

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH**

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



Autor: **Mgr. Eva Richtrová**

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

**Characterization of promoter regions of *HGSNAT* and *GBA* genes, and a contribution to  
the study of pathogenesis of MPS IIIC and Gaucher disease**

Dizertační práce

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

Místo a rok vypracování: **Praha, 2014**

## 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, 5.5.2014

Eva Richtrová

Podpis

Identifikační záznam:

RICHTROVÁ, Eva. *Charakterizace promotorových oblastí genů HGSNAT a GBA, a příspěvek ke studiu patogeneze MPS IIIC a Gaucherovy choroby. [Characterization of promoter regions of HGSNAT and GBA genes, and a contribution to the study of pathogenesis of MPS IIIC and Gaucher disease]*. Praha, 2014. 151 s. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav dědičných metabolických poruch. Vedoucí práce Hřebíček, Martin.

## 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.

## Klíčová slova

lysosomální dědičná onemocnění, mukopolysacharidóza IIIC, Gaucherova choroba, *GBA*, *HGSNAT*, promotor, transkripční faktor, Sp1, lysosom, lysosomální membrána, autofagie

## 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.

## Keywords

lysosomal storage disorders, mucopolysaccharidosis IIIC, Gaucher disease, *GBA*, *HGSNAT*, promoter, transcription factor, Sp1, lysosome, lysosomal membrane, autophagy

## Poděkování

MUDr. Martinu Hřebíčkoví, Ph.D. - svému školiteli, za odborné vedení mého Ph.D. studia

Ing. Lence Steiner-Mrázové, Ph.D. – za odbornou spolupráci při charakterizaci promotorových oblastí

Mgr. Ondřeji Lukšanovi – za odbornou spolupráci při měření luciferázových esejí

RNDr. Befekadu Asfawovi CSc. – za odbornou spolupráci při kultivaci monocytů

Ing. Ditě Mušálkové – za odbornou spolupráci při izolaci lysosomálních membrán

a dále celému kolektivu ÚDMP za spolupráci, cenné rady a vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Finanční podporu pro projekty zmíněné v této práci poskytly následující grantové agentury a granty: grantová agentura České republiky 303/03/H065, grantová agentura Univerzity Karlovy 99107, 121407, Programy univerzity Karlovy: PRVOUK-P24/LF1/3, SVV2014/260022, grantová agentura Ministerstva zdravotnictví ČR: NT13122-3/2012, NS10342-3 a výzkumný projekt Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021620806.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Lysosomy .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Biogeneze endosomálně lysosomálního systému .....</b>	<b>1</b>
1.2.1	Endocytóza .....	2
1.2.2	Fagocytóza.....	4
1.2.3	Autofagocytóza.....	4
1.2.3.1	Makroautofagie .....	5
1.2.3.2	Mikroautofagie .....	5
1.2.3.3	Chaperony zprostředkovaná autofagie .....	5
1.2.3.4	Regulace autofagie .....	5
1.2.4	Lysosomy jsou zásobárnou $Ca^{2+}$ .....	6
1.2.5	Exocytóza lysosomů .....	6
1.2.6	Proteiny ELS .....	7
1.2.6.1	Transport proteinů do ELS .....	7
1.2.7	Regulace lysosomální biogeneze.....	8
<b>1.3</b>	<b>Izolace lysosomů a lysosomálních membrán .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4</b>	<b>Lysosomální střídatavá onemocnění.....</b>	<b>11</b>
1.4.1	Porucha autofagie u lysosomálních onemocnění.....	13
1.4.2	Poruchy uvolňování $Ca^{2+}$ u lysosomálních onemocnění .....	14
1.4.3	Gaucherova choroba .....	14
1.4.3.1	Gen <i>GBA</i> .....	17
1.4.4	Mukopolysacharidózy .....	18
1.4.4.1	Mukopolysacharidóza IIIC.....	19
1.4.4.1.1	N-acetyltransferáza.....	20
1.4.4.1.2	Gen <i>HGSNAT</i> .....	21
<b>1.5</b>	<b>Promotory .....</b>	<b>22</b>
1.5.1	CpG ostrůvky.....	23
1.5.2	Promotory housekeeping genů .....	24
1.5.3	Alternativní promotory .....	24
<b>2</b>	<b>Cíle a pracovní hypotézy .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Metody.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Obecné metody .....</b>	<b>27</b>
3.1.1	Příprava genomové DNA (gDNA) .....	27
3.1.2	Izolace RNA .....	27
3.1.3	Příprava komplementární DNA (cDNA).....	27
3.1.4	Měření koncentrace DNA a RNA .....	27
3.1.5	Měření koncentrace proteinů .....	27
3.1.6	DNA elektroforéza v agarózovém gelu .....	27
3.1.7	Izolace DNA fragmentů z agarózového gelu .....	28
3.1.8	Klonování DNA a izolace plasmidů .....	28
3.1.9	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	29

3.1.10	Real-time PCR.....	29
3.1.11	Sekvenování .....	29
3.1.12	SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE).....	30
3.1.13	Western blot.....	30
3.1.14	Bioinformatika.....	31
<b>3.2</b>	<b>Metody užívané při identifikaci promotorových oblastí.....</b>	<b>31</b>
3.2.1	Identifikace začátku transkripce .....	31
3.2.2	Nested PCR .....	32
3.2.3	Real-time PCR pro zjištění využití začátků transkripce <i>GBA</i> .....	32
3.2.4	Bisulfitové sekvenování .....	32
3.2.5	Transfekce buněk pro ChIP .....	32
3.2.6	Chromatinová imunoprecipitace (ChIP).....	33
3.2.7	Expres transkriptů z P1 a P2 ve 20 různých tkáních.....	33
<b>3.3</b>	<b>Měření luciferázové aktivity .....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Příprava konstruktů pro reporterovou esej .....	33
3.3.1.1	Cílená mutagenese .....	34
3.3.1.2	Kultivace buněčných kultur pro transfekci .....	34
3.3.1.3	Transfekce a luciferázová esej .....	34
<b>3.4</b>	<b>Metody užívané při kultivaci a diferenciaci monocytů na makrofágy .....</b>	<b>35</b>
3.4.1	Izolace monocytů.....	35
3.4.2	Kultivace monocytů.....	35
3.4.3	Izolace RNA z monocytů a kultivovaných makrofágů .....	36
3.4.4	Real-time PCR pro expresi z P1 a P2 v monocytech a makrofázích.....	36
3.4.5	Real-time PCR pro expresi ACP5, CHIT1, CD68, CD163, CD14 a TFEB.....	36
<b>3.5</b>	<b>Měření enzymových aktivit.....</b>	<b>36</b>
3.5.1	Měření aktivity glukocerebrosidázy .....	36
3.5.2	Měření aktivity chitotriosidázy.....	37
3.5.3	Měření aktivity hexosaminidázy .....	37
3.5.4	Měření aktivity alkalické/kyselé fosfatázy .....	37
3.5.5	Měření aktivity sukcinátdehydrogenázy.....	38
3.5.6	Měření aktivity katalázy .....	38
3.5.7	Měření aktivity NADPH-cytochrom <i>c</i> reduktázy.....	39
<b>3.6</b>	<b>Metody užívané při izolaci lysosomálních membrán .....</b>	<b>39</b>
3.6.1	Homogenizace buněčných linií .....	39
3.6.2	Lýza lysosomů.....	39
3.6.3	Příprava lineárního a krokového gradientu .....	40
3.6.4	Měření změny pH pomocí akridinové oranže .....	40
3.6.5	Western blot.....	40
<b>3.7</b>	<b>Detekce LC3-II.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Gen <i>GBA</i> má alternativní promotor, jehož vlastnosti a expres jsou charakteristické pro housekeeping geny.....</b>	<b>42</b>
4.1.1	Gen <i>GBA</i> má pět transkripčních variant .....	42
4.1.2	Gen <i>GBA</i> má alternativní promotor P2 .....	42

4.1.3	Gen <i>GBA</i> má několik začátků transkripce.....	45
4.1.4	Exprese z P1 a P2 v různých tkáních.....	45
4.1.5	Změny v sekvenci P1, P2 a exonů -1 a -2 u pacientů.....	47
4.1.6	Analýza vazby transkripčních faktorů v P2.....	47
4.1.7	Exprese z P1 a P2 během diferenciacce monocytů na makrofágy.....	48
<b>4.2</b>	<b>Promotor genu <i>HGSNAT</i> neobsahuje TATA box a má několik začátků transkripce.....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Gen <i>HGSNAT</i> má dva hlavní začátky transkripce.....	55
4.2.2	Promotor <i>HGSNAT</i> se nachází v 1054 bp úseku ve směru 3'-5' od exonu 1.....	56
4.2.3	Analýza vazby transkripčních faktorů v promotoru.....	58
4.2.4	Promotor <i>HGSNAT</i> má charakter promotorů housekeeping genů.....	61
4.2.5	Změny v sekvenci <i>HGSNAT</i> promotoru u pacientů.....	61
<b>4.3</b>	<b>Myší model ukazuje MPS IIIC jako neurodegenerativní poruchu s mitochondriální dysfunkcí.....</b>	<b>62</b>
4.3.1	Homozygotní myši mají výrazně sníženou expresi a aktivitu <i>HGSNAT</i> .....	62
4.3.2	Myši s deficitem <i>HGSNAT</i> vykazují postupné změny chování a poruchy učení.....	62
4.3.3	Patologické změny ve tkáních myši s deficitem <i>HGSNAT</i> .....	62
4.3.4	V mozku myši s deficitem <i>HGSNAT</i> dochází ke změnám energetického metabolismu mitochondrií.....	63
4.3.5	Abnormální autofagie v neuronech u myši s deficitem <i>HGSNAT</i> .....	63
4.3.6	Neuroinflamace u myši s deficitem <i>HGSNAT</i> .....	64
<b>4.4</b>	<b>Izolace lysosomálních membrán z kultivovaných buněk.....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Tabulky.....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Publikace a prezentace.....</b>	<b>83</b>
9.1	Seznam publikací.....	83
9.2	Seznam prezentací.....	84
9.3	Svobodová et al., <i>Blood Cells Mol Dis.</i> 2011.....	86
9.4	Mušálková et al., <i>Folia Biologica</i> 2013.....	95
9.5	Martins et al., <i>Ann Neurol.</i> – v recenzním řízení.....	101
9.6	Richtrová et al., <i>Gene.</i> – podáno.....	137



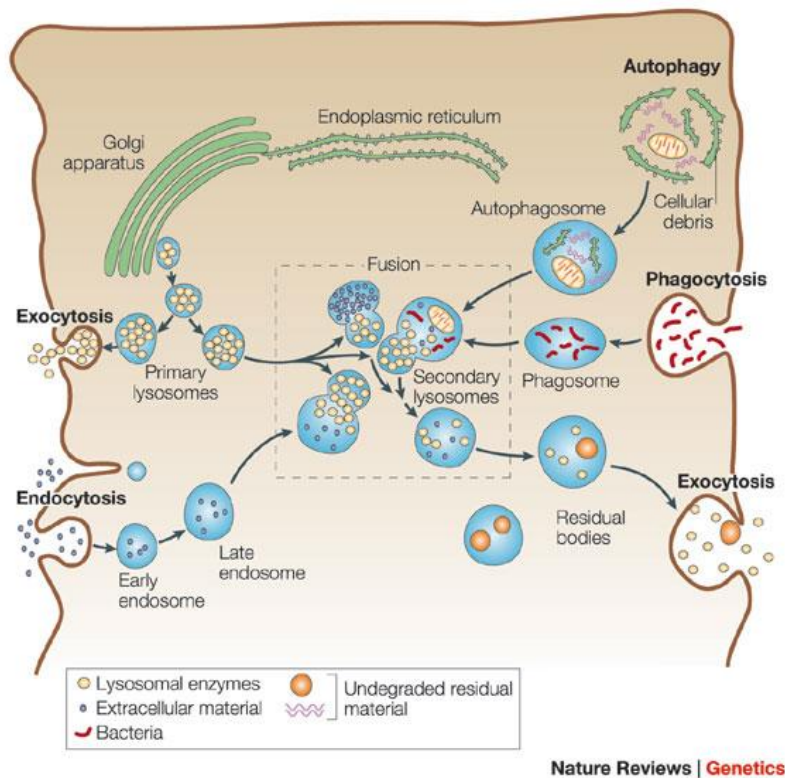
# 1 Úvod

## 1.1 Lysosomy

Lysosomy jsou organely ohraničené jednoduchou membránou, které se vyskytují ve všech savčích buňkách kromě červených krvinek. Zajišťují degradaci a recyklaci buněčného materiálu. Lysosom byl objeven belgickým cytologem Christianem de Duve v roce 1949 kombinací zobrazovacích metod a biochemických měření buněčných frakcí po předchozí diferenciální centrifugaci (De Duve, Pressman et al. 1955), za což mu byla roku 1974 udělena Nobelova cena. Pro lysosomy je charakteristické kyselé pH (4,5 až 5) v lumen, které je udržováno protonovou pumpou, tzv. vakuolární  $H^+$  ATPázou a chloridovým proteinovým kanálem. Kyselé prostředí je nutné pro správné fungování hydrolytických enzymů, které jsou schopné rozkládat jednoduché a komplexní molekuly. Lysosom obsahuje více než 60 hydrolytických enzymů s různou substrátovou specifitou (proteázy, lipázy, nukleázy, glykosidázy, fosfolipázy, fosfatázy a sulfatázy) a více než 100 membránových proteinů.

## 1.2 Biogeneze endosomálně lysosomálního systému

Endosomálně lysosomální systém (ELS) je dynamický membránový systém, který zahrnuje mechanismy zajišťující přísun biologických substrátů určených k degradaci do lysosomu. Samotné označení ELS je z podstaty nepřesné, jelikož odráží pouze jeden (sice kvantitativně nejvýznamnější) ze základních toků substrátů určených k degradaci (Elleder 2010). Substráty pocházejí buď z extracelulárního prostoru, z něhož se do buňky dostávají endocytózou nebo fagocytózou nebo z intracelulárního prostoru autofagocytózou, kdy materiál určený k degradaci pochází z vlastní cytoplasmy (obr. 1.1).



**Obrázek 1.1: Endosomálně lysosomální systém**

Je zodpovědný za štěpení makromolekul vytvořených uvnitř buňky nebo transportovaných z vnějšího prostředí. Většina extracelulárních makromolekul se dostává do buňky endocytózou. Makromolekuly vzniklé uvnitř buňky jsou začleněny do autofagosomů a fúzí s primárními lysosomy procesem zvaným autofagocytóza. Sekundární lysosomy mohou fúzovat s plasmatickou membránou a exocytózou vyloučit naštěpený materiál.

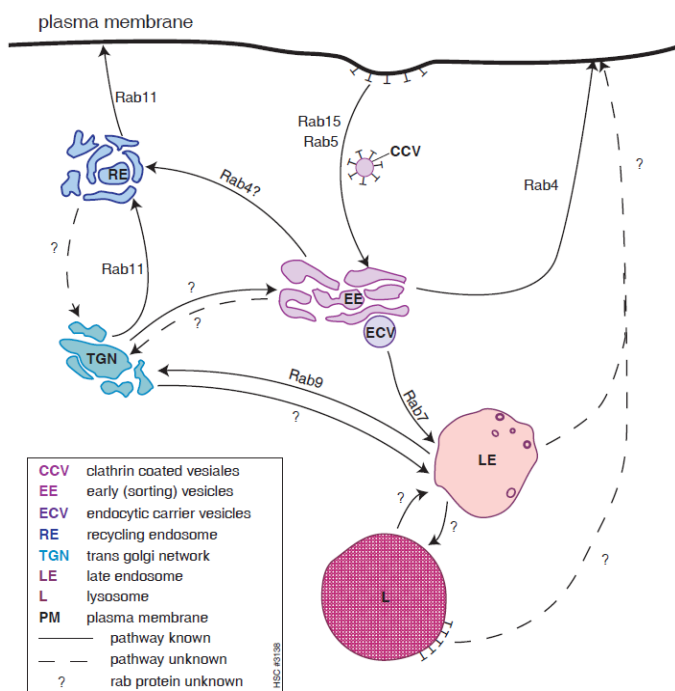
Obrázek převzat z [http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n12/box/nrg963\\_BX1.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v3/n12/box/nrg963_BX1.html)

### 1.2.1 Endocytóza

Endocytóza je komplexní proces, jehož detailní popis přesahuje rámec tohoto textu a který je hlavní dráhou toku substrátů do lysosomu. Při tomto procesu dochází k pohlcení extracelulárních látek invaginací cytoplazmatické membrány. Probíhá ve všech eukaryotních buňkách (Saftig and Klumperman 2009). Endocytované molekuly jsou přeneseny z extracelulárního prostoru v opláštěných váčcích do časných endosomů (early endosome, EE). V tzv. třídícím endosomu (sorting endosome) dochází ke třídění endocytovaného materiálu určeného pro recyklaci, jako jsou například některé receptory, nebo k degradaci. Je tvořen vakuolární a tubulární částí, materiál určený pro recyklaci vstupuje do tubulární části a dále do tzv. recyklačního endosomu (recycling endosome) nebo přímo k povrchu buňky (Lemmon and Traub 2000). Mírně kyselé pH (6,0 – 6,2) uvnitř EE způsobuje disociaci komplexu ligand-receptor v případě receptorem zprostředkované endocytózy, receptory jsou

recyklovány zpět do plazmatické membrány. Materiál určený k degradaci, který míří do lysosomu, zůstává ve vakuolární části a z EE je transportován do pozdních endosomů (late endosome, LE) ve formě endosomálních transportních váčků, které pučí z EE, tzv. multivezikulárních tělísek. V LE dochází ke zrání a poklesu pH na 5,5 - 6,0, při kterém probíhá hydrolytické štěpení makromolekul hydrolázami s kyselým pH optimem. Maturací LE vznikají lysosomy, jejichž nízké pH (4,5 - 5,0) je optimální pro aktivitu lysosomálních hydroláz (Ungewickell and Hinrichsen 2007).

