyšovala u kontrol, u pacientů, kteří jsou léčeni ERT a u vzorků s inhibovanou  $\beta$ -Gluc pomocí specifického ireverzibilního inhibitoru CBE. Exprese z P1 byla u všech vzorků vyšší než z P2, což odpovídá výsledkům z luciferázové eseje, které svědčí pro to, že P2 je slabší promotor.

K identifikaci diferencovaných makrofágů jsme použily několik markerů - CHIT1, ACP5, CD163, CD68 a CD14. Pomocí Real-time PCR jsme 5. a 12. den kultivace naměřili zvýšenou expresi všech markerů oproti 0. dni, kdy se exprese měřila přímo z izolovaných monocytů. Markantní zvýšení exprese během diferenciacie jsme pozorovali při expresi CHIT1 a ACP5.

Dále jsme měřili změnu exprese TFEB v monocytech a diferencovaných makrofázích, neboť motivy CLEAR pro vazbu TFEB byly podle predikčních programů nalezeny v obou promotorech. Z výsledků real-time PCR nelze vyvodit jednoznačný závěr, neboť exprese TFEB byla v měřených vzorcích velmi variabilní. U většiny vzorků byla exprese v makrofázích zvýšená, to svědčí o aktivaci lysosomálního systému, což se v makrofázích očekává, neboť zde dochází rozšíření lysosomálního systému v souvislosti s fagocytární funkcí makrofágů. U vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou došlo k výraznému zvýšení exprese TFEB v makrofázích, zatímco u kontrolních vzorků byla exprese v makrofázích pouze mírně zvýšená nebo srovnatelná s expresí v monocytech. V dalším pokusu jsme naměřili markantně zvýšenou expresi v makrofázích jak u kontrolních vzorků, tak i u vzorků vystavených působení CBE. Tyto rozdíly v jednotlivých pokusech mohly být způsobeny různými podmínkami při kultivaci a diferenciaci monocytů na makrofágy *in vitro*. Je pravděpodobné, že kultivační podmínky mohou mít vliv na expresi TFEB. Ta je indukována například při autofagii, kterou mohou vyvolat změněné podmínky kultivace buněk. Tyto výsledky nenasvědčí pro to, že by alternativní promotor u Gaucherovy choroby byl odlišně regulován a ani pro to, že by oba promotory byly odlišně exprimovány během vývoje makrofágu.

## **4.2 Promotor genu *HGSNAT* neobsahuje TATA box a má několik začátků transkripce**

### **4.2.1 Gen *HGSNAT* má dva hlavní začátky transkripce**

Sekvence *HGSNAT* v databázích a ESTs obsahují na 5'konci transkriptu dva iniciační ATG kodony, které jsou ve čtecím rámci. Metodou 5'RACE jsme identifikovali dva hlavní začátky transkripce v oblasti promotoru, v pozicích -1 a -15 (vztaženo k A v 1. ATG, downstream), což svědčí o přednostním využívání 1. ATG.

Pomocí bisulfitového sekvenování jsme zjistili, že CpG ostrůvek překrývající se s místy začátku transkripce je nemetylovaný.

### **4.2.2 Promotor *HGSNAT* se nachází v 1054 bp úseku ve směru 3'-5' od exonu 1**

Pro vymezení promotorové oblasti v blízkosti obou potenciálních ATG kodonů na 5'konci genu jsme připravili pět délkových variant promotoru a měřili jejich aktivitu při spouštění reporterového genu. Relativní luciferázová aktivita z promotorové oblasti (-1305/-20) byla



zhruba 1,5 krát vyšší než z oblasti (-1305/-61) a 2,5 krát vyšší než z oblasti (-1305/-101). Oblast -101 až -20 je zřejmě důležitá pro úplnou transkripční aktivitu.