Membránového transportu se účastní Rab proteiny, což jsou malé GTPázy neboli G-proteiny, jejich aktivita je regulována vazbou GTP a hydrolýzou. Rab proteiny jsou důležité pro cílení vezikul do jednotlivých membránových kompartmentů (obr. 1.2). Lidské buňky obsahují více než 60 Rab proteinů, nacházejí se v organelách zapojených do sekreční a endocytické kaskády (Stenmark and Olkkonen 2001). Pouze u malé části známých Rab proteinů byla detailně popsána jejich funkce. Podílejí se na regulaci membránového transportu včetně tvorby váčků, jejich pohybu po aktinových a tubulinových vláknech a fúzi s cílovou membránou (obr. 1.2) (Somsel Rodman and Wandinger-Ness 2000).



### Obrázek 1.2: Rab proteiny se účastní regulace endocytózy

Rab 4 reguluje třídění endocytovaného materiálu v EE a řídí jeho recyklaci směrem k plazmatické membráně, Rab 5 se účastní fúze EE, Rab 7 kontroluje transport z EE do LE, Rab 9 z LE do trans-Golgi, Rab 11 z Golgiho aparátu přes tzv. recycling endosome k plazmatické membráně. Obrázek převzat z Somsel Rodman a Wandinger-Ness, 2000 (Somsel Rodman and Wandinger-Ness 2000).

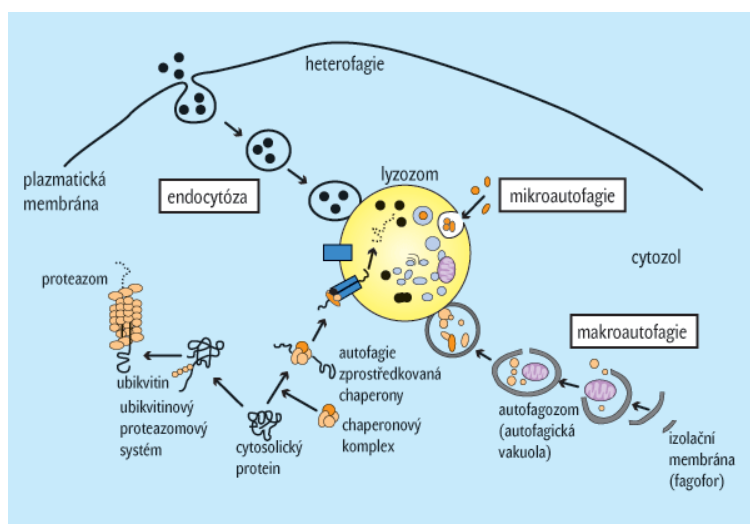
Endocytóza některých receptorů může být závislá na ubikvitinylaci jako mechanismus pro regulaci jejich množství na membráně. Na rozdíl od polyubikvitinylace, která je charakteristická pro značení proteinů určených k degradaci v proteasomu, jsou membránové proteiny určené k endocytóze mono či multiubikvitinylovány. Navázání ubikvitinu je signálem pro jejich endocytózu.

### 1.2.2 Fagocytóza

Fagocytóza je proces pohlcení a degradace větších molekul. Fagocytující buňky (např. neutrofilní granulocyty, makrofágy a dendritické buňky) pohlcují větší částice jako například bakterie za vzniku fagosomu. Fagosom fúzuje s LE a vzniká fagolysosom, jehož enzymy mohou štěpit extracelulární molekuly (Stuart and Ezekowitz 2008).

### 1.2.3 Autofagocytóza

Autofagocytóza neboli autofagie je buněčný katabolický proces, který závisí na spolupráci autofagosomů a lysosomů. Je vyvolána stresovými podmínkami jako hladovění, oxidativní stres, vystavení toxickým látkám a mikrobiální infekce (Mizushima 2008). Autofagie funguje i za nepatologických stavů při nahromadění poškozených nebo nadbytečných buněčných organel či proteinů (Cuervo, Bergamini et al. 2005). V současnosti existují tři základní molekulární varianty autofagie – makroautofagie, mikroautofagie a chaperony zprostředkovaná autofagie (obr. 1.3).



**Obrázek 1.3: Typy autofagie**

Při makroautofagii se vytváří autofagolysosom splynutím autofagosomu s lysosomem, ve kterém probíhá vlastní degradace. Při mikroautofagii dochází k uzavření degradovaného materiálu vchlípením lysosomální membrány. Autofagie zprostředkovaná chaperony selektivně vybírá proteiny se specifickým motivem, který je směruje do lysosomů. Obrázek převzat z [http://www.vesmir.cz/files/obr/nazev/2011\\_041\\_02:gif/type/html](http://www.vesmir.cz/files/obr/nazev/2011_041_02:gif/type/html)

### **1.2.3.1 Makroautofagie**

Makroautofagie je proces, při kterém jsou poškozené organely nebo úseky cytoplazmy ohraničeny dvojitou membránou za vzniku autofagosomu, který fúzuje s lysosomem a vzniká autofagolysosom. Zde kyselé lysosomální hydrolázy rozštěpí nahromaděný materiál, jehož produkty mohou být recyklovány pasivní difuzí nebo specifickým transmembránovým transportem (Glick, Barth et al. 2010). Protein LC3 (microtubule-associated protein light chain 3), který se podílí na transportu a zrání autofagosomů slouží zároveň jako marker pro monitorování autofagie. Za normálních okolností se nachází v cytozolu jako forma LC3-I, v případě indukce autofagie je forma LC3-I proteolyticky štěpena a konjugována s fosfatidyletanolaminem za vzniku konjugované formy LC3-II, která je začleněna do rostoucí autofagosomální membrány. Přeměna LC3-I na LC3-II, kterou lze detekovat technikou Western blot, je jednou z nejpoužívanějších metod pro detekci přítomnosti autofagie (Mizushima, Yoshimori et al. 2010; Klionsky, Abdalla et al. 2012). Množství konjugované formy nemusí plně odpovídat aktivitě autofagického procesu, protože LC3-II je po vzniku autofagolysosomu odbouráván.

### **1.2.3.2 Mikroautofagie**

Při mikroautofagii dochází přímo k obklopení malých organel např. peroxisomů či částí cytoplazmy lysosomální membránou. Invaginovaný materiál je uvnitř lysosomu degradován (Mijaljica, Prescott et al. 2011).

### **1.2.3.3 Chaperony zprostředkovaná autofagie**

Chaperony zprostředkovaná autofagie je specifická pro cytozolové proteiny obsahující ve své struktuře signální motiv Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ), který je rozpoznán chaperonovým proteinem Hsc70 a ly-Hsc70 a umožní interakci s lysosomálním membránovým proteinem typu 2A (LAMP2A). Ten umožní translokaci proteinu do lumen lysosomu, kde je následně degradován (Dice 2007).

### **1.2.3.4 Regulace autofagie**

Regulace autofagie je velmi složitý proces, jehož detailní popis zde nebude uveden. Jedním z klíčových mechanismů je regulace zprostředkovaná aktivitou kinázy mTOR (mammalian target of rapamycin), která zapíná nebo vypíná autofagické dráhy podle nutričního stavu buněk. Autofagie je regulována signalizací  $\text{Ca}^{2+}$ . AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK) je aktivována přes  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependentní kinázu  $\beta$  (CaMKK- $\beta$ ) a inhibuje aktivitu

mTOR, která se podílí na vytvoření proteinového komplexu mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), což je hlavní negativní regulátor autofagie (Hoyer-Hansen, Bastholm et al. 2007).

#### **1.2.4 Lysosomy jsou zásobárnou $\text{Ca}^{2+}$**

$\text{Ca}^{2+}$  se účastní důležitých signalizačních procesů v buňce. Signály jsou řízeny vyplavením  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních organel jako endoplazmatické retikulum (ER) nebo kanály v plazmatické membráně, kterými se  $\text{Ca}^{2+}$  dostává do buňky z extracelulárního prostředí. V nedávné době se ukázalo, že lysosomy a pozdní endosomy také patří mezi významné intracelulární zásobárny kalciových iontů. Specifickým signálem pro uvolnění kalciových iontů z kyselého kompartmentu je adenin dinukleotid fosfát kyseliny nikotinové (NAADP). NAADP umožňuje transport  $\text{Ca}^{2+}$  z kyselých organel - lysosomů a pozdních endosomů pomocí iontových kanálů (TPC, two pore channel) tvořených NAADP receptory (NAADPR) (Churchill, Okada et al. 2002). Existují tři isoformy TPC. TPC1 a TPC3 je exprimován na endosomální membráně, TPC2 na lysosomální. TPC2 zprostředkovává odpověď NAADP a umožňuje uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z lysosomu, což spouští další  $\text{Ca}^{2+}$  signály přes sarkoplazmatické retikulum (SR) a ER (Calcraft, Ruas et al. 2009). U člověka se nachází pouze TPC1 a TPC2 (Patel, Marchant et al. 2010).

#### **1.2.5 Exocytóza lysosomů**

Exocytóza lysosomů je proces, při kterém lysosomy vylučují svůj obsah do extracelulárního prostoru. Hraje důležitou roli při sekreci a opravě plazmatické membrány. Je regulována transkripčním faktorem EB (TFEB) (Sardiello, Palmieri et al. 2009), zvýšená exprese TFEB způsobuje uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z lysosomu skrz iontový kanál mukolipin 1 (MCOLN1) a zvýšenou pohyblivost lysosomů. TFEB reguluje gen kódující MCOLN1 (Medina, Fraldi et al. 2011).

Podle mechanismu vyloučení biomolekul do extracelulárního prostředí rozlišujeme exocytózu konstitutivní a regulovanou. Konstitutivní exocytóza není spouštěná signály  $\text{Ca}^{2+}$ , umožňuje vyloučení komponent extracelulární matrix a začlenění nově syntetizovaných proteinů do plazmatické membrány. Regulovanou exocytózu spouští  $\text{Ca}^{2+}$ , je důležitá pro signalizaci mezi neurony (Keller, Sanderson et al. 2006). Dalším mechanismem exocytózy je fúze multivezikulárních tělísek (MVB) s plazmatickou membránou a následné vyloučení obsahu do extracelulárního prostoru. MVB jsou sférické endosomální organely, které obsahují malé váčky vzniklé pučením membrány směrem dovnitř do lumen LE (Gruenberg and Stenmark 2004). MVB můžou fúzovat s lysosomy a odbourávat tak svůj intraluminální obsah nebo

fúzují s plazmatickou membránou a vylučují malé váčky do extracelulárního prostředí. Tyto váčky se nazývají exosomy (Denzer, Kleijmeer et al. 2000). Fúze MVB s plazmatickou membránou vyžaduje přítomnost specifických receptorových proteinů SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors). Vezikulární SNAREs (v-SNAREs) se nacházejí na MVB a interagují s cílovými SNAREs (t-SNAREs) na intracelulární straně membrány (Chaineau, Danglot et al. 2009). Exosomy zprostředkovávají buněčnou komunikaci, imunitní odpověď a ovlivňují mnoho signalizačních drah. Biogeneze exosomů a mechanismus jejich sekrece nebyl dosud zcela objasněn.

### **1.2.6 Proteiny ELS**

Proteiny ELS lze rozdělit na luminální, mezi něž patří lysosomální hydrolázy a membránové, jejichž deficity také mohou vést k lysosomálním onemocněním, přestože většina z nich nemá katalytickou funkci. Nejvíce zastoupené membránové proteiny jsou lysosomálně asociované membránové proteiny (LAMP1 a 2) a lysosomální integrální membránové proteiny (LIMP). Jsou vysoce glykosylované, což je chrání před degradací luminálními hydrolázami (Schroder, Wrocklage et al. 2010). Funkce velké části těchto proteinů není známa.

#### **1.2.6.1 Transport proteinů do ELS**

Lysosomální enzymy jsou syntetizovány na ribosomech drsného ER. V ER se začínají sbalovat pomocí chaperonových proteinů a jsou transportovány v opláštěných váčcích do Golgiho aparátu (GA), zde jsou glykosylovány. Po výstupu z trans-Golgi cisterny se proteiny vezikulárním transportem dostávají do LE. Většina solubilních proteinů nese na N-konci oligosacharidové řetězce s vysokým obsahem manosy, které jsou nutné při posttranslačních modifikacích, kdy dochází k vytvoření rozpoznávacího markeru pro cílení do lysosomu manosy-6-fosfátu (M6P). M6P vzniká v ER ve dvou po sobě jdoucích krocích, v prvním kroku jsou lysosomální enzymy fosforylovány N-acetylglukosamin-1-fosfátem na C6-hydroxylových skupinách manosových zbytků. Reakci katalyzuje enzym UDP-N-acetylglukosamin-1-fosfotransferáza. V dalším kroku dojde k odštěpení N-acetylglukosaminu enzymem N-acetylglukosamin-1-fosfodiester –  $\alpha$ -N-acetylglukosaminidázou a dojde tak k odhalení M6P, který je rozpoznán M6P receptorem (M6PR) v membráně trans-Golgi aparátu. Existují dva typy M6PR, které se liší vazebnými vlastnostmi. První receptor je kation nezávislý (CI-M6PR), má molekulovou hmotnost 300 kDa, vazba ligandu nezávisí na divalentních kationtech, je schopný navázat ligand i při neutrálním pH. Druhý receptor je kation závislý (CD-M6PR), má molekulovou hmotnost 46 kDa, pro vazbu ligandu vyžaduje

přítomnost divalentních kationtů. Většina lysosomálních enzymů obsahuje více M6Ps, což zvyšuje afinitu pro M6PR. M6PRs vážou lysosomální proteiny na luminální straně trans-Golgi cisterny. Tyto proteinové komplexy se transportními váčky dostávají do LE, kde dojde vlivem nízkého pH k disociaci proteinů a M6PRs. Lysosomální enzymy jsou defosforylovány a receptory jsou recyklovány zpět do GA nebo na cytoplazmatickou membránu. CI-M6PR na cytoplazmatické membráně umožňuje vazbu proteinů s M6P, které unikly vazbě na receptor v trans-Golgi aparátu a vyloučily se do extracelulárního prostoru. Umožňuje jejich transport do lysosomu receptorem zprostředkovanou endocytózou. Tato tzv. „scavenger pathway“, která umožňuje internalizaci proteinů nesoucích M6P, je klíčová pro enzymovou substituční terapii.

Selektivní transport některých lysosomálních proteinů z trans-Golgi aparátu do lysosomu se uskutečňuje i nezávisle na M6PR. Prostřednictvím intracelulárního receptoru sortilinu dochází k transportu prosaposinu, což je prekurzor lysosomálních saposinů A – D, kyselá sfingomyelináza, GM2 aktivátorového proteinu a katepsinů A a H (Lefrancois, Zeng et al. 2003; Ni and Morales 2006).  $\beta$ -glukocerebrosidáza využívá LIMP2 jako receptor k transportu do LE. LIMP2 váže  $\beta$ -glukocerebrosidázu v ER a směřuje ji do lysosomu (Reczek, Schwake et al. 2007).

Lysosomální membránové proteiny (LMPs) jsou z trans-Golgi aparátu transportovány nezávisle na M6P. Do LE jsou cíleny prostřednictvím tyrosinových a dileucinových motivů na C-koncích orientovaných do cytozolu. Tyto motivy jsou rozpoznávány komplexem adaptorových proteinů - čtyř heterotetramerních (AP1-4) a tří monomerních (GGA1-3), které řídí transport membránových proteinů do LE (Braulke and Bonifacino 2009). Tímto způsobem se do lysosomu dostávají i transmembránové transportní proteiny cystinosin a sialin (Cherqui, Kalatzis et al. 2001).

### **1.2.7 Regulace lysosomální biogeneze**

Produkce lysosomálních enzymů je regulována na úrovni transkripce transkripčním faktorem EB (TFEB) (Sardiello, Palmieri et al. 2009). V promotorech většiny lysosomálních genů byla nalezena 10 bp palindromická sekvence GTCACGTGAC nazvaná CLEAR (*Coordinated Lysosomal Expression and Regulation*). U většiny promotorů se CLEAR motiv nachází v blízkosti začátku transkripce, -300 až +100 bp od 5' konce genů (Palmieri, Impey et al. 2011). Na tuto sekvenci se váže TFEB a pozitivně reguluje expresi lysosomálních genů. Zvýšená

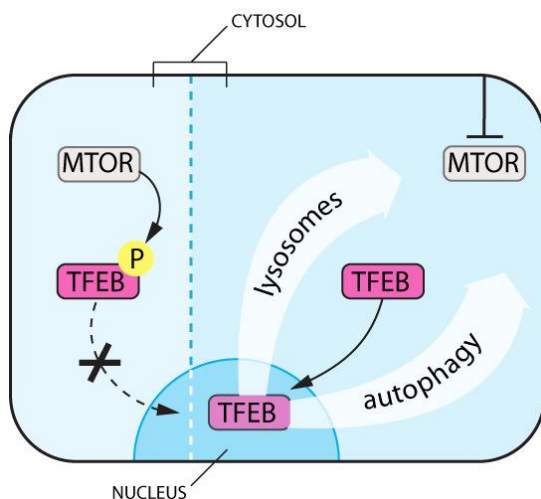


exprese TFEB v buňkách zvyšuje syntézu lysosomálních proteinů a schopnost buňky odbourávat komplexní molekuly a patogenní proteiny.

Další procesy spojené s lysosomy jako je exocytóza a autofagie jsou regulovány stejným mechanismem. Zvýšená exprese TFEB v různých buňkách vedla k výraznému zvýšení počtu autofagosomů (Settembre, Di Malta et al. 2011).

TFEB se za normálních podmínek nachází v cytoplazmě a při nedostatku živin či špatném fungování lysosomu je translokován do jádra (Sardiello, Palmieri et al. 2009). Translokace je regulována fosforylací, fosforylovaná forma TFEB se nachází v cytoplazmě, zatímco defosforylovaná v jádře. Na fosforylaci se mohou podílet nejméně tři různé kinázy: ERK2 (extracelulární regulační kináza 2), mTORC1 (mammalian target of rapamycin) a PKC $\beta$  (protein kináza C $\beta$ ) (Cea, Cagnetta et al. 2012; Settembre, Zoncu et al. 2012; Ferron, Settembre et al. 2013). Aktivita těchto kináz závisí na množství živin. Při dostatečném množství živin jsou kinázy aktivní a fosforylují TFEB, který zůstává v cytoplazmě. V podmínkách s nedostatkem živin není TFEB fosforylován a může translokovat do jádra a regulovat expresi genů podílejících se na lysosomální biogenezi (Settembre, Di Malta et al. 2011) (obr. 1.4).