Konstrukty pGL4 se zaklonovanými sekvencemi (-1305/-20, -1305/+50) v opačné orientaci také spouštěly transkripci reporterového genu. To by mohlo ukazovat na přítomnost bidirekcionálního promotoru, který byl dříve spojován především s transkripcí genů kódujících proteiny v obou směrech (na vlákně sense i antisense). I když dochází k přepisu genů v obou orientacích, obvykle je jeden z genů upřednostněn. Nedávné studie zaměřené na nekódující RNA (ncRNA), včetně luciferázových esejí ukázaly, že nekódující transkripty se často vyskytují v blízkosti protein-kódujících genů a sdílejí s nimi stejný promotor. Vysvětlením je, že RNA polymeráza II spouští transkripci bidirekcionálně, zatímco jedním směrem dochází k přepisu protein-kódující RNA, druhým směrem vzniká nestabilní RNA, která je záhy odbourána [36]. Přítomnost ncRNA předpokládáme i u promotoru *HGSNAT*, neboť v databázi se v blízkosti promotoru v opačném směru nenachází žádný známý gen a luciferázová aktivita je tímto směrem výrazně nižší. Jakmile jsme oblast promotoru prodloužili na 5'konci a vytvořili konstrukt (-2905/-20), relativní luciferázová aktivita byla na podobné úrovni jako z pGL4 (-1305/-20). Avšak luciferázová aktivita tohoto konstruktu s promotorovou sekvencí v opačné orientaci dramaticky poklesla na úroveň kontrolního pGL4. Je to zřejmě způsobeno oddálením důležitých promotorových elementů od reporterového genu nebo vložení represoru přítomného ve směru 3'-5'.

Postupnými delecemi na 5'konci promotoru (-1305/-20) jsme našli oblast -1073 až -716, kde se zřejmě nachází elementy pozitivně ovlivňující transkripci, neboť luciferázová aktivita při delecí tohoto úseku výrazně poklesla.

Tyto výsledky z luciferázových esejí nasvědčují tomu, že oblast -1073 až -20 je důležitá pro spouštění transkripce genu *HGSNAT*.

### **4.2.3 Analýza vazby transkripčních faktorů v promotoru**

Sekvence promotoru -1073/-20 byla analyzována pro přítomnost vazebných míst pro transkripční faktory pomocí predikčních programů. Nebyla nalezena žádná konvenční sekvence pro TATA box ani CAT box. Bylo nalezeno několik potenciálních vazebných míst pro transkripční faktory Sp1 a dále vazebná místa pro, AP-1, AP-2, CREB, NRSF, EGR. Šest vazebných míst pro Sp1 bylo nalezeno v oblasti -101 až + 50. Vazebná místa pro Sp1 jsou hojná v promotorech lysosomálních genů, u cystinózy, onemocnění způsobeného deficitem lysosomálního transportního proteinu cystinozinu [37], byla popsána mutace ve vazebném

místě pro Sp1, která byla příčinou onemocnění. Proto jsme se rozhodli zjistit, která z predikovaných vazebných míst jsou autentická a zda změny jejich exprese mohou ovlivnit expresi genu.

Protože jsme už dříve měřili luminiscenci pGL4 (-1305/+50), u kterého nedošlo ke zvýšení signálu v porovnání s pGL4 (-1305/-20), bylo zřejmé, že dvě vazebná místa pro Sp1 v oblasti -20 až +50 nemají zásadní vliv na zvýšení aktivity promotoru. Vliv dalších čtyř Sp1 na promotorovou aktivitu jsme dále ověřovali vytvořením mutovaných konstruktů ve vazebných místech pro Sp1. V konstruktech s mutovaným vazebným místem pro Sp1-A a Sp1-D došlo k výraznému poklesu luciferázové aktivity oproti pGL4 (-1305/-20), z čehož usuzujeme, že tato dvě vazebná místa jsou důležitá pro regulaci *HGSNAT* promotoru. Naopak u konstruktů Sp1-B a Sp1-C došlo ke zvýšení luciferázové aktivity, které může být zapříčiněno málo známou inhibiční funkcí Sp1 [38] nebo vytvořením nových vazebných míst pro transkripční faktory, které nebyly odhaleny predikčními programy při kontrole mutovaných konstruktů.

Přítomnost vazebných míst pro Sp1 v oblasti -101 až -20 byla potvrzena pomocí ChIP. Amplifikace úseku obsahujícího vazebná místa pro Sp1 z imunoprecipitátu připraveného s protilátkou anti-Sp1 potvrzuje vazbu Sp1.

V sekvenci promotoru jsme pomocí predikčních programů našli dva motivy CLEAR, které jsou rozpoznány TFEB účastnícího se regulace exprese lysosomálních genů [16]. Většina CLEAR motivů byla nalezena v úseku -300 až +100 bp od začátku transkripce, i když byly nalezeny i vzdálenější motivy, na kterých vazba TFEB ovlivňovala expresi genu [17]. Tyto dva nalezené motivy se nachází 737 a 867 bp od 1. ATG ve směru 3'-5', tedy v oblasti -716 až -1073, kde došlo k výraznému poklesu aktivity reporteru. Nelze tedy vyloučit vliv TFEB na expresi *HGSNAT*.