TFEB reaguje na nedostatek živin autoregulačním zpětnovazebným mechanismem, kdy se váže na vlastní promotor a spouští svoji vlastní transkripci (Settembre, De Cegli et al. 2013). 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 (Palmieri, Impey et al. 2011). Účastní se předávání signálu z lysosomu do jádra ke spouštění transkripce. V budoucnu by mohl sloužit jako terapeutický nástroj pro zesílení odpovědi na patogenní stádání v LSDs a neurodegenerativních chorobách. Aktivovaný TFEB podporuje exocytózu a mohl by umožnit vyloučení nastřádaného materiálu ven z buňky (Settembre, Fraldi et al. 2013). V myším modelu Pompeho choroby a v tkáňových kulturách svalových buněk vedla zvýšená exprese TFEB ve svalových buňkách k redukci nastřádaného glykogenu v lysosomech a zmenšení lysosomů v důsledku zvýšené aktivity exocytózy a autofagocytózy (Spampanato, Feeney et al. 2013).



**Obrázek 1.4: mTOR inhibuje autofagii přes fosforylaci TFEB**

Obrázek převzat z <http://scillustrations.wordpress.com/2012/06/26/mTOR-blocks-autophagy-via-phosphorylation-of-tfeb/>

### 1.3 Izolace lysosomů a lysosomálních membrán

Lysosomy jsou široce studované orgány, většina biochemických a strukturálních analýz lysosomů byla provedena na krysích játrech, ze kterých lze získat vysoce obohacený koncentrát lysosomů. Lysosomy byly izolovány z řady jiných tkání a buněčných linií s variabilní čistotou a výtěžkem (Graham 2009).

Některá lysosomální stádava onemocnění jsou způsobena deficitem lysosomálních membránových proteinů, izolace lysosomálních membrán je tak důležitá pro další proteomické a biochemické studie (Schroder, Elsasser et al. 2007; Schroder, Wrocklage et al. 2007; Callahan, Bagshaw et al. 2009) nebo pro následnou purifikaci lysosomálních membránových proteinů (Meikle, Whittle et al. 1995; Taute, Watzig et al. 2002).

Lysosomy jsou purifikovány obvykle z lehké mitochondriální frakce pomocí různých gradientů s denzitními médii jako je sacharóza, Percoll, Nycodenz či iodixanol.

Lysosomy, mitochondrie a peroxisomy mají podobné a částečně se překrývající denzity v sacharózovém gradientu, což činí jejich separaci založenou na denzitě velmi obtížnou. Intracelulární orgány včetně lysosomů jsou osmoticky aktivní a denzity potřebné pro separaci lysosomů lze dosáhnout pouze v hyperosmolárních roztocích sacharózy, což činí sacharózu nevhodným médiem pro některé aplikace. Proto se dnes více využívají ostatní již zmíněná denzitní média, u kterých lze osmolaritu lépe kontrolovat a dosáhnout izoosmolárních podmínek. Artificiální změna denzity lysosomů může výrazně zlepšit jejich

separaci od dalších organel v gradientech (Graham 2009). Toho bylo dosaženo například při purifikaci lysosomů izolovaných z různých zvířecích tkání, kdy došlo ke změně denzity lysosomů pomocí injektování experimentálních zvířat Tritonem WR1339 (Leighton, Poole et al. 1968) nebo dextranem (Arai, Kanaseki et al. 1991). Je však známo, že produkované lysosomy mají abnormální vlastnosti včetně atypického obsahu enzymů (Wattiaux 1983). V Nycodenzovém či iodixanolovém gradientu mají lysosomy menší hustotu než mitochondrie a peroxisomy, zatímco v Percollovém jsou více denzní. Pro lepší separaci lysosomů je také využívána změna denzity jiných organel. Mitochondrie se v přítomnosti vápenatých iontů zvětšují a snižují svoji hustotu, přidáním  $\text{CaCl}_2$  v milimolární koncentraci k postnukleárnímu supernatantu dochází k výraznému zlepšení jejich separace od lysosomů v Percollovém gradientu (Arai, Kanaseki et al. 1991).

Lysosomální membrány byly úspěšně izolovány magnetickou chromatografií, kultivované fibroblasty byly inkubovány s magnetickými nanočásticemi magnetit/dextran. Lysosomy, které endocytózou přijaly tyto částice, zůstaly zachyceny na magnetické koloně a následně byly hypotonickou lýzou lysosomů získány lysosomální membrány (Diettrich, Mills et al. 1998).

#### **1.4 Lysosomální střádavá onemocnění**

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. Většinou se jedná o deficit enzymu kyselé hydrolázy v lysosomech, který umožňuje postupné štěpení velkých komplexních molekul na molekuly jednodušší, ale některá onemocnění např. Niemann-Pickova choroba typu C1 a C2 (Carstea, Morris et al. 1997; Naureckiene, Sleat et al. 2000), mukolipidóza II (Kudo, Bao et al. 2005), mukolipidóza IV (Bassi, Manzoni et al. 2000) nebo Danonova choroba (Nishino, Fu et al. 2000) jsou způsobena deficitem jiných lysosomálních i nelysosomálních proteinů včetně enzymů a membránových proteinů klíčových pro správnou funkci ELS.

LSDs jsou členěny do skupin podle biochemických vlastností neodbouraného materiálu na lipidózy, mukopolysacharidózy, glykoproteinózy, glykogenózy a další (Hopwood 1997).

Mnoho LSDs bylo poprvé popsáno ještě před objevením lysosomu, ale pojem LSD byl poprvé použit až při objevu Pompeho choroby (Hers 1963). Jedná se o vzácná onemocnění,

ale sumárně se v populaci vyskytují s frekvencí 1:7000 živě narozených dětí (Meikle, Hopwood et al. 1999; Poorthuis, Wevers et al. 1999). U některých etnických skupin je incidence vyšší. LSDs 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 dřeň, játra, kosti, kosterní svaly, myokard, CNS. Většina LSDs je autozomálně recesivní, výjimkou je Fabryho choroba (Masson, Cisse et al. 2004), mukopolysacharidóza typu II (Hopwood, Bunge et al. 1993) a Danonova choroba (Nishino, Fu et al. 2000) s dědičností gonozomálně recesivní a Kufsova choroba s dědičností autozomálně dominantní (Noskova, Stranecky et al. 2011).

Lysosomální proteiny se mohou dostat do lysosomu z extracelulárního prostředí pomocí receptorem zprostředkované endocytózy. Enzymová substituční terapie (ERT) umožňuje touto cestou doručit funkční enzym do lysosomu, který je pak schopen štěpit neodbouraný substrát.

Tato terapie zlepšuje klinické příznaky onemocnění, ale pouze u chorob nepostihujících CNS, neboť rekombinantní proteiny z oběhu nejsou transportovány do buněk v CNS přes hematoencefalickou bariéru. V současnosti se ERT používá pro léčbu pacientů s Gaucherovou chorobou (Grabowski, Barton et al. 1995), Fabryho chorobou (Clarke and Iwanochko 2005), Pompeho chorobou (Kishnani, Corzo et al. 2007), MPS I (Wraith, Clarke et al. 2004), MPSII (Muenzer, Gucsavas-Calikoglu et al. 2007) a MPS VI (Giugliani, Harmatz et al. 2007), u řady dalších LSDs probíhají klinické studie.

Substrát redukční terapie (SRT) zlepšuje klinické příznaky LSDs snížením celkového množství substrátu pomocí inhibice jeho syntézy v těle. Tato terapie funguje nejlépe u pacientů s reziduální aktivitou mutovaného enzymu.

Další možností léčby je transplantace kostní dřeně, která umožňuje nahradit chybějící enzym dlouhodobě, ale vzhledem k nedostatku vhodných dárců a komplikacím spojených s vysokou mortalitou se provádí méně často. Na rozdíl od ERT může ovlivnit postižení CNS.

Cílem léčby pomocí farmakologických chaperonů je napomoci správnému sbalení mutovaného proteinu a tak zlepšit jeho stabilitu a předejít jeho buněčné degradaci mechanismy rozpoznávajícími špatně sbalené proteiny. Farmakologické chaperony jsou nízkomolekulární látky, které se specificky vážou do aktivního místa mutovaného enzymu v ER, zde mu pomohou zaujmout správnou terciální strukturu a umožní jeho transport do lysosomu, kde může při zachované reziduální aktivitě plnit svou funkci. Jejich malá

molekulová hmotnost jim umožňuje proniknout přes hematoencefalickou bariéru a může tak být účinná pro léčbu LSDs i s neurologickými symptomy (Kolter and Wendeler 2003). V současné době je tato terapie u některých LSDs ve fázi klinického testování.

Ve fázi preklinického testování je také genová terapie. Soustředí se především na hledání vhodných vektorů a rozvoj metod pro vnesení normální genetické informace (funkčního genu) do deficitních buněk, což by zajistilo správnou produkci enzymu. Cílem terapie je léčba pacientů jak bez neurologických příznaků tak i neurologických forem (Barranger and Novelli 2001; Cheng and Smith 2003).

#### **1.4.1 Porucha autofagie u lysosomálních onemocnění**

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 strádavých molekul. U většiny případů bylo zaznamenáno zvýšení autofagie způsobené hromaděním polyubikvitinylovaných proteinů a nefunkčních mitochondrií (Lieberman, Puertollano et al. 2012).

Porucha autofagie se může podílet na patologickém hromaděni špatně odbouratelných proteinů v neuronech u LSDs. Akumulace proteinů je příčinou častých neurodegenerativních chorob jako Alzheimerova, Parkinsonova či Huntingtonova choroba, se kterými LSDs sdílí některé neuropatologické rysy a u kterých bývá také popisována porucha autofagie (Settembre, Fraldi et al. 2008).

Danonova choroba způsobená deficitem LAMP2 byla první LSD, u které byla popsána porucha autofagie. Bylo pozorováno masivní hromaděni autofagických vakuol v některých tkáních včetně jater, pankreatu, sleziny, ledviny a kosterního a srdečního svalů (Tanaka, Guhde et al. 2000). LAMP2 je receptor v lysosomální membráně, který je nezbytný pro fúzi lysosomu s autofagosomem. Akumulace autofagických vakuol bohatých na glykogen vedla původně k podezření, že Danonova choroba je formou lysosomální glykogenózy.

Mitofagie, selektivní autofagie mitochondrií, je důležitá pro odbourávání poškozených mitochondrií, například v nervové tkáni. Porucha mitofagie hraje důležitou roli v patobiologii neurodegenerativních chorob jako je Parkinsonova choroba. Mitofagie se účastní protein parkin, který je součástí proteinového komplexu E3 ubikvitin-ligázy, z cytozolu se dostává do depolarizovaných mitochondrií určených k degradaci autofagií (Narendra, Tanaka et al.

2008). Tuto translokaci zprostředkovává kináza PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1), je začleněna do vnitřní mitochondriální membrány, kde je za normálních podmínek degradována mitochondriálními proteázami, zatímco u poškozených mitochondrií dochází ke ztrátě membránového potenciálu a PINK1 se dostává do vnější mitochondriální membrány, kde fosforyluje mitochondriální proteiny, čímž usnadňuje jejich ubikvitinylaci, které se účastní parkin a následnou degradaci (Aki, Funakoshi et al. 2013). Způsob, kterým parkin rozpoznává PINK1 není zcela objasněn. Parkin a PINK1 jsou klíčové elementy nutné pro degradaci poškozených mitochondrií, jejich mutace vedou k akumulaci poškozených mitochondrií a rozvoji neurodegenerace a Parkinsonovy choroby (Vives-Bauza, de Vries et al. 2010).

#### **1.4.2 Poruchy uvolňování $\text{Ca}^{2+}$ u lysosomálních onemocnění**

U Niemann-Pickovy choroby typu C (NPC) je na rozdíl od jiných sfingolipidóz udržována normální koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v ER a mitochondriích a značně snižena v LE a lysosomech. NPC1 mutantní buňky snižují množství  $\text{Ca}^{2+}$  v pozdních endosomech a lysosomech, je to zřejmě způsobeno primárním strádáním sfingosinu, který inhibuje  $\text{Ca}^{2+}$  kanál (PKC). Úbytek  $\text{Ca}^{2+}$  v LE a lysosomech inhibuje endocytické dráhy, což má za následek sekundární hromadění cholesterolu, sfingomyelinu a glykosfingolipidů v těchto organelách. In vitro zvýšením cytozolového  $\text{Ca}^{2+}$  dochází ke zlepšení fenotypu NPC1 mutantních buněk (Lloyd-Evans, Morgan et al. 2008).

#### **1.4.3 Gaucherova choroba**

Gaucherova choroba (GD) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené deficitem lysosomálního enzymu glukocerebrosidázy (nazývaného také glukosylceramidáza nebo kyselá  $\beta$ -glukosidáza).

GD poprvé popsal v roce 1882 student medicíny Philippe Gaucher u pacientky se zvětšenou slezinou (Gaucher 1882), kde se domníval, že se jedná o nádor. Až po mnoha letech se zjistilo, že ke strádání neodbouraného materiálu v makrofázích dochází v důsledku mutací enzymu glukocerebrosidázy ( $\beta$ -Gluc) (Brady, Kanfer et al. 1965). Tento enzym je odpovědný za štěpení glykolipidu relativně hojného v membránách – glukosylceramidu (glukocerebrosidu) na glukózu a ceramid. Glukosylceramid se hromadí přednostně v lysosomech cirkulujících nebo tkáňových makrofágů - tzv. Gaucherových buňkách, ty postupně nahrazují zdravé buňky, především v játrech, slezině a kostní dřeni, mohou se však hromadit i v jiných částech těla. Gaucherovy buňky mají charakteristickou morfologii, s cytoplazmou připomínající zmačkaný papír.

Onemocnění se vyskytuje u všech etnik s incidencí zhruba 1 : 60 000, častější incidence je v populaci tzv. Aškenázských židů, kde je uváděna četnost výskytu 1 : 850 (Meikle and Hopwood 2003). Jsou popsány tři formy choroby, adultní forma (1. typ) je nejčastější, nepostihuje mozek ani nervový systém. Nejčastějším znakem je zvětšení sleziny, jater, bolesti dlouhých kostí, chudokrevnost, někdy i projevy krvácivosti do kůže a podkoží. Ne u všech pacientů se příznaky vyvinou, existuje velká fenotypová variabilita i u pacientů se stejným genotypem. Infantilní forma (2. typ) je vzácnější a mnohem závažnější. Objevuje se už v kojeneckém věku, zpočátku nenápadnými projevy - neprospíváním, šilháním, abnormálními očními pohyby a později neurologickými problémy se zástavou psychomotorického vývoje. Většina dětí umírá do druhého roku života. Juvenilní forma (3. typ) je také vzácná, začíná v batolecím nebo ve školním věku. Je pro ni charakteristická variabilní, často velká visceromegalie a chronické zhoršování neurologických obtíží. Typickým příznakem jsou abnormální oční pohyby (okulomotorická apraxie), mohou se vyskytnout křeče a pomalu postupující mentální deficit. Většina pacientů se dožívá dospělosti. Zvláštní formou 3. typu je takzvaný Norbottenský typ Gaucherovy choroby (Norbottonian type), který byl popsán v populačním izolátu v severním Švédsku. Pro pacienty je charakteristický začátek v adolescenci a pomalá progresse onemocnění, malá hepatosplenomegalie a pomalu postupující mentální deficit. Všichni pacienti z tohoto populačního izolátu jsou homozygoty pro mutaci L444P (Tylki-Szymanska, Keddache et al. 2006).

Pacienti s Gaucherovou chorobou a přenašeči pro toto onemocnění jsou ohroženi vyšším rizikem vzniku Parkinsonovy choroby (PD), 5-10 % osob trpících PD nese mutaci genu *GBA* (Beavan and Schapira 2013). Mechanismus, kterým mutace *GBA* způsobují PD, nebyl dosud plně objasněn. Neexistuje korelace mezi typem mutace *GBA* a rizikem PD (Velayati, Yu et al. 2010). PD je neurodegenerativní porucha charakteristická strádáním proteinu  $\alpha$ -synukleinu ve strukturách zvaných Lewyho tělíska.  $\alpha$ -synuklein se nachází v CNS v presynaptických částech neuronů. Existují různé hypotézy vysvětlující souvislost degradace  $\alpha$ -synukleinu s množstvím  $\beta$ -Gluc uvnitř lysosomu. Podle teorie Mazzulli et al. (2011)  $\alpha$ -synuklein funguje jako chaperon a inhibuje vezikulární transport mezi ER a GA,  $\beta$ -Gluc se tak nemůže dostat do lysosomu. Zvýšené množství  $\alpha$ -synukleinu vede k vyčerpání lysosomální  $\beta$ -Gluc. Nedostatek  $\beta$ -Gluc způsobuje akumulaci glukosylceramidu, což má vliv na konformaci  $\alpha$ -synukleinu a vede k jeho další akumulaci a k neurodegeneraci. Tento oboustranný efekt  $\alpha$ -synukleinu a glukocerebrosidázy vytváří pozitivní zpětnovazebnou smyčku (Cookson 2011;

Mazzulli, Xu et al. 2011). Podle jiné studie dochází ke vzájemné interakci  $\alpha$ -synukleinu a  $\beta$ -Gluc uvnitř lysosomu, kdy snížená funkce  $\beta$ -Gluc podporuje akumulaci  $\alpha$ -synukleinu (Yap, Gruschus et al. 2011; Yap, Velayati et al. 2013). Dalším možným vysvětlením asociace GD a PD je protein parkin, je kódován genem PARK2 jehož mutace způsobují PD. Parkin je součástí proteinového komplexu E3 ubikvitin-ligázy (Shimura, Hattori et al. 2000). Podílí se na degradaci chybně sbalených proteinů v ER, jeho exprese je vyvolána přítomností těchto nesbalených proteinů. Ztráta funkce parkinu vede k akumulaci nesbalených proteinů, to způsobuje odumření dopaminergních neuronů v substantia nigra ve středním mozku, což vede k rozvoji PD. Mutantní  $\beta$ -Gluc je odbourána mechanismem degradace asociované s ER (ERAD), v ER jsou proteiny kontrolovány a chybně sbalené proteiny jsou translokovány do cytozolu a degradovány v ubikvitin-proteasomovém systému (UPS), jehož součástí je komplex E3 ubikvitin-ligáza. Parkin tedy podle této hypotézy zprostředkovává degradaci mutantní glukocerebrosidázy, to zřejmě zaměštnává jeho aktivitu a vede k akumulaci dalších nesbalených proteinů, jež způsobují zánik dopaminergních neuronů a rozvoj PD (Ron, Rapaport et al. 2010).