#### **4.2.4 Promotor *HGSNAT* má charakter promotorů housekeeping genů**

*HGSNAT* promotor je podobný promotorům housekeeping genů [39], neboť neobsahuje TATA box, má několik začátků transkripce, nemetylovaný CpG ostrůvek a několik vazebných míst pro Sp1. Sp1 je velmi běžně se vyskytující transkripční faktor, který hraje důležitou roli v promotorech housekeeping genů [40].

#### **4.2.5 Změny v sekvenci *HGSNAT* promotoru u pacientů**

Sekvenováním promotorové oblasti -1305/-20 u pacientů MPS IIIC z různých populací jsme našli jeden běžný polymorfismus rs4523300 u tří pacientů a jednu mutaci g.4875G>A u

jednoho pacienta. Cílenou mutagenezí a luciferázovou esejí jsme zjistili, že tyto záměny nevedou ke změnám genové exprese.

### **4.3 Myší model ukazuje MPS IIIC jako neurodegenerativní poruchu s mitochondriální dysfunkcí**

Ve spolupráci se skupinou Prof. Psezhetského (University of Montréal) se nám podařilo technikou gene trap vytvořit myší model MPS IIIC.

Ve tkáních homozygotních myší byl prokázán úplný deficit HGSNAT, u heterozygotů aktivita poklesla na 50% hodnotu, stejně jako je tomu u lidí. Až do věku 5 - 6 měsíců nebyly u myší s deficitem HGSNAT pozorovány žádné změny chování a růstu, závažné známky onemocnění se objevily až po 11 - 12 měsících. Nebyly zaznamenány žádné kosterní abnormality ani faciální dismorfie pozorované u lidských pacientů a jiných modelů MPS III. Příčinou úmrtí byla většinou retence moči v močovém měchýři ve 12 – 16 měsíci.

U HGSNAT deficitních myší bylo zjištěno střádání glykosaminoglykanů v játrech, slezině a mozku. Stejně jako u pacientů a myších modelů jiných MPS III bylo pozorováno sekundární střádání lipidů včetně gangliosidů a cholesterolu v mozku.

V játrech myší s deficitem HGSNAT ve věku 2 až 12 měsíců bylo detekováno zvýšené množství LC3-II ukazující na zvýšenou autofagii. V mozku bylo detekováno zvýšené množství LC3-II až od věku 6 měsíců, zároveň bylo zjištěno výrazné zvýšení podjednotky c mitochondriální ATP syntázy a ubikvitinu svědčící o mitofagii a poruše lysosomální proteolýzy. Zvýšená autofagie spojená s poruchou proteolýzy a akumulací chybně sbalených proteinů byla zjištěna v buňkách u mnoha LSDs [41].

Od časného věku byly v mozku pozorovány známky neuroinflamace včetně aktivace mikroglíí, astrocytů a produkce cytokinů, v 5 – 6 měsících bylo v mikroglíi přítomno významné lysosomální střádání.

Naše data charakterizují MPS IIIC jako neurodegenerativní chorobu s pozorovanými změnami mitochondrií. Abnormální autofagie, konkrétně mitofagie, se může podílet na akumulaci neodbouraného materiálu v lysosomech neuronů. Změny v neuronech včetně jejich zániku mohou být zapříčiněny patologickými změnami jejich mitochondriálního systému.

### **4.4 Izolace lysosomálních membrán z kultivovaných buněk**

Pro účely výzkumu lipidů a proteinů lysosomálních membrán jsme vyvinuli jednoduchou metodu pro izolaci lysosomálních membrán z kultivovaných buněčných linií HEK293 a