Diagnostika Gaucherovy choroby se provádí testováním aktivity enzymu  $\beta$ -Gluc v bílých krvinkách či jiných buňkách nebo pomocí molekulárně genetického vyšetření, které je schopné odhalit mutace v genu kódujícím tento enzym.

Pro léčbu Gaucherovy choroby je nyní dostupná enzymová substituční terapie a léčba s omezením substrátu. První klinický pokus o ERT aglucerázou, enzymem extrahovaným z placenty, proběhl úspěšně v roce 1991 v USA (Barton, Brady et al. 1991). V roce 1994 byla agluceráza nahrazena rekombinantním enzymem imiglucerázou (Grabowski, Barton et al. 1995; Zimran, Elstein et al. 1995). Další dva nové rekombinantní enzymy velagluceráza alfa (Zimran, Altarescu et al. 2010) a taligluceráza alfa (Aviezer, Brill-Almon et al. 2009) se objevily na trhu po roce 2010. ERT se ukázala jako vysoce bezpečná a účinná. Rekombinantní enzym nahrazuje nefunkční glukocerebrosidázu a urychluje tak degradaci nahromaděného substrátu, účinně tím zabraňuje dalšímu rozvoji poškození i vzniku nevratných změn.

Substrát redukční terapie spočívá v redukci celkového množství substrátu – glukosylceramidu na hodnotu, kterou je schopen deficitní enzym s určitou reziduální aktivitou rozštěpit a zmírnit tak stěradání. Perorálním podáním miglustatu (N-butyl-deoxynojirimycin) dochází k inhibici enzymu glukosyltransferázy, který jinak umožňuje vznik glukosylceramidu



z glukózy a ceramidu. Poprvé byla tato terapie testovaná v roce 1998 a ukázala zlepšení klinických příznaků u pacientů bez neurologických symptomů (Cox, Lachmann et al. 2000). Využívají ji především pacienti, u kterých nelze použít ERT. V současné době je v klinické studii další přípravek eliglustat tartrát.

Výhledově se předpokládá, že kromě enzymové substituční a substrát redukční terapie bude možno využívat cílenou léčbu chaperony či genovou terapii.

#### **1.4.3.1 Gen *GBA***

Gen pro glukocerebrosidázu (*GBA*) se nachází na chromosomu 1q21 (Ginns, Ryu et al. 1985), bylo v něm popsáno více než 300 mutací (Hruska, LaMarca et al. 2008), zahrnují mutace nesmyslné, se změnou smyslu, s posunem čtecího rámce, inserce a delece. Mezi nejčastější mutace patří N370S a L444P. N370S se vyskytuje u cca 75 % pacientů z populace Aškenázských židů a 30 % ostatních pacientů typu 1. Homozygoti s mutací N370S mívají obvykle mírný fenotyp, i když asi 10 % z nich má středně těžký či závažný průběh nemoci, příčina není známa. L444P se s vysokou frekvencí vyskytuje u pacientů 2. a 3. typu s neurologickými symptomy (Tsuji, Choudary et al. 1987; Tsuji, Martin et al. 1988).

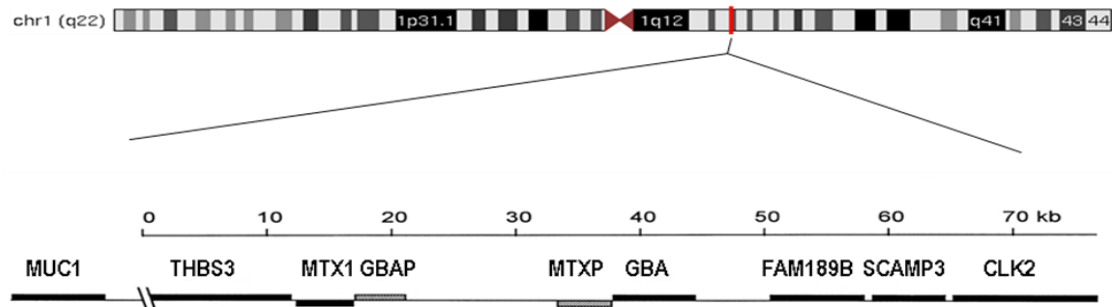
Gen obsahuje 11 exonů a 10 intronů, pokrývá oblast 7,2 kb. Promotor se nachází v bezprostřední blízkosti exonu 1 ve směru 3' - 5', obsahuje dva TATA boxy a dva CAT boxy, nenachází se zde žádný GC motiv pro vazbu transkripčního faktoru Sp1 (Horowitz, Wilder et al. 1989). V proximální části promotoru se nachází regulační elementy, některé z nich mají vliv na expresi pouze ve specifických tkáních, dva elementy nalezené v exonu 1 jsou nepostradatelné pro expresi glukocerebrosidázy (Doll, Bruce et al. 1995). V promotorové oblasti byly popsány čtyři motivy pro vazbu transkripčních faktorů AP-1, PEA3, OBP (OCTA vazebný protein), CBP (CAAT vazebný protein), které jsou zodpovědné za různou expresi genu *GBA* (Moran, Galperin et al. 1997). Další regulační elementy byly popsány v konzervovaných nekódujících oblastech v blízkosti *GBA* genu, byly ověřeny analýzou vazby transkripčních faktorů a reporterovou esejí v různých buněčných liniích (Blech-Hermoni, Ziegler et al. 2010).

Přestože je  $\beta$ -Gluc exprimovaná ve všech tkáních, množství mRNA se v různých buněčných liniích liší, což svědčí o možnosti tkáňově specifické regulace (Reiner and Horowitz 1988). Exprese mRNA nekoreluje s enzymovou aktivitou ve všech tkáních, proto se předpokládá, že aktivita  $\beta$ -Gluc je regulovaná ještě jinými mechanismy (Doll and Smith 1993). Exprese  $\beta$ -Gluc je závislá na přítomnosti regulačních elementů v exonu 1, regulační elementy

nacházející se ve směru 3'-5' od TATA boxu mají pouze malý vliv na transkripční aktivitu (Doll, Bruce et al. 1995).

16 kb od funkčního genu ve směru transkripce *GBA* se nachází vysoce homologní pseudogen (*GBAP*) (Horowitz, Wilder et al. 1989; Zimran, Sorge et al. 1990). V porovnání s genem se v sekvenci *GBAP* nachází 55 bp dlouhá delece v exonu 9 a několik set bazí dlouhé delece v intronech 2, 4, 6, a 7, dále se liší jednobázovými změnami. Exonová sekvence pseudogenu je z 96 % identická genu. Na rozdíl od většiny pseudogenů je *GBAP* přepisován, nemá však žádný dlouhý otevřený čtecí rámeček.

*GBA* leží v genově bohaté oblasti, v okolí 85 kb se nachází 7 genů a dva pseudogeny (Long, Winfield et al. 1996). Nejbližší gen je metaxin 1 (*MTX1*), je přepisován v opačném směru než *GBA*. V oblasti mezi *GBA* a *GBAP* leží pseudogen (*MTXP*), vznikl tandemovou duplikací této oblasti společně s *GBAP*. Oba pseudogeny se nachází pouze u člověka a primátů, k duplikaci zřejmě došlo před 25-40 milióny let (Winfield, Tayebi et al. 1997). Promotory obou pseudogenů se vzájemně překrývají. V blízkosti tohoto lokusu se nachází ještě další gen, trombospondin 3 (*THBS3*), jehož promotor se překrývá s promotorem pro *MTX1* (Bornstein, McKinney et al. 1995) (obr. 1.5).



**Obrázek 1.5: Okolí genu *GBA* a jeho pseudogenu**

*MTX1* a *MTXP* znázorněné pod linkou jsou přepisovány v opačném směru než *GBA* a ostatní geny. Promotory *GBAP* a *MTXP* se vzájemně překrývají stejně jako promotory *THBS3* a *MTX1*. Obrázek byl upraven podle Winfield et al., 1997 (Winfield, Tayebi et al. 1997).

#### 1.4.4 Mukopolysacharidózy

Je to skupina 11 dědičných lysosomálních onemocnění, které jsou způsobeny deficitem některého z enzymů podílejícího se na degradaci glykosaminoglykanů (mukopolysacharidů) - dermatan sulfátu, keratan sulfátu, heparan sulfátu, chondroitin sulfátu a hyaluronanu. Deficit

některého z těchto enzymů vede k hromadění neodbouraných glykosaminoglykanů ve tkáních a orgánech a způsobuje jeden ze 7 typů mukopolysacharidóz (MPS) (obr. 1.6).

MPS se jako celek vyskytují v populaci zhruba s frekvencí 1 : 22 000, prevalence jednotlivých typů je mnohem nižší, frekvence výskytu se liší regionálně (Meikle, Hopwood et al. 1999).

Všechna onemocnění jsou autozomálně recesivní s výjimkou MPS II, která je X-vázaná (Hopwood, Bunge et al. 1993). U pacientů bylo popsáno mnoho mutací pro všechny typy MPS. Obecně platí, že mutace nesmyslné a s posunem čtecího rámce vedou k závažnějším projevům než mutace se změnou smyslu.

Klinické znaky jsou podobné u všech typů MPS, patří mezi ně chronický a progresivní průběh, zvětšení orgánů, poruchy vývoje kostí atd. Jsou klasifikovány do tří hlavních skupin, 1. skupinu tvoří pacienti s výrazným viscerálním fenotypem (MPS I, II, VI, VII) s klinickými příznaky - zvětšená játra a slezina, srdeční poruchy, dysostosis multiplex. Do 2. skupiny se řadí pacienti s převážně neurodegenerativním fenotypem (MPS III) projevujícím se progredujícími neurologickými příznaky se začátkem mezi 2. a 6. rokem života a méně výraznými viscerálními a kostními příznaky než u první skupiny. 3. skupinu tvoří pacienti se skeletálním fenotypem (MPS IV) projevujícím se kostní dysplazií.

#### **1.4.4.1 Mukopolysacharidóza IIIC**

Mukopolysacharidóza IIIC (MPS IIIC) neboli Sanfilippův syndrom typu C je vzácné autozomálně recesivní onemocnění způsobené deficitem enzymu acetyl-CoA:α -glukosaminid N-acetyltransferázy (N-acetyltransferázy), což vede k nedostatečné degradaci heparan sulfátu (obr. 1.6). Heparan sulfát je lineární polysacharid, který je součástí proteoglykanů na povrchu buňky nebo v extracelulární matrix.

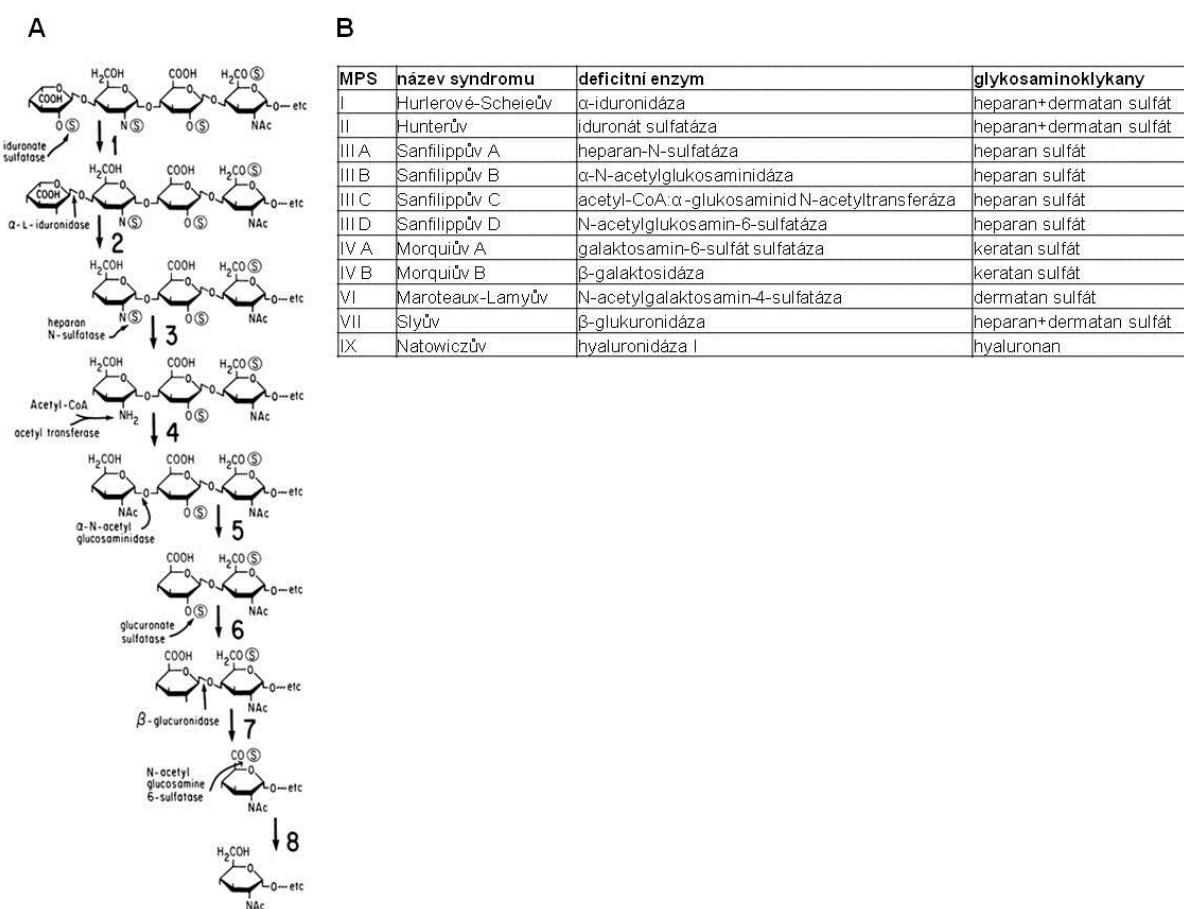
MPS IIIC pacienti byli poprvé identifikováni na bázi metabolických studií a až v letech 1972-1980 byli rozděleni do čtyř podtypů podle deficitu příslušného enzymu (Valstar, Ruijter et al. 2008). Sanfilippův syndrom typu C byl identifikován u 11 pacientů s příznaky MPS III a deficitem N-acetyltransferázy (Klein, Kresse et al. 1978; Klein, van de Kamp et al. 1981).

Prevalence MPS IIIC je velmi nízká, v Austrálii, Portugalsku a Holandsku byla odhadnuta na 0,07, 0,12 a 0,21 na 100 000 živě narozených (Feldhammer, Durand et al. 2009).

Všechny podtypy MPS III mají podobné klinické příznaky s nástupem mezi 2. a 6. rokem života a postupným zhoršením funkce CNS, což vede k závažným neuropsychiatrickým poruchám, mentální retardaci, ztrátě sluchu a řeči, poruchám spánku. Somatické projevy jsou

zpočátku mírné, objevují se obvykle až v průběhu dospívání, zahrnují kraniofaciální dysmorfii, hypertrichózu, lehkou hepatomegálii a dysostosis multiplex (Bartsocas, Grobe et al. 1979).

MPS III je diagnostikována měřením množství glykosaminoglykanů vyloučených v moči, ale konkrétní podtyp onemocnění je nutno stanovit na enzymatické a molekulárně genetické úrovni. Zatím neexistuje žádná účinná terapie pro léčbu pacientů. V současné době je ve fázi klinického testování substrát redukční terapie pomocí genisteinu, který inhibuje syntézu glykosaminoglykanů a omezuje jejich střádání (Malinova, Wegrzyn et al. 2012).



**Obrázek 1.6: Degradace heparansulfátu a typy MPS**

Deficit enzymu v reakci označené číslem koresponduje s příslušným onemocněním. 1-MPS II, 2-MPS I, 3-MPS IIIA, 4-MPS IIIC, 5-MPS IIIB, 6-žádné onemocnění není známo, 7-MPS VII, 8-MPS IIID. Obrázek převzat z Neufeld, 2006 (Neufeld E. F. 2006) (A). MPS V a VIII byly chybně identifikovány a nejsou používány (B).

#### 1.4.4.1.1 N-acetyltransferáza

N-acetyltransferáza není na rozdíl od ostatních enzymů účastnících se degradace heparan sulfátu hydroláza. Je zakotvena v lysosomální membráně a katalyzuje acetylaci

glukosaminových zbytků heparan sulfátu, který nemůže být přímo hydrolyzován. Bylo publikováno několik možných mechanismů vysvětlujících transmembránovou acetylaci, nejvíce uznávaný je tzv. ping-pongový mechanismus. K acetylaci je využívána acetylová skupina cytozolového acetyl-CoA, a protože by došlo k jeho rychlému odbourání v kyselém prostředí lysosomu (Rome, Hill et al. 1983), je acetylová skupina nejprve přenesena na histidinový zbytek N-acetyltransferázy a translokována přes lysosomální membránu do lumen lysosomu, kde je následně přenesena na glukosaminový zbytek heparan sulfátu (Bame and Rome 1986; Bame and Rome 1986). Tento mechanismus byl podpořen studií, ve které byla N-acetyltransferáza acetylována [<sup>14</sup>C] acetyl-CoA v nepřítomnosti glukosaminu (Ausseil, Landry et al. 2006). Alternativní mechanismus předpokládá přenesení acetylové skupiny cytozolového acetyl-CoA na glukosaminový zbytek heparan sulfátu vytvořením náhodně uspořádaného ternárního komplexu (Meikle, Whittle et al. 1995). Následná studie se přiklání k tomuto mechanismu, neboť při inkubaci N-acetyltransferázy s [<sup>3</sup>H] acetyl-CoA nedošlo k vytvoření acetylovaného proteinového meziprojektu (Fan, Tkachyova et al. 2011).

N-acetyltransferáza obsahuje 11 transmembránových domén a 5 N-glykosylačních míst, (Fan, Zhang et al. 2006; Hrebicek, Mrazova et al. 2006).

N-acetyltransferáza není strukturně podobná žádným známým eukaryotním či prokaryotním N-acetyltransferázám ani dalším lysosomálním proteinům. Sdílí homologii s konzervovanou rodinou dosud necharakterizovaných bakteriálních membránových proteinů COG 4299. Je zřejmě jediným eukaryotním představitelem této strukturní třídy proteinů (Fan, Zhang et al. 2006; Hrebicek, Mrazova et al. 2006).

#### **1.4.4.1.2 Gen *HGSNAT***

Gen pro N-acetyltransferázu (*HGSNAT*) byl identifikován v roce 2006 dvěma nezávislými skupinami (Fan, Zhang et al. 2006; Hrebicek, Mrazova et al. 2006). Nachází se na chromosomu 8 v pericentromerické oblasti, obsahuje 18 exonů a kóduje protein o velikosti 73 kDa.

V genu *HGSNAT* bylo identifikováno více než 60 mutací včetně mutací nesmyslných, se změnou smyslu, sestřihových, inzercí a delecí (Feldhammer, Durand et al. 2009; Canals, Elalaoui et al. 2011).

Promotor genu nebyl dosud charakterizován, 5' konec transkriptu je vysoce GC bohatý. cDNA sekvence obsahuje dva ATG iniciační kodony, které jsou ve čtecím rámci (Hrebicek, Mrazova et al. 2006). V některých expresních studiích bylo považováno za iniciační kodon

ATG v pozici +1 (downstream, 1. ATG) (Fan, Zhang et al. 2006; Hrebicek, Mrazova et al. 2006; Fan, Tkachyova et al. 2011) a v některých ATG v pozici -84 (upstream ATG) (Feldhammer, Durand et al. 2009; Durand, Feldhammer et al. 2010).

## 1.5 Promotory

Promotor je regulační oblast DNA, která řídí transkripci genu. Obsahuje specifickou sekvenci DNA, která je rozpoznána proteiny – transkripčními faktory. Eukaryotické promotory se velmi liší a není jednoduché je charakterizovat, výsledky nedávných studií je dělí do více než 10 skupin (Gagniuc and Ionescu-Tirgoviste 2012). Takzvaný *core* promotor tvoří 40-50 bp dlouhá sekvence DNA obklopující začátek transkripce, která je zodpovědná za iniciaci transkripce pomocí RNA polymerázy II (Smale 2001). V této oblasti se nachází několik sekvenčních motivů zodpovědných za iniciaci transkripce – TATA box, Inr (iniciátor), BRE (TFIIB rozpoznávací element), DPE (downstream core promoter element), MTE (motif ten element) (obr. 1.7). Žádný z těchto elementů se nevyskytuje ve všech promotorech, TATA box může fungovat bez přítomnosti BRE, Inr a DPE, zatímco DPE vyžaduje přítomnost Inr (Smale and Kadonaga 2003). Neexistuje žádná univerzální sekvence v *core* promotoru.

TATA box (tzv. Hognessův box) je AT bohatá sekvence, která se nachází 25-30 bp od začátku transkripce ve směru 3' - 5'. Na konvenční sekvenci TATAA se váže transkripční faktor TBP (TATA box vazebný protein), což je podjednotka transkripčního faktoru IID, který je součástí přediniciačního komplexu. Vyskytuje se v promotorech 24 % lidských genů kódujících proteiny (Yang, Bolotin et al. 2007), je spojován s tkáňově specifickými promotory.

Inr je funkčně podobný TATA boxu, může fungovat nezávisle nebo v kombinaci s TATA boxem. Konvenční sekvence pro Inr obklopuje začátek transkripce, je charakteristický přítomností adenosinu v pozici +1, cytosinu v pozici -1 a několika pyrimidinů v okolí (Corden, Wasylyk et al. 1980). Umožňuje vazbu transkripčního faktoru IID (Kaufmann and Smale 1994).

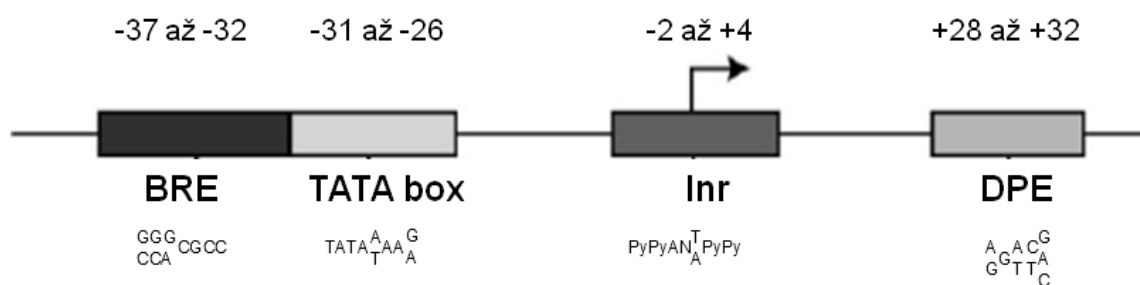
DPE leží 28-32 bp od začátku transkripce ve směru 5' - 3', obvykle se vyskytuje společně s Inr elementem. Většinou se nachází v promotorech postrádajících TATA box (Kutach and Kadonaga 2000).

BRE se nachází ve směru 3' - 5' v blízkosti TATA boxu, jeho konvenční sekvence bohatá na guanin a tymin umožňuje vazbu transkripčního faktoru IIB (Lagrange, Kapanidis et al. 1998).

MTE leží 18-27 bp od začátku transkripce ve směru 5'-3', umožňuje vazbu transkripčního faktoru IID společně s Inr, funguje nezávisle na TATA boxu a DPE (Lim, Santoso et al. 2004).

Několik set bp od začátku transkripce ve směru 3'-5' se nachází proximální promotor obsahující mnoho regulačních elementů, na které se váží transkripční faktory, které zesilují nebo zeslabují transkripční aktivitu. Mezi nejznámější patří CTF, který se váže na CAT box, Sp1 na GC box, Oct-1 a Oct-2 na Octamer, NFkB na kB. Každý eukaryotní gen má v proximálním promotoru alespoň jeden z těchto elementů.

Distální promotor leží několik 100 až 1000 bp od začátku transkripce ve směru 3'-5', může obsahovat další regulační elementy - enhancery, které ovlivňují transkripční aktivitu, často jsou tkáňově specifické. Každý gen může být regulován několika různými kontrolními elementy.



**Obrázek 1.7: Motivy v *core* promotoru**

Obrázek znázorňuje sekvenční motivy zodpovědné za iniciaci transkripce. Obrázek převzat z Smale and Kadonaga, 2003 (Smale and Kadonaga 2003).

### 1.5.1 CpG ostrůvky

Zhruba polovina promotorových oblastí u savců se nachází v oblasti CpG ostrůvků (Suzuki, Tsunoda et al. 2001). CpG ostrůvky jsou krátké rozptýlené sekvence s vysokou frekvencí CpG dinukleotidů v porovnání s celou sekvencí genomu (Larsen, Gundersen et al. 1992). CpG ostrůvky v promotorových oblastech genů jsou nemetylované a jsou tak přístupné pro vazbu transkripčních faktorů, zatímco většina CpG míst v lidském genomu je metylována. Metylace DNA je jeden z mechanismů epigenetické kontroly genové exprese, při kterém dochází k připojení metylových skupin na cytosin, po němž následuje guanin. Je spojena s inaktivací genů, metylace buď brání vazbě transkripčních faktorů, nebo umožňuje vazbu inhibičních komplexů, které vedou k přestavbě chromatinu do inaktivní podoby.

V blízkosti CpG ostrůvku se obvykle nenachází TATA box, nachází se zde několik začátků transkripce a několik vazebných míst pro transkripční faktor Sp1, který řídí iniciaci transkripce u promotorů postrádajících TATA box (Blake, Jambou et al. 1990).

CpG ostrůvky se nachází na 5'konci všech housekeeping genů a u 40 % genů s tkáňově specifickou expresí (Larsen, Gundersen et al. 1992).

### **1.5.2 Promotory housekeeping genů**

Housekeeping geny jsou geny nutné pro udržení základních funkcí buňky, jsou exprimovány ve všech typech buněk a vývojových stádiích (Butte, Dzau et al. 2001). Promotory housekeeping genů jsou charakteristické tím, že postrádají regulační sekvence jako TATA box a CAT box (Butler and Kadonaga 2002), jsou velmi GC bohaté, CpG ostrůvky se obvykle překrývají s místy začátku transkripce (Gardiner-Garden and Frommer 1987). V oblasti CpG ostrůvků se nachází vazebná místa pro Sp1 a společně s Inr elementy může spouštět transkripci bez přítomnosti TATA boxu (Smale and Kadonaga 2003). Většina housekeeping genů má promotory s CpG ostrůvky, zatímco u tkáňově specifických genů jsou často přítomny promotory bez TATA boxu i bez CpG ostrůvků a pouze minimum z nich využívá promotor s TATA boxem (Zhu, He et al. 2008).

### **1.5.3 Alternativní promotory**

Alternativní promotory umožňují vznik několika transkriptů z jednoho genu, které se liší na 5' konci. Regulují transkripci u téměř poloviny lidských genů (Baek, Davis et al. 2007). Většina genů s alternativními promotory dává vznik transkripčním variantám se stejnou kódující sekvencí, tudíž vzniká identický protein. V některých případech jsou transkripty vzniklé z různých promotorů překládány do různých proteinových izoform, které se liší na N-konci. Zřídka se stává, že alternativní promotory kódují transkripty, které jsou překládány v různých čtecích rámcích a dávají vznik proteinům s různou funkcí (Landry, Mager et al. 2003).

Alternativní promotory mohou být využívány pro tkáňově specifickou kontrolu exprese genu, promotor spouští transkripci genu pouze v určité tkáni, ve které je výsledný protein potřeba. Alternativní promotory některých genů mohou být různě využívány během vývoje, kdy je exprese řízena z jednoho promotoru v určité fázi vývoje a z jiného promotoru v pozdější fázi (Landry, Mager et al. 2003).



## 2 Cíle a pracovní hypotézy

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

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 jasné 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 stádání 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 IIC.

Dalším úkolem bylo zjistit, zda dochází ke zvýšené autofagii a abnormální ubikvitinylaci proteinů v mozku myšího modelu MPS IIC, 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**

### **3.1 Obecné metody**

#### **3.1.1 Příprava genomové DNA (gDNA)**

gDNA byla izolována z leukocytů žilní krve, jaterní tkáň a placenty standardní fenol-chloroformovou extrakcí (Gilbert and Vance 2001) nebo s použitím kitu QiaAmp® (Qiagen, Hilden, Německo).

#### **3.1.2 Izolace RNA**

Celková RNA byla izolována z venózní krve z leukocytů, jaterní tkáň a placenty metodou Chomczynskiho a Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987) za použití Trizol® Reagentu (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

#### **3.1.3 Příprava komplementární DNA (cDNA)**

Z celkové RNA izolované podle 3.1.2. a z komerčně dodávané celkové RNA (Human Placenta Total RNA, FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel - Life Technologies, Foster City, CA, USA) byla reverzní transkripcí připravena cDNA pomocí kitu High Capacity RNA-to-cDNA™ (Life Technologies).

#### **3.1.4 Měření koncentrace DNA a RNA**

Koncentrace a kvalita gDNA, cDNA, DNA izolované z agarózového gelu nebo z bakteriálních kultur a RNA byla měřena na přístroji Nanodrop® ND-1000 Spectrometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

#### **3.1.5 Měření koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí metody Bradfordové (Bradford 1976). Vzorky byly inkubovány s Bradfordovým činidlem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a následně byla měřena absorbance o vlnové délce 595 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko). Jako standard pro sestavení kalibrační rovnice byl použit bovinní sérový albumin (BSA) (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

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

1% agaróza (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) byla smíchána s 1x BB pufrem (10mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>\*10H<sub>2</sub>O) a rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Před nalitím do

elektroforetické vany byl gel vychlazen na cca 40°C. V případě izolace DNA fragmentu z gelu byla do gelu přidána barvička GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Po ztuhnutí byl gel přelit 0,5x BB pufrem. Vzorky byly smíchány s 6x Loading dye (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) a GelRed v případě, že barvička nebyla přidána přímo do gelu. Vzorky společně s DNA hmotnostním žebříkem byly nanášeny na gel a elektroforéza probíhala při intenzitě 10V/cm. Vizualizace DNA byla provedena na UV transluminátoru (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée cedex, Francie).

### **3.1.7 Izolace DNA fragmentů z agarózového gelu**

DNA fragmenty separované v agarózovém gelu byly vyříznuty skalpelem a rozpouštěny při 55°C v DNA vazebném pufru příslušného kitu - Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) nebo High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Basel, Švýcarsko). Následně byly fragmenty zachyceny na kolonce, přečistěny a eluovány.

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

Klonování do TOPO® vektorů (pCR®4 a pCR®-XL) bylo provedeno podle protokolu výrobce pomocí klonovacího kitu TOPO® TA (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Pro transformaci bylo použito 50 µl kompetentních buněk TOP10 (Life Technologies). Transformace byla provedena buď teplotním šokem při 42°C, 30 s, nebo elektroporací na přístroji E. coli Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), kdy byly buňky vystaveny impulsu elektrického napětí o velikosti 2,5 kV. Ihned po transformaci bylo k buňkám přidáno na 37°C předehřáté medium SOC (2% Tryptone, 0,5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukóza). Buněčná suspenze byla poté inkubována 1h při 37°C za stálého třepání. Po inkubaci byly buňky natřeny na Petriho misky s LB agarem (15 g agaru/1 l LB media (1% Tryptone, 0,5% Yeast Extract, 1% NaCl, pH7.0)) a příslušným antibiotikem pro selekci a byly inkubovány přes noc při 37°C. Narostlé kolonie byly přeneseny a kultivovány přes noc při 37°C v LB médiu s příslušným antibiotikem za stálého třepání. Narostlá buněčná kultura byla centrifugována a peleta byla resuspendována v lyzačním pufru použitého kitu. Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí kitů FastPlasmid™ Mini Kit (Eppendorf, Hamburg, Německo) a JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed, Löhne, Německo), v případě následné transfekce se používal PerfectPrep™ EndoFree Plasmid Maxi Kit (Eppendorf). DNA sekvence insertů byla ověřena přímým sekvenováním (viz. 3.1.11).

### 3.1.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Všechny PCR reakce byly provedeny podle obecných protokolů (Kramer 1999) pomocí primerů (viz. 6 Tabulky) navržených v programu Oligo 6 software (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA) a syntetizovaných firmou Generi Biotech (Hradec Králové, ČR) (tab. 1,3,4) a různých templátů (gDNA, cDNA, plasmidové DNA) na termálním cykleru DNA Engine Dyad® Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) nebo Mastercycler® nexus (Eppendorf, Hamburg, Německo). Každá amplifikace probíhala za specifických podmínek s použitím KlenTaq polymerázy (GeneAge Technologies, Praha, ČR) nebo v kombinaci s DeepVent polymerázou (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

### 3.1.10 Real-time PCR

Primery a TaqMan sondy (tab. 2) byly navrženy pomocí programu Primer Express 3.0 software (Life Technologies, Foster City, CA, USA) tak, aby jejich anelační teplota byla 60°C a syntetizovány firmou Life Technologies. Celkové množství reakční směsi bylo 20 µl obsahující 2 µl cDNA získané reverzní transkripcí Human Placenta Total RNA a FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel (Life Technologies) (viz. 3.1.3), 1 µl TaqMan sondy a 10 µl TaqMan® Universal PCR Master Mixu (Life Technologies) obsahujícího AmpliTaq Gold® DNA Polymerázu, AmpErase® Uracil N-Glykosylázu (UNG), nukleotidy včetně dUTP a pasivní referenci ROX. Amplifikace probíhala v 96-jamkové destičce na přístroji StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies). Všechny amplifikační reakce začínaly iniciální inkubací 2 min. při 50°C, což je nutné pro optimální působení UNG a denurací 10 min. při 95°C, následovalo 40 cyklů 15 s při 95°C a 1 min. při 60°C. Pro všechny sondy byly vytvořeny standardní křivky pomocí 10ti-násobného sériového ředění gDNA nebo oligonukleotidů obsahujících sekvenci primerů a sond (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR), byl vypočítán korelační koeficient a účinnost reakce. Všechny standardy a vzorky byly připravovány v duplikátech. V každé destičce byla zahrnuta negativní kontrola bez templátu. K normalizaci byly použity sondy pro dva běžně používané housekeeping geny glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (*GAPDH*) a beta-aktin (*ACTB*) komerčně dodávané firmou Life Technologies. Kvantifikace byla provedena metodou kalibračních křivek a komparativní  $\Delta\Delta Cq$  metodou (Bustin, Benes et al. 2009).

### 3.1.11 Sekvenování

Veškeré 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). Součástí kitu jsou ddNTPs, každý značený jinou fluorescenční barvou, což umožňuje použití neznačeného primeru pro sekvenování. Templátová DNA byla přečištěna etanolovou precipitací nebo kitem BigDye XTerminator® Purification Kit (Life Technologies) podle protokolu výrobce. Pro sekvenování byl použit teplotní program s úvodní denaturací 60 s při 96°C, následnými 25 cykly 10 s denaturace při 96°C, 5 s annealing při 50°C, a 4 min. elongace při 60°C. Po ukončení programu byl ke vzorkům přidán Hi-Di™ Formamide (Life Technologies). Vzorky byly denaturovány 3 min. při 95°C a následně zchlazeny na ledu. Poté byly nasáty do kapiláry vyplněné polymerem POP-6™ nebo POP-7™ (Life Technologies) a detekovány CCD kamerou. Získaná data byla analyzována programem Sequencing Analysis Software v5.1 (Life Technologies).