HeLa. Organelový koncentrát jsme inkubovali s 20 mmol/l MME po dobu 45 minut pro dosažení optimální lýzy lysosomů. Poté byla frakce lysosomálních membrán získána rozdělením nejprve na lineárním 32,5%-55,5% sacharózovém gradientu, kde byla pozorována zvýšená aktivita  $\beta$ -Gluc ve frakcích s 30-41% a 45% sacharózou, ale zároveň byla patrná zvýšená aktivita SDH svědčící o výrazné mitochondriální kontaminaci. Mitochondriální kontaminaci jsme eliminovali snížením koncentrace sacharózy ve spodní části krokového gradientu z 41% na 35%. Obohacené lysosomální membrány byly získány z rozhraní 20%/35% sacharózy na krokovém gradientu a následným promytím v 10 mmol/l Tris pufru. Frakce promytých lysosomálních membrán byla obohacena 30-krát oproti homogenátu a dávala výtěžnost více než 8%. Výtěžnost je tedy porovnatelná s metodou izolace magnetickou chromatografií [42], která využívá magnetické částice, které nefyziologicky zatěžují lysosomy a může tak dojít k jejich poškození.

Ve frakci promytých lysosomálních membrán jsme pomocí Western blotu detekovali lysosomální membránový protein LAMP1.

Pro zjištění kontaminace jinými organelami jsme měřili aktivity dalších enzymů - sukcinát dehydrogenázy (marker mitochondrií), alkalické fosfatázy (plazmatická membrána), katalázy (peroxisomy), NADPH-cytochrom *c* reduktázy (endoplazmatické retikulum). Aktivity kontaminujících enzymů byly velmi nízké (méně než 1%) s výjimkou katalázy (2,6%), což svědčí o malé kontaminaci peroxisomy.

Měřením změny pH pomocí akridinové oranže jsme zjistili, že ve frakci promytých lysosomálních membrán zůstává zachována funkce lysosomální vakuolární ATPázy, protonové pumpy v lysosomální membráně, která je zodpovědná za udržení kyselého prostředí v lysosomech.

Výtěžnost metody byla podobná u obou buněčných linií HEK293 a HeLa, z čehož lze vyvodit, že se jedná o metodu využitelnou pro izolaci lysosomálních membrán z širšího spektra buněčných linií, nebo tkání.

## 5 Závěr

Hlavním tématem této práce bylo studium regulačních oblastí genů mutovaných u dvou lysosomálních metabolických chorob – Gaucherovy choroby a MPS IIIC - a zkoumání jejich možného podílu na patogenezi těchto onemocnění.

Podařilo se mi potvrdit existenci alternativního promotoru (P2) genu *GBA*, ze kterého jsou přepisovány transkripty obsahující jeden nebo dva nekódující exony navíc oproti popsané

mRNA. P2 a alternativně sestřižené exony jsou přítomny u primátů. Dále jsem zkoumala, zda je v některých situacích P2 rozdílně využíván. Zjistila jsem, že relativní exprese z P2 i z běžného promotoru P1 byla ve 20 různých tkáních na podobné úrovni, což svědčilo proti tkáňově specifické expresi z P2. Protože hlavním buněčným typem postiženým lysosomálním stříádáním u Gaucherovy choroby jsou buňky makrofágového původu, zkoumala jsem využití P1 a P2 během diferenciaci monocytů na makrofágy *in vitro*. Během diferenciaci dochází ke zvyšování exprese z obou promotorů, ale poměr mezi využitím obou promotorů se nemění, navzdory tomu, že P1 a P2 mají odlišný charakter. P2 neobsahuje TATA box a je asociován s nemetylovaným CpG ostrůvkem, naproti tomu P1 obsahuje TATA box a odpovídá lépe kanonickému *core* promotoru. Výše uvedené studie ukázaly, že poměr exprese z P2 vůči P1 se ve zkoumaných situacích nemění a tak nnesvědčí pro diferenciální využití P2. Zjistila jsem, že výrazně odlišné fenotypové projevy u pacientů se stejným genotypem (homozygoti pro běžnou mutaci N370S) nebyly asociovány s variantami v obou promotorech nebo v nově nalezených exonech.

Popsala jsme promotorový úsek genu *HGSNAT* a charakterizovala oblasti důležité pro regulaci jeho exprese. V sekvenci promotoru jsem identifikovala dvě vazebná místa pro transkripční faktor Sp1, která mají vliv na aktivitu promotoru. Nalezla jsem dva hlavní začátky transkripce, které svědčí o přednostním využívání 1. ATG (downstream ATG). Ověřila jsme, že změny nalezené v sekvenci promotoru u skupiny 23 pacientů s MPS IIIC nemají vliv na expresi *HGSNAT*.