### **3.1.12 SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)**

Separční gel byl připraven smícháním roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), separačního pufru (1,5 M Tris base, 13,9 mM SDS, pH 8,8), vody, 0,06% APS (Sigma-Aldrich) a 0,06% TEMED (Sigma-Aldrich). Směs byla nalita mezi sestavená skla a přelita vrstvou vody. V případě separace na gradientovém gelu byla směs míchána v gradientovém mixeru (Sigma-Aldrich) a nalévána za použití peristaltické pumpy Varioperpex® II Peristaltic Pump (LKB, Bromma, Švédsko). Po 45 min. polymeraci byl připraven zaostřovací gel smícháním roztoku akrylamidu/bis-akrylamidu, zaostřovacího pufru (0,5 M Tris base, 13,9 mM SDS, pH 6,8), vody, 0,06% APS a 0,06% TEMED. Zpolymerovaný gel byl připevněn do aparatury MightySmall SE250 nebo SE260 (Hoefer, San Francisco, CA, USA). Vzorky byly smíchány s pufrem 6x SDS PAGE (0,012% bromfenolová modř, 30% glycerol, 0,347 M SDS, 6% β-merkaptóetanol) a pipetovány do jamek v gelu. Elektroforéza probíhala v pufru (192 mM glycin, 25 mM Tris base, 3,47 mM SDS) při napětí 100 V, po proběhnutí vzorků zaostřovacím gelem bylo napětí zvýšeno na 160 V.

### **3.1.13 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). Blotovací papíry a gel byly ekvilibrovány 20 min. v blotovacím pufru (48 mM Tris Base, 39 mM glycine, 0,037% SDS, 20% metanol, pH 9,2), membrána pouze 20 s v metanolu. Přenos proteinů na membránu probíhal 1h při

stabilizovaném proudu 1,6 mA/cm<sup>2</sup>. Poté byla membrána blokována 1h v blokovacím pufru PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3, 0,05% TWEEN20) s 3% albuminem (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) a následně promyta v PBS-T 3x po dobu 10 min. Membrána byla inkubována 1h s příslušnou primární protilátkou v PBS-T s 1% albuminem, znovu promyta a inkubována 45 min. se sekundární protilátkou goat anti-mouse IgG nebo goat anti-rabbit IgG (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) konjugovanou s reporterovým enzymem – křenovou peroxidázou (HRP) v PBS-T s 1% albuminem. Po promytí membrány byl signál vyvolán pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) a detekován na přístroji ChemigeniusQ (SynGene, Cambridge, UK). Všechny inkubace a promývání byly provedeny při pokojové teplotě za stálého třepání na přístroji Orbital Shaker OS-20 (Biosan, Riga, Lotyšsko).

### 3.1.14 Bioinformatika

Referenční sekvence byly získány z databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), k vyhledávání transkriptů a ESTs byla používána databáze GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) a UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). K identifikaci vazebných míst pro transkripční faktory byly využívány programy 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 exonu -2 a P2 promotoru *GBA* genu byl vytvořen z alignmentu kompletních genomů dostupných z Galaxy (<http://main.g2.bx.psu.edu/>) (Goecks, Nekrutenko et al. 2010).

## 3.2 Metody užitá při identifikaci promotorových oblastí

### 3.2.1 Identifikace začátku transkripce

Identifikace začátku transkripce byla provedena metodou 5'RACE (Fromont-Racine, Bertrand et al. 1993) pomocí kitů GeneRacer<sup>TM</sup> a FirstChoice® RLM-RACE (Life Technologies, Foster City, CA, USA). 10 ug cekové RNA izolované z lidských leukocytů, jater a placenty nebo komerční Human Placenta Total RNA (Life Technologies) (viz. 3.1.2) bylo inkubováno s alkalickou fosfatázou (CIP) 1 h při 37°C. Plnodélková mRNA, která je chráněná čepičkou a není defosforylována, byla přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí a etanolovou precipitací.

Následně byla čepička odstraněna inkubací s kyselou fosfatázou (TAP) a k mRNA byl ligován adaptorový oligonukleotid pomocí T4 ligázy. Poté byla provedena reverzní transkripce (viz. 3.1.3) a nested PCR (viz. 3.2.2) s 5'RACE univerzálními primery a genově specifickými primery (tab. 1 a 4). Fragmenty cDNA byly přečištěny a sekvenovány (viz. 3.1.11) buď přímo nebo po klonování do pCR4 vektoru. Použité enzymy byly součástí kitu.

### **3.2.2 Nested PCR**

Je založena na dvou po sobě následujících amplifikačních reakcích. První reakce byla provedena s párem vnějších primerů (5'RACE univerzální a genově specifický), druhá s párem vnitřních primerů (tab. 1) a jako templát sloužil PCR produkt z první reakce.

### **3.2.3 Real-time PCR pro zjištění využití začátků transkripce *GBA***

Primery a TaqMan sondy byly navrženy (viz. 3.1.10) tak, aby specificky nasedaly na sekvenci ve směru 3'-5' (sonda 1 a 2) a 5'-3' (sonda 3) (tab. 2) od začátků transkripce nalezených metodou 5'RACE (viz. publikace 9.3, fig. 2). Pro každou sondu byly vytvořeny standardní křivky pomocí 10-násobného sériového ředění gDNA. Kvantifikace byla provedena metodou kalibračních křivek.

### **3.2.4 Bisulfitové sekvenování**

K ověření, zda CpG ostrůvky nacházející se v oblasti promotoru jsou metylovány bylo použito bisulfitové sekvenování. gDNA izolovaná (viz. 3.1.1) z krve od tří kontrolních osob byla nejprve ošetřena bisulfitem sodným (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Clark, Harrison et al. 1994), který konvertuje nemetylované cytosiny na uracily, zatímco 5-metyl cytosiny ponechává v nezměněném stavu. Takto ošetřená DNA sloužila jako templát pro amplifikaci promotorové oblasti obsahující CpG ostrůvky. Primery byly navrženy tak, aby nasedaly na modifikovanou DNA (tab. 1 a 4). PCR fragmenty byly separovány v agarózovém gelu (viz. 3.1.6), izolovány (viz. 3.1.7) a následně sekvenovány (viz. 3.1.11).

### **3.2.5 Transfekce buněk pro ChIP**

5,5 ug vektoru pN3-Sp1 (darovaného od Prof. Guntrama Suskeho, Marburg, Německo) bylo transientně transfekováno do HepG2 (1x10<sup>6</sup> buněk) elektroporací na přístroji Neon<sup>®</sup> Transfection System (Life Technologies, Foster City, CA, USA) zapomíněk: špička 10 µl, napětí 1230 V, šířka pulzu 20 ms, 3 pulzy. Paralelně byl do buněk za stejných podmínek transfekován pEGFP jako kontrola účinnosti transfekce.



### 3.2.6 Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)

ChIP byla provedena pomocí ChIP kit (Abcam, Cambridge, UK). HepG2 transfekované pN3-Sp1 byly promyty fosfátovým pufrům PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) a fixovány 10 min. v 1% formaldehydu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Poté byly rozpuštěny v lyzačním pufru a DNA byla sonikována na přístroji E210 Focused-ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA, USA) na fragmenty dlouhé 200 - 1000 bp. Získaný chromatin byl inkubován s protilátkou anti-Sp1 (Abcam) a anti-Histone H3 (součástí kitu) přes noc při 4°C. Komplex DNA-protein s navázanou protilátkou byl vychytán agarózovými kuličkami s A/G proteinem. DNA byla poté přečištěna a použita pro PCR amplifikaci (viz. 3.1.9) s primery specifickými pro úsek *HGSNAT* promotoru s předpokládanými vazebnými místy pro Sp1 a pro úsek *SLC22A18* promotoru s dříve charakterizovanými Sp1 vazebnými místy (tab. 4).

### 3.2.7 Expres transkriptů z P1 a P2 ve 20 různých tkáních

Pro zjištění stability exprese z P1 a P2 byly použity TaqMan sondy 3 a 4 (tab. 2). Specificita sondy 4 byla ověřena absolutní kvantifikací s oligonukleotidy komplementárními k *GBA* genu a pseudogenu (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR). Jako templát byla použita cDNA z 20 různých tkání přepsaná z FirstChoice<sup>®</sup> Human Total RNA Survey Panel (Life Technologies, Foster City, CA, USA) (viz. 3.1.3). Stabilita exprese *GBA* byla vypočítána pomocí programů geNorm a NormFinder (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Andersen, Jensen et al. 2004) společně s dvěma housekeeping geny *GAPDH* a *ACTB*.

## 3.3 Měření luciferázové aktivity

### 3.3.1 Příprava konstruktů pro reporterovou esej

Různě dlouhé oblasti předpokládaných promotorů byly amplifikovány pomocí primerů obsahujících na 5'konci restrikční místa *KpnI* nebo *XhoI* (tab. 1,3). Fragmenty DNA byly puštěny na 1% agarosovém gelu a izolovány (viz. 3.1.7). Přečištěné fragmenty byly přímo klonovány do pCR<sup>®</sup>4 nebo pCR<sup>®</sup>-XL vektoru (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Narostlé kolonie byly ověřeny sekvenováním (viz. 3.1.11) a pozitivní klony byly následně štěpeny restrikčními enzymy FastDigest *KpnI* a *XhoI* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Restrikce probíhala 5 min. při 37°C, zároveň byl štěpen i vektor pGL4.16 (Promega, Madison, WI, USA) nesoucí tato restrikční místa. Vektor pGL4.16 kóduje luciferázový

reporterový gen *luc2CP* (*Photinus pyralis*). Pomocí T4 DNA ligázy (Thermo Scientific) byly naštěpené fragmenty ligovány v orientaci sense i antisense do vektoru pGL4 před luciferázový reporterový gen. Sekvence konstruktů byly zkontrolovány sekvenováním (viz. 3.1.11).

### **3.3.1.1 Cílená mutageneze**

Delece a substituce promotorových sekvencí byly vytvořeny pomocí kitu QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Shenoy and Visweswariah 2003). Primery uvedené v tab. 1 a 4 byly navrženy v programu QuickChange Primer Design (<https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>). 125 ng každého primeru bylo použito pro amplifikaci (viz. 3.1.9) pomocí *PfuTurbo* DNA polymerázy. Jako templát sloužil plasmid nesoucí příslušnou promotorovou sekvenci. Po proběhnutí PCR reakce bylo do zkumavky přidáno 10 U enzymu *DpnI* a vzorek byl inkubován 1 h při 37°C, kdy došlo k rozštěpení nemutované plasmidové dsDNA. Mutovaný plasmid byl transformován (viz. 3.1.8) do XL-Gold<sup>®</sup> ultrakompetentních buněk (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Správnost mutovaných sekvencí byla ověřena sekvenováním (viz. 3.1.11) narostlých kolonií. Použité enzymy byly součástí kitu.

### **3.3.1.2 Kultivace buněčných kultur pro transfekci**

HepG2 buňky byly kultivovány v 25 cm<sup>2</sup> lahvích v komerčně dodávaném mediu Opti-MEM (Life Technologies, Foster City, CA, USA) obohaceném o antibiotika (1% penicilin, 1% streptomycin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 10% fetální bovinní sérum (FBS) (PAA Laboratories, Yeovil, UK). Kultivace byla prováděna v termostatu v atmosféře syčené 5% CO<sub>2</sub>, při 37°C. Buněčná suspenze o hustotě 5 x 10<sup>4</sup> buněk na jamku bylo nasazeno do 24-jamkové destičky a inkubováno 48 h v termostatu.

### **3.3.1.3 Transfekce a luciferázová esej**

500 ng každého konstruktů bylo transfekováno do HepG2 buněk narostlých v 24-jamkových destičkách pomocí transfekčních činidel Tfx<sup>™</sup> – 20 and FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA). Zároveň byl do buněk transfekován prázdný pGL4 vektor jako negativní kontrola a pEGFP jako kontrola transfekce. Společně s reporterovým vektorem pGL4 byl transfekován vektor pRL-TK (Promega), který slouží jako vnitřní kontrola pro eliminaci odchylek transfekční účinnosti. Vektor pRL-TK obsahuje cDNA kódující luciferázu *Renilla*, která byla původně klonována z mořského organismu *Renilla reniformis*. Po

transfekci bylo k buňkám přidáno medium (viz. 3.3.1.2) a buňky byly inkubovány 48 h v termostatu v atmosféře syčené 5% CO<sub>2</sub>, při 37°C. Po inkubaci byly buňky opláchnuty PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) a lyzovány v 100 ml pufru PLB (Passive lysis buffer, je součástí kitu Dual-Luciferase® Reporter Assay System) (Promega). Lyzované buňky byly centrifugovány a supernatant byl použit pro měření luciferázové aktivity reporterového genu pomocí kitu Dual-Luciferase® Reporter Assay System. Chemiluminiscence byla měřena na luminometru (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Německo), nejprve byla měřena aktivita světluškové luciferázy *Photinus pyralis* přidáním substrátu Luciferase assay Reagent II a poté aktivita luciferázy *Renilla reniformis* přidáním substrátu Stop & Glo®. Luciferázová aktivita byla vyjádřena jako poměr luminiscence *Photinus pyralis* ku *Renilla reniformis* po odečtení pozadí (RLU, relativní luciferázová jednotka).

### **3.4 Metody užití při kultivaci a diferenciaci monocytů na makrofágy**

#### **3.4.1 Izolace monocytů**

K 10-15 ml krve byly přidány RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail (50 µl/1 ml krve) (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Kanada) a 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a inkubovány 20 min. při pokojové teplotě. Poté byly vzorky naředěny příslušným objemem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) s 2% FBS (PAA Laboratories, Yeovil, UK) a 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich) a naneseny do zkumavky na vrstvu Ficoll-Paque (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Po centrifugaci se monocyty nacházejí v mezifázi mezi plazmou a vrstvou Ficoll-Paque a ostatní krevní buňky jsou v peletě, neboť jsou selektovány navázáním na komplex protilátek obsažených v RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail. Obohacené monocyty byly promyty v PBS s 2% FBS a 1 mM EDTA a použity k izolaci RNA nebo kultivaci.

#### **3.4.2 Kultivace monocytů**

Izolované monocyty byly kultivovány v 6-jamkových destičkách v mediu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) s 1% Penicilin/Streptomycin (Sigma-Aldrich), 10% FBS (PAA Laboratories, Yeovil, UK), do kterého bylo přidáno 1 ng/ml hematopoetického růstového faktoru Human Interleukin-3 (IL-3) (Biochrom, Cambridge, UK) a 2 ng/ml hematopoetického faktoru regulujícího diferenciaci monocytů na makrofágy Human

Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) (Biochrom) (Miyajima, Mui et al. 1993). Do poloviny jamek byl k buňkám přidán 0,5 mM konduritol  $\beta$ -epoxid (CBE) (Sigma-Aldrich), specifický ireverzibilní inhibitor glukocerebrosidázy. Kultivace probíhala 5 a 12 dní v termostatu v atmosféře syčené 5% CO<sub>2</sub>, při 37°C.

### **3.4.3 Izolace RNA z monocytů a kultivovaných makrofágů**

RNA z monocytů a kultivovaných makrofágů byla izolována kitem BiOstic® Blood Total RNA Isolation Kit (MO-BIO, Carlsbad, CA). Buňky byly nejprve lyzovány roztokem obsahujícím  $\beta$ -merkaptotanol (součástí kitu). Poté byla RNA navázána na kolonku, promyta a následně ošetřena DNázou I (součástí kitu) a eluována.

### **3.4.4 Real-time PCR pro expresi z P1 a P2 v monocytech a makrofázích**

Pro kvantifikaci exprese (viz. 3.1.10) z P1 a P2 během diferenciaci monocytů na makrofágy byly použity TaqMan sondy 3 a 4 (tab. 2). Jako templát byla použita cDNA přeepsaná z RNA (viz. 3.1.3) izolované z monocytů a kultivovaných makrofágů (viz. 3.4.3). Počet kopií mRNA vypočtený metodou kalibračních křivek byl normalizovaný k celkovému množství RNA.

### **3.4.5 Real-time PCR pro expresi ACP5, CHIT1, CD68, CD163, CD14 a TFEB**

Pro kvantifikaci (viz. 3.1.10) markerů k identifikaci makrofágů (ACP5, CHIT1, CD68, CD163, CD14) a TFEB byly použity TaqMan sondy komerčně dodávané firmou Life Technologies (Foster City, CA, USA). Jako templát byla použita cDNA přeepsaná z RNA (viz.3.1.3) izolované z monocytů a kultivovaných makrofágů (viz. 3.4.3). Kvantifikace byla provedena komparativní  $\Delta\Delta Cq$  metodou, s normalizací k GAPDH.

## **3.5 Měření enzymových aktivit**

Všechny vzorky pro měření enzymových aktivit byly sonikovány na přístroji Ultrasonic Homogenizer 4710 Series (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA).

### **3.5.1 Měření aktivity glukocerebrosidázy**

20  $\mu$ l buněčného homogenátu o celkové koncentraci proteinu 30  $\mu$ g bylo inkubováno v mikrotitrační destičce 30 min. při 37°C s 20  $\mu$ l substrátu 4-metylbelloferylyl- $\beta$  - D-glukosidu (4-MUGlc) (Glycosynth, Warrington, Anglie) o koncentraci 5mM v McIlvainově pufru (0,1M citrátový a 0,2M fosfátový pufr, 0,5% taurocholát sodný, 0,4% TritonX-100, pH 5,4). Reakce byla zastavena 200  $\mu$ l 0,2M glycin-NaOH puftrem (pH 10,6). K sestavení kalibrační rovnice byl použit roztok 4-metylbelloferylu (4-MU) (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA). Fluorescence uvolněného 4-MU a kalibrace byla měřena při excitaci 365 nm a emisi 448 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko). Specifická aktivita glukocerebrosidázy je vyjádřena v nmol 4-MU uvolněného ze substrátu 1 mg proteinu homogenátu za 1 minutu.

### 3.5.2 Měření aktivity chitotriosidázy

5  $\mu$ l buněčného homogenátu bylo inkubováno s 40  $\mu$ l roztoku substrátu 4-metylbelliferyl  $\beta$ -D-N,N',N''-triacetylchitotriose (MU-( $\beta$ -GlcNAc)<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o koncentraci 22  $\mu$ M v McIlvainově pufru (0,1M citrátový a 0,2M fosfátový pufr, pH 5,2) 30 min. při 37°C. Reakce byla zastavena 600  $\mu$ l 0,2M glycin-NaOH pufrem (pH 10,6). K sestavení kalibrační rovnice byl použit roztok 4-metylbelliferonu (4-MU) (Sigma-Aldrich). Fluorescence uvolněného 4-MU a kalibrace byla měřena při excitaci 365nm a emisi 448 nm na spektrometru LS50B (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Specifická aktivita chitotriosidázy je vyjádřena v nmol 4-MU uvolněného ze substrátu 1 ml homogenátu za 1 hodinu.

### 3.5.3 Měření aktivity hexosaminidázy

20  $\mu$ l vzorku bylo inkubováno v mikrotitrační destičce 15 min. při 37°C s 20  $\mu$ l substrátu 4-metylbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidu (Glycosynth, Warrington, Anglie) o koncentraci 5 mM v McIlvainově pufru (0,1 M citrátový a 0,2 M fosfátový pufr, 0,05% BSA, pH 4,4). Reakce byla zastavena 200  $\mu$ l 0,2 M glycin-NaOH pufrem (pH 10,6). K sestavení kalibrační rovnice byl použit 1  $\mu$ M roztok 4-metylbelliferonu (4-MU) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fluorescence uvolněného 4-MU a kalibrace byla měřena při excitaci 365 nm a emisi 448 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko). Specifická aktivita hexosaminidázy je vyjádřena v nmol 4-MU uvolněného ze substrátu na 1 mg proteinu za 1 minutu.

### 3.5.4 Měření aktivity alkalické/kyselé fosfatázy

20  $\mu$ l vzorku bylo inkubováno v mikrotitrační destičce 30 min. při 37°C s 90  $\mu$ l reakční směsi, která je připravena smícháním 16 mM *p*-nitrofenylfosfátu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) s pufrem v poměru 1:1. Pufr pro měření alkalické fosfatázy tvořil 50 mM borát sodný/NaOH, pH 9,8, pufr pro měření kyselé fosfatázy tvořil 180 mM acetátový pufr, pH 5,0. Pro měření alkalické fosfatázy byl do reakční směsi přidán 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Reakce byla zastavena přidáním 270  $\mu$ l 0,25 M NaOH. Destička byla centrifugována 1 minutu při

maximálních otáčkách (3 000 g) a 300  $\mu$ l roztoku bylo přepipetováno do nové polystyrenové mikrotitrační destičky. Absorbance roztoku byla měřena při 410 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko). Výsledná aktivita fosfatázy je vyjádřena v nmol *p*-nitrofenolu uvolněného ze substrátu na mg proteinu za 1 minutu. Molární absorpční koeficient *p*-nitrofenolu je 9 620  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ .

### 3.5.5 Měření aktivity sukcinátdehydrogenázy

15  $\mu$ l vzorku bylo inkubováno v polypropylenové mikrotitrační destičce 20 min při 37°C s 80  $\mu$ l substrátu sukcinátu sodného (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) o koncentraci 10 mM v 50 mM fosfátovém pufru, pH 7,5. Následně bylo do reakce přidáno 27  $\mu$ l *p*-iodonitrotetrazoliové violeti - INT (Sigma-Aldrich) o koncentraci 2,5 mg/ml fosfátového pufru. Destička byla inkubována dalších 10 min při 37°C a reakce byla zastavena přidáním 270  $\mu$ l směsi etylacetát/etanol/trichloroctová kyselina v poměru 5:5:1 (v/v/w). Destička byla centrifugována 1 minutu při maximálních otáčkách (3 000 g) a 300  $\mu$ l roztoku nad precipitátem bylo přepipetováno do polystyrenové mikrotitrační destičky. Absorbance roztoku byla měřena při 490 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko). Výsledná aktivita sukcinátdehydrogenázy je vyjádřena v nmol redukovaného INT na mg proteinu, přičemž molární absorpční koeficient redukovaného INT je 19 300  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ .

### 3.5.6 Měření aktivity katalázy

2  $\mu$ l vzorku bylo smícháno s 6  $\mu$ l vzorkového pufru. Vzorkový pufr 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 přidáno 100  $\mu$ l substrátu (2,55 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v roztoku Tris/BSA) a přesně po 1 minutě inkubace při 0 °C byla reakce zastavena 200  $\mu$ l roztoku oxysulfátu titaničitého (0,225 g / 100 ml 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Destička byla centrifugována 1 minutu při maximálních otáčkách (3 000 g) a 280  $\mu$ l roztoku bylo přepipetováno do nové polystyrenové mikrotitrační destičky. Absorbance vzorku byla měřena při pokojové teplotě při 405 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko) a porovnána s hodnotou absorbance substrátu v čase nula. Výsledná aktivita katalázy je v podstatě získána zpětnou titrací H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zbylého po ukončení enzymové reakce a vyjádřena v mU na mg proteinu.

### 3.5.7 Měření aktivity NADPH-cytochrom *c* reduktázy

12,5  $\mu$ l vzorku bylo v mikrotitrační destičce smícháno s 250  $\mu$ l 50 mM fosfátovém pufru, (pH 7,7), 2,5  $\mu$ l 10 mM EDTA, 12,5  $\mu$ l cytochromu *c* (25 mg/ml PBS) a 2,5  $\mu$ l roztoku rotenonu (1 mg/ml etanolu), který slouží jako inhibitor nežádoucí mitochondriální oxidace NADPH. Absorbance vzorku byla měřena při pokojové teplotě při 550 nm na multidetekčním destičkovém readeru Synergy 2 (Dialab, Wiener Neudorf, Rakousko) dokud se neustálila, a poté bylo přidáno 25  $\mu$ l roztoku NADPH (2 mg/ml fosfátového pufru). Směs byla důkladně promíchána a absorbance vzorku byla zaznamenávána po dobu 5 minut v 30 s intervalech. 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., přičemž molární absorpční koeficient redukovaného cytochromu *c* je 27 000  $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ .

## 3.6 Metody užití při izolaci lysosomálních membrán

### 3.6.1 Homogenizace buněčných linií

HEK293 a HeLa buňky sbírané škrábáním byly promyty v TEA pufru (10 mM  $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$ , 1 mM EDTA  $\text{Na}_2$ , 10 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 7,2) s 250 mM sacharózou (Lach-Ner, Neratovice, ČR). Homogenizace byla prováděna v TEA pufru ve skleněném homogenizátoru Dounce homogenizer (Kimble Chase Kontes, Vineland, NJ, USA) při 4°C. Homogenát byl centrifugován v centrifuze 4K15 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 min. při 1 000 g, peleta byla znovu homogenizována a centrifugována. Výsledné supernatanty byly spojeny a centrifugovány 15 min. při 11 000 g pro získání organelové pelety.

### 3.6.2 Lýza lysosomů

Organelová peleta byla resuspendována v pufru obsahujícím 10 mM HEPES, pH 7,2, 250 mM sacharózu (Lach-Ner, Neratovice, ČR), 1 mM EDTA  $\text{Na}_2$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 20 mM metyl ester methioninu (MME) (Sigma-Aldrich) a inkubována 15 - 60 min. za stálého promíchávání v rotátoru Multi Bio RS-24 (Biosan, Riga, Latvia) při pokojové teplotě. Poté byla suspenze přenesena na led a byly přidány inhibitory proteáz - cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostic, Mannheim, Německo) v konečné koncentraci 1x. Suspenze po různě dlouhých inkubacích byly centrifugovány v centrifuze 4K15 (Sigma-Aldrich) 25 min. při 25 000 g a v supernatantech byly měřeny aktivity enzymů hexosaminidázy (viz. 3.5.3) a glukocerebrosidázy (viz. 3.5.1).

### 3.6.3 Příprava lineárního a krokového gradientu

Lineární sacharózový gradient byl připraven z 15 ml 32,5% sacharózy (Lach-Ner, Neratovice, ČR) a 15 ml 55,5% sacharózy v gradientovém mixeru (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) za použití peristaltické pumpy Varioperpex® II Peristaltic Pump (LKB, Bromma, Švédsko). Gradient byl převrstven organelovým koncentrátem po vystavení působení MME. Obdobně byl připraven i krokový gradient, 6 ml 41% nebo 35% sacharózy bylo převrstveno 5 ml 20% sacharózy a 5 ml organelového koncentrátu po vystavení působení MME. Gradienty byly centrifugovány přes noc při 112 700  $g_{max}$  v ultracentrifuze Optima L-90K, rotor SW32 nebo SW32,1 (Beckman-Coulter, München, Německo). Od shora lineárního gradientu bylo odebíráno 19 frakcí po 2 ml a z krokového gradientu 16 frakcí po 1 ml nebo proužek z 20/41% sacharózového rozhraní. Frakce s nejvyšší aktivitou glukocerebrosidázy (viz. 3.5.1) byly naředěny pufrům 10 mM Tris, pH 7,2 a centrifugovány 2h při 250 000  $g_{max}$  v ultracentrifuze Optima L-90K, rotor 70 Ti rotor (Beckman-Coulter). Získaná peleta byla resuspendována v tomtéž pufru a zmražena v tekutém dusíku.

### 3.6.4 Měření změny pH pomocí akridinové oranže

Změny pH byly měřeny pomocí akridinové oranže (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) podle metody popsané Dell'Antone (Dell'Antone 1979). K reakčnímu roztoku (20 mM HEPES, pH 7,2, 0,2 M sacharóza, 50 mM KCl a 20  $\mu$ M akridinová oranž) byla přidána frakce lysosomálních membrán (10  $\mu$ g proteinu) a byla měřena absorbance při 492 nm na fotometru Shimadzu UV-2550 (Shimadzu, Duisburg, Německo). Poté, co se absorbance stabilizovala, bylo do jedné reakce přidáno 2 mM ATP (Sigma-Aldrich) a 2 mM  $MgCl_2$ , po více než 2 min. byl přidán 10 mM  $(NH_4)_2SO_4$  a do druhé reakce byl přidán pouze  $(NH_4)_2SO_4$ . Absorbance byla měřena v průběhu cca 6 minut.

### 3.6.5 Western blot

10  $\mu$ g proteinu z každé frakce během purifikace lysosomálních membrán bylo rozděleno na 7-15% SDS-PAGE (viz. 3.1.12) a blotováno na PVDF membránu (viz. 3.1.13). K detekci LAMP1 byla použita primární protilátka anti-LAMP1 rabbit polyclonal antipody (1:5 000, darováno Dr. Carlssonem, University of Umea, Švédsko) a sekundární protilátka goat anti-rabbit IgG (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).



### **3.7 Detekce LC3-II**

Myší mozky byly homogenizovány v sacharózovém pufru obsahujícím 250 mM sacharózu (Lach-Ner, Neratovice, ČR), 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1x inhibitory proteáz - cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Diagnostic, Mannheim, Německo) ve skleněném homogenizátoru Dounce homogenizer (Kimble Chase Kontes, Vineland, NJ, USA) při 4°C. Po 10 min. centrifugaci v centrifuze 4K15 (Sigma-Aldrich) při 500 g, 4°C byl supernatant naředěn sacharózovým pufrem obsahujícím 1% Triton X-100 a inkubován 1h při 4°C. Po následné centrifugaci 15 min. při 13 000 g byl výsledný supernatant separován na 15% SDS-PAGE (viz. 3.1.12). Western blot byl proveden (viz. 3.1.13) s primární protilátkou anti-LC3 (1:2 000, Sigma-Aldrich) a 12G10 anti- $\alpha$ -tubulin (DSHB, Iowa city, IA, USA).

Metody, na jejichž provádění jsem se nepodílela, zde nejsou uvedeny (např. metody prováděné spolupracujícím zahraničním pracovištěm).

## 4 Výsledky a diskuze

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

V této části projektu jsem popsala a podrobně charakterizovala alternativní promotor genu *GBA* (publikace 9.3).

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

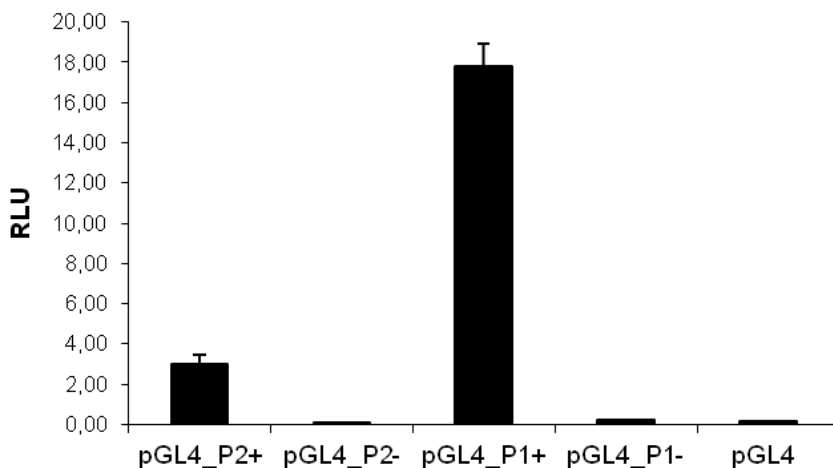
V nukleotidových databázích NCBI (GenBank, červen 2010) jsme našli pět alternativních transkriptů genu *GBA*, z nichž čtyři jsou zjevně přepisovány z alternativního promotoru, neboť obsahují na svém 5'konci jeden nebo dva exony, které neobsahují sekvenci odpovídající sekvenci v úseku DNA mezi popsaným promotorem a prvním exonem. Tyto dva předpokládané exony jsme pojmenovali exony -1 a -2. Varianta 1 (Acc. No. NM\_000157.2) je přepisována z promotoru (P1) ležícího v bezprostřední blízkosti exonu 1 ve směru 3'-5' (Horowitz, Wilder et al. 1989). Varianty 2 (Acc. No. NM\_001005741.1) a 3 (Acc. No. NM\_001005742.1) obsahují jeden exon navíc (exon -2), liší se v devatenácti nukleotidech mezi exonem -2 a 1. Varianty 4 (Acc. No. NM\_001005749.1) a 5 (Acc. No. NM\_001005750.1) mají dva exony navíc (exon -1 a -2) a liší se ve třech nukleotidech na rozhraní těchto exonů (viz. publikace 9.3, fig. 1). 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.

Prokázali jsme, že sekvence ležící ve směru 3'-5' od exonu -2 (-1509 až -353) slouží jako alternativní promotor genu *GBA* (P2 promotor). P2 spouští transkripci reporterového genu markantně více oproti kontrolnímu plasmidu pGL4 a P2 klonovanému do reporterového vektoru v opačné orientaci. Relativní luciferázová aktivita z P1 byla naměřena  $17.82 \pm 1.10$  RLU (relativní luciferázová jednotka), zatímco aktivita z P2 byla  $3.01 \pm 0.43$  RLU (obr. 4.1).

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 bp od začátku transkripce ve směru 3'-5' a regulačních sekvencí ležících ve směru transkripce.



**Obr. 4.1: Luciferázová aktivita P1 a P2**

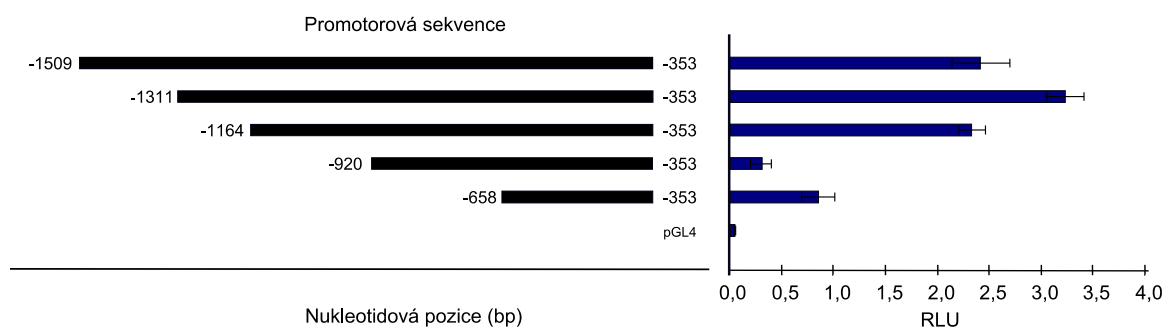
V grafu je znázorněna luciferázová aktivita P1 (pGL4\_P1)+ a P2 (pGL4\_P2)+ v RLU (relativní luciferázová jednotka). Výsledky jsou znázorněny se směrodatnou odchylkou tří měření z transfekcí v oddělených jamkách v jednom pokusu. pGL4 vektor bez promotorové sekvence byl použit jako negativní kontrola, byla u něj naměřena téměř nulová luciferázová aktivita stejně jako u vektorů s promotory v opačné orientaci (pGL4\_P1)- a (pGL4\_P2)-.

Pro bližší charakterizaci P2 byly provedeny cílené delece na 5'konci P2, které ukázaly, že při deleci úseku -1164 až -920 dochází 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 (obr. 4.2).

Sekvenční alignment (viz. publikace 9.3, supplementary data) ukázal, že P2 je konzervovaný u primátů. Nejvíce homologní sekvence byla nalezena u šimpanze, gorily a orangutana. Exon -1 byl nalezen pouze u gorily. Nenachází se u myši a dalších druhů, nenalezli jsme u nich žádné odpovídající mRNA, což znemožňuje jejich studium na myších modelech.