Ve spolupráci se skupinou Prof. Psezhetského jsme studovali myší model MPS IIIC. V této studii jsem se podílela na detekci autofagie v mozku jedinců různého věku. V mozku deficitních myší ve věku 6 měsíců a více bylo detekováno zvýšené množství LC3-II ukazující na zvýšenou autofagii. V neuronech byla pozorována akumulace abnormálních mitochondrií ukazující na poruchu mitofagie, která se pravděpodobně podílí na patogenezi postižení nervových buněk.

Podílela jsem se na optimalizaci metody pro izolaci lysosomálních membrán z tkáňových kultur, která bude využita pro charakterizaci enzymu deficitního u MPS IIIC, N-acetyltransferázy. Výtěžek a čistota lysosomálních membrán izolovaných naší metodou je porovnatelná s jinými metodami, její výhodou pro plánované použití je její jednoduchost a robustnost.

## 6 Použitá literatura

1. Hopwood, J.J., Brooks D. A., *An introduction to the basic science and biology of the lysosome and storage diseases*, in in: *Organelle diseases*, D.J.E. Applegarth D. A., Hall J. G. (eds), Editor 1997: Chapman and Hall Medical, London. p. pp. 7-36.
2. Meikle, P.J., et al., *Prevalence of lysosomal storage disorders*. JAMA, 1999. 281(3): p. 249-54.
3. Poorthuis, B.J., et al., *The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands*. Hum Genet, 1999. 105(1-2): p. 151-6.
4. Lieberman, A.P., et al., *Autophagy in lysosomal storage disorders*. Autophagy, 2012. 8(5): p. 719-30.
5. Ginns, L.C., et al., *Natural killer cell activity in cigarette smokers and asbestos workers*. Am Rev Respir Dis, 1985. 131(6): p. 831-4.
6. Horowitz, M., et al., *The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution*. Genomics, 1989. 4(1): p. 87-96.
7. Moran, D., E. Galperin, and M. Horowitz, *Identification of factors regulating the expression of the human glucocerebrosidase gene*. Gene, 1997. 194(2): p. 201-13.
8. Blech-Hermoni, Y.N., et al., *In silico and functional studies of the regulation of the glucocerebrosidase gene*. Mol Genet Metab, 2010. 99(3): p. 275-82.
9. Reiner, O. and M. Horowitz, *Differential expression of the human glucocerebrosidase-coding gene*. Gene, 1988. 73(2): p. 469-78.
10. Doll, R.F. and F.I. Smith, *Regulation of expression of the gene encoding human acid beta-glucosidase in different cell types*. Gene, 1993. 127(2): p. 255-60.
11. Fan, X., et al., *Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C)*. Am J Hum Genet, 2006. 79(4): p. 738-44.
12. Hrebicek, M., et al., *Mutations in TMEM76\* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome)*. Am J Hum Genet, 2006. 79(5): p. 807-19.
13. Fan, X., et al., *Characterization of the biosynthesis, processing and kinetic mechanism of action of the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC*. PLoS One, 2011. 6(9): p. e24951.
14. Durand, S., et al., *Analysis of the biogenesis of heparan sulfate acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase provides insights into the mechanism underlying its complete deficiency in mucopolysaccharidosis IIIC*. J Biol Chem, 2010. 285(41): p. 31233-42.
15. Feldhammer, M., S. Durand, and A.V. Pshezhetsky, *Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C*. PLoS One, 2009. 4(10): p. e7434.
16. Sardiello, M., et al., *A gene network regulating lysosomal biogenesis and function*. Science, 2009. 325(5939): p. 473-7.
17. Palmieri, M., et al., *Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways*. Hum Mol Genet, 2011. 20(19): p. 3852-66.
18. Gilbert, J.R. and J.M. Vance, *Isolation of genomic DNA from mammalian cells*. Curr Protoc Hum Genet, 2001. Appendix 3: p. Appendix 3B.
19. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. 162(1): p. 156-9.
20. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
21. Kramer, M.F., Coen D.M., *The Polymerase Chain Reaction*, in in: *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K, Editor 1999, John Wiley & Sons, Inc.: New York. p. p. 15.
22. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. 55(4): p. 611-22.
23. Andersen, C.L., J.L. Jensen, and T.F. Orntoft, *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. Cancer Res, 2004. 64(15): p. 5245-50.

24. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol*, 2002. 3(7): p. RESEARCH0034.
25. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
26. Goecks, J., A. Nekrutenko, and J. Taylor, *Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences*. *Genome Biol*, 2010. 11(8): p. R86.
27. Clark, S.J., et al., *High sensitivity mapping of methylated cytosines*. *Nucleic Acids Res*, 1994. 22(15): p. 2990-7.
28. Shenoy, A.R. and S.S. Visweswariah, *Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA*. *Anal Biochem*, 2003. 319(2): p. 335-6.
29. Miyajima, A., et al., *Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5*. *Blood*, 1993. 82(7): p. 1960-74.
30. Graham, J.M., *The identification of subcellular fractions from mammalian cells.*, in *Biomembrane Protocols: Isolation and Analysis, Methods in Molecular Biology*, J.M. Graham, Higgins, J. S., , Editor 1993: Humana Press, Totowa, NJ. p. 1-18.
31. Wenger, D.A., C. Williams *Screening for lysosomal disorders*, in *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: a Laboratory Manual*, Hommes F.A, Editor 1991, Wiley-Liss, New York, NY. p. 587-617.
32. Dell'Antone, P., *Evidence for an ATP-driven "proton pump" in rat liver lysosomes by basic dyes uptake*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979. 86(1): p. 180-9.
33. Suzuki, Y., et al., *Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes*. *Genome Res*, 2001. 11(5): p. 677-84.
34. Preker, P., et al., *RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters*. *Science*, 2008. 322(5909): p. 1851-4.
35. Doll, R.F., A. Bruce, and F.I. Smith, *Regulation of the human acid beta-glucosidase promoter in multiple cell types*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1261(1): p. 57-67.
36. Wei, W., et al., *Functional consequences of bidirectional promoters*. *Trends Genet*, 2011. 27(7): p. 267-76.
37. Phornphutkul, C., et al., *The promoter of a lysosomal membrane transporter gene, CTNS, binds Sp-1, shares sequences with the promoter of an adjacent gene, CARKL, and causes cystinosis if mutated in a critical region*. *Am J Hum Genet*, 2001. 69(4): p. 712-21.
38. Zaid, A., et al., *Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter*. *Eur J Biochem*, 2001. 268(21): p. 5497-503.
39. Zhu, J., et al., *On the nature of human housekeeping genes*. *Trends Genet*, 2008. 24(10): p. 481-4.
40. Brandeis, M., et al., *Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation*. *Nature*, 1994. 371(6496): p. 435-8.
41. Settembre, C., et al., *Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14(5): p. 283-96.
42. Diettrich, O., et al., *Application of magnetic chromatography to the isolation of lysosomes from fibroblasts of patients with lysosomal storage disorders*. *FEBS Lett*, 1998. 441(3): p. 369-72.

## 7 Seznam publikací, které jsou podkladem dizertace

**Svobodová E.**, L. Mrázová, O. Lukšan, D. Elstein, A. Zimran, L. Stolnaya, J. Miks, J. Eberová, L. Dvořáková, M. Jirsa, M. Hřebíček. “Glucocerebrosidase gene has an alternative upstream promoter, which has features and expression characteristic of housekeeping genes.” *Blood Cells Mol Dis.* 46, no. 3 (2011): 239-45. IF 2,351

Mušálková D., J. Lukáš, F. Majer, O. Hřebíček, **E. Svobodová**, L. Kuchař, J. Honzíková, H. Hůlková, J. Ledvinová, M. Hřebíček. “Rapid Isolation of Lysosomal Membranes from Cultured Cells.” *Folia Biologica* 59, no. 1 (2013): 41-6. IF 1,219

Martins C., H. Hůlková, L. Dridy, L. Grigoryeva, Y. Choi, V. Dormoy-Raclet, A. Langford-Smith, F. L. Wilkinson, K. Ohmi, G. DiCristo, E. Hamel, J. Ausseil, D. Cheillan, A. Moreau, **E. Svobodová**, Z. Hájková, M. Tesařová, H. Hansíková, B. Bigger, M. Hřebíček and A. V. Pshezhetsky. “Neuroinflammation, Mitochondrial Defects and Neurodegeneration in MPS IIIC Mouse.” *Ann Neurol.* - v recenzním řízení

**Richtrová E.**, L. Mrázová, O. Lukšan, L. Stolnaya, J. Minks, L. Dvořáková, M. Jirsa, M. Hřebíček. “HGSNAT has a TATA-less promoter with multiple starts of transcription.” *Gene* - podáno