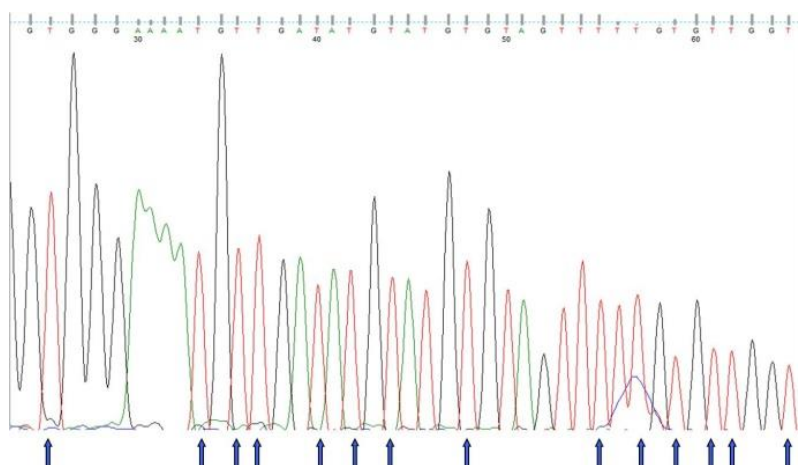
Bisulfitovým sekvenováním jsme prokázali, že CpG ostrůvek v oblasti P2 je nemetylovaný, což také svědčí pro aktivní promotor (obr. 4.3). Zhruba polovina promotorových oblastí u

savců se nachází v oblasti CpG ostrůvků (Suzuki, Tsunoda et al. 2001), které jsou nemetylované a jsou tak přístupné pro vazbu transkripčních faktorů.



**Obr 4.2: Luciferázová aktivita P2 s delecemi na 5'konci**

V grafu jsou znázorněny sekvence P2 s delecemi na 5'konci a RLU (relativní luciferázová aktivita) každého delečního konstruktů se směrodatnou odchylkou tří měření z transfekcí v oddělených jamkách v jednom pokusu. pGL4 vektor bez promotorové sekvence byl použit jako negativní kontrola.



**Obr 4.3: Sekvence CpG ostrůvku v P2 po bisulfitovém sekvenování**

Šipky ukazují nemetylované cytosiny, které po ošetření bisulfitem sodným konvertují na uracily.

Výše uvedené výsledky svědčí pro to, že P2 je skutečně alternativním promotorem GBA. Předpokládaný promotorový úsek je nemetylovaný, nachází se v oblasti konzervované u primátů, spouští transkripci reporterového genu a odpovídající transkripty lze detekovat pomocí RT-PCR.

### 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) (viz. publikace 9.3, fig. 2). 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. Navrhli jsme tři TaqMan sondy (tab. 2), sonda 1 leží ve směru 3'-5' od -563, sonda 2 od -413 a sonda 3 od -347 (viz. publikace 9.3, fig. 2). Ze sondy 3 byl naměřen 300-krát vyšší signál než ze sondy 1, signál ze sondy 2 byl pouze 2-krát vyšší než ze sondy 1. Tyto výsledky potvrdily, 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), což jsou krátké vysoce nestabilní RNA, které se obvykle nacházejí 0,5 – 2,5 kb ve směru 3'-5' od aktivního začátku transkripce a zřejmě napomáhají transkripci změnami chromatinové struktury (Preker, Nielsen et al. 2008). PROMPTs jsou příbuzné CUTs (cryptic unstable transcripts) u *S. cerevisiae*, předpokládá se, že se vyskytují u většiny promotorů prepisovaných RNA polymerázou II, jsou zvláště hojné u promotorů genů bez TATA boxu a s CpG ostrůvky. Na rozdíl od mRNA se vyskytují převážně nukleárně. Během poslední dekády byla popsána řada labilních RNA, které vycházejí z netypických míst v promotorových oblastech genů. U CUTs se předpokládá, že transkripční faktory navázané na promotor mohou vytvořit atypické přediniciační komplexy - podobný model může platit i u PROMPTs (Preker, Almvig et al. 2011).

### 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 (sonda 4) (tab. 2) bylo velmi složité z důvodu vysoké sekvenční homologie s pseudogenem *GBA*. Proto jsme sondu 4 nejprve testovali absolutní kvantifikací s oligonukleotidy komplementárními k *GBA* genu a pseudogenu a zjistili jsme, že sonda se specificky váže na sekvenci genu. 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 (viz. publikace 9.3, tab. 3).

Zjistili jsme, že relativní exprese genu pro glukocerebrosidázu 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 (Doll and Smith 1993). 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. Vždy se jednalo o tkáň získané od tří osob různého stáří. Ve výše zmíněných studiích byly použity nádorové buněčné linie, jejichž vlastnosti se liší od základních buněčných typů.

Detekovali jsme transkripty z obou promotorů ve 20 různých tkáních. Přestože jsme neměřili absolutní množství transkriptů z každého promotoru, poměr exprese z P1 a P2 byl velmi podobný u všech studovaných tkání (viz. publikace 9.3, fig. 5). Ačkoli jsme nenašli výrazné rozdíly v poměru exprese z obou promotorů, není zřejmé, zda jsou oba promotory společně regulovány, kromě možné regulace transkripčním faktorem EB (TFEB). Jak je uvedeno níže (viz. 4.1.6) P2 na rozdíl od P1 neobsahuje TATA box a naopak se překrývá s CpG ostrůvkem. Oba promotory mají odlišné konvenční sekvence pro vazbu transkripčních faktorů. U P1 je přítomen CAT box, AP-1, PEA3, OBP, CBP, není přítomen GC box. Naproti tomu v P2 kromě výše uvedených rozdílů jsou potenciální vazebná místa pro Sp1, GATA-1, AP-1, YY1, CREB, CRE-BP, E2F. Oba promotory patří do odlišných konvenčně rozlišovaných tříd promotorů (s TATA boxem (TATA-containing promoter) a bez TATA boxu (TATA-less promoter)), pro které se předpokládá jiný způsob regulace. S výjimkou možné vazby AP-1 se liší i predikovaná vazebná místa pro transkripční faktory.

Nezkoumali jsme, jaký je poměr exprese čtyř transkriptů, které jsou přepisovány z P2 a které zjevně vznikají alternativním sestřihem. Důvodem byla malá rozdílnost sekvence jednotlivých transkriptů, která neumožňovala navržení vhodných sond pro real-time PCR. Použitá metoda však používá sondu a primery, které nasedají na všechny alternativní transkripty a tím umožňuje detekovat všechny transkripty přepisované z P2. 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 a P2 promotorových sekvencí 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. U jednoho pacienta byl nalezen známý polymorfismus rs10908459 v heterozygotním stavu. Předpokládali jsme, 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. Tato hypotéza nebyla potvrzena, 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 (Doll and Smith 1993; Doll, Bruce et al. 1995). Další srovnání promotorů P1 a P2 je uvedeno výše (viz. 4.1.4).

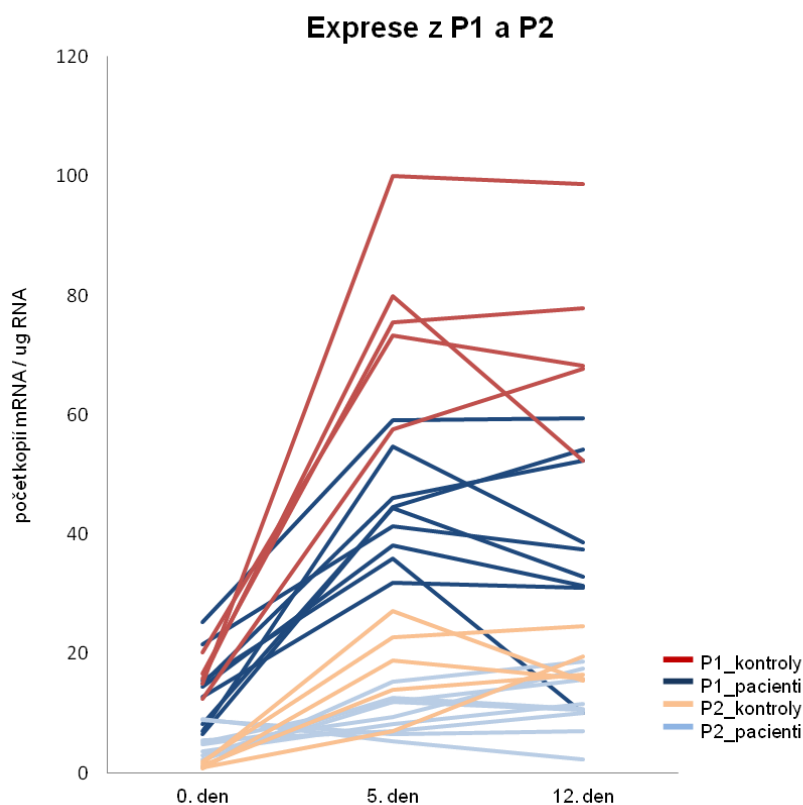
V sekvenci P2 jsme našli dva potenciální CLEAR motivy, které se hojně vyskytují v promotorech lysosomálních genů. Na tuto konvenční sekvenci se váže transkripční faktor EB (TFEB), který se podílí na regulaci exprese lysosomálních genů (Sardiello, Palmieri et al. 2009). CLEAR motivy v P2 se nacházejí 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 (Palmieri, Impey et al. 2011).

#### 4.1.7 Expresa z P1 a P2 během diferenciacie monocytů na makrofágy

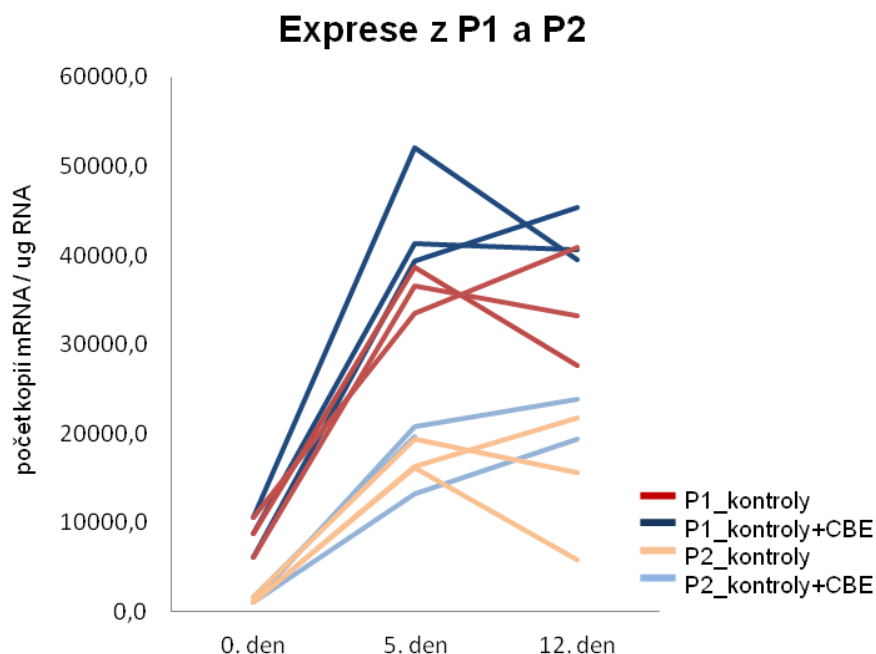
Ačkoli jsme při vyšetření exprese z promotorů P1 a P2 nenalezli rozdíly mRNA v různých tkáních (viz 4.1.5), nemohli jsme vyloučit, že dochází k diferenciaciální expresi z P2 či P1 během vývoje monocytů na makrofágy a/nebo v důsledku změn exprese vyvolaných lysosomálními stádáním. Protože k masivnímu stádání glukosylceramidu dochází u Gaucherovy choroby pouze v buňkách makrofágového původu, které díky tomu získávají charakteristickou morfologii Gaucherových buněk, měřili jsme, jak se mění exprese z promotorů P1 a P2 během diferenciacie monocytů na makrofágy.

Monocyty izolované z buněk periferní krve pacientů s Gaucherovou chorobou a kontrolních osob jsme stimulovali IL-3 a M-CSF podle Miyajima et al. 1993 (Miyajima, Mui et al. 1993). Během další kultivace jsme sledovali expresi markerů makrofágů pomocí real-time PCR. V průběhu diferenciacie se exprese z obou promotorů vztažená na množství celkové RNA zvyšovala jak u kontrol, tak u pacientů. Expresa z P1 byla u všech vzorků vyšší než z P2 (obr. 4.4 A), což odpovídá výsledkům luciferázové eseje, které svědčí pro to, že P2 je slabší promotor.

A





**B**

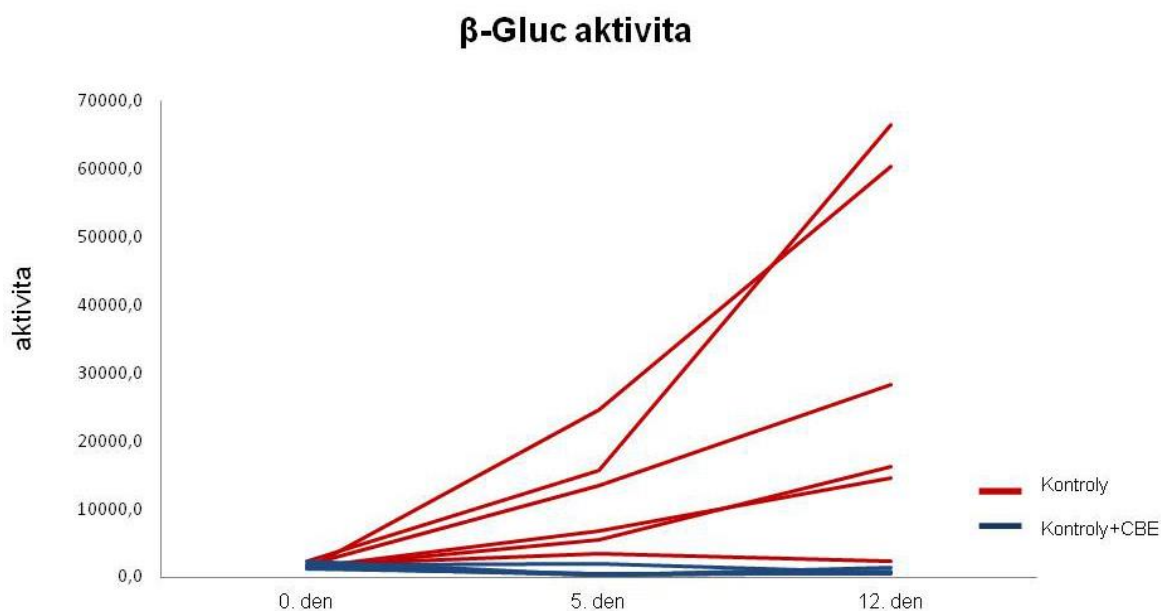
**Obr 4.4: Expres z P1 a P2 během diferenciacie monocytů na makrofágy**

Grafy udávají počet kopií mRNA odečtených z kalibračních křivek pro P1 a P2 a normalizovaných na množství celkové RNA. Množství mRNA bylo měřeno 0., 5. a 12. den kultivace ve vzorcích pacientů a kontrol (A) a ve vzorcích vystavených působení specifického ireverzibilního inhibitoru glukocerebrosidázy - konduritol  $\beta$ -epoxidu (CBE) a kontrol (B).

Protože jsme měli k dispozici pouze vzorky pacientů, kteří jsou léčeni ERT a exprese mRNA pro glukocerebrosidázu u nich může být hypoteticky ovlivněna dodávkou externího enzymu, používali jsme také vzorky získané od kontrolních osob, které byly vystaveny působení konduritol  $\beta$ -epoxidu (CBE). CBE je specifický ireverzibilní inhibitor  $\beta$ -Gluc, který při systémovém podání laboratorním zvířatům zapříčiňuje masivní střídání glukosylceramidu a vznik Gaucherových buněk (Newburg 1988). U vzorků vystavených působení CBE jsme také naměřili vyšší expresi z P1 než z P2 stejně jako u kontrolních vzorků (obr. 4.4 B). Expres z obou promotorů byla však mírně zvýšená u vzorků s inhibovanou aktivitou  $\beta$ -Gluc oproti kontrolním vzorkům, na rozdíl od pacientů, kde byla exprese z obou promotorů nižší než u kontrol. Důvod toho rozdílu není zřejmý. Pokud přítomnost exogenní  $\beta$ -Gluc pocházející z ERT vede k útlumu její endogenní exprese, může to alespoň z části vysvětlit popsané změny. Rychlost úbytku  $\beta$ -Gluc v krysích peritoneálních makrofázích byla 1,4 % za hodinu (Das, Murray et al. 1986). Pokud je tato hodnota srovnatelná s rychlostí odbourávání  $\beta$ -Gluc i v našem *in vitro* modelu, je málo pravděpodobné, že by po několika dnech zbývala

v kultivovaných buňkách exogenní  $\beta$ -Gluc, která by mohla vést k transkripční represi. CBE je ireverzibilní inhibitor, který se kovalentně váže do aktivního centra enzymu a lze předpokládat, že v použitých koncentracích vede prakticky k plné inhibici  $\beta$ -Gluc. Kompletní deficit  $\beta$ -Gluc není u člověka slučitelný se životem, zatímco všichni žijící pacienti mají nějakou reziduální aktivitu a nesou alespoň jednu mírnou nebo těžkou mutaci v genu GBA. Všichni pacienti v malém souboru, který jsme zkoumali, byli pacienti s typem 1 Gaucherovy choroby, u kterého se nevyskytuje neurologické postižení. U tohoto typu lze předpokládat vyšší zbytkovou aktivitu než u typů 2 a 3 s neurologickým postižením (Beutler and Gelbart 1996). Přítomnost zbytkové aktivity by tedy mohla hypoteticky vést k menší indukci exprese  $\beta$ -Gluc v buňkách od pacientů než v buňkách s aktivitou inhibovanou CBE.

Abychom ověřili, že  $\beta$ -Gluc je u vzorků vystavených působení CBE inhibována, měřili jsme aktivitu  $\beta$ -Gluc. Během diference byla aktivita  $\beta$ -Gluc téměř nulová u všech vzorků vystavených působení CBE, zatímco u kontrolních vzorků aktivita  $\beta$ -Gluc stoupala během diference v makrofágy více než 10 000-krát (obr. 4.5).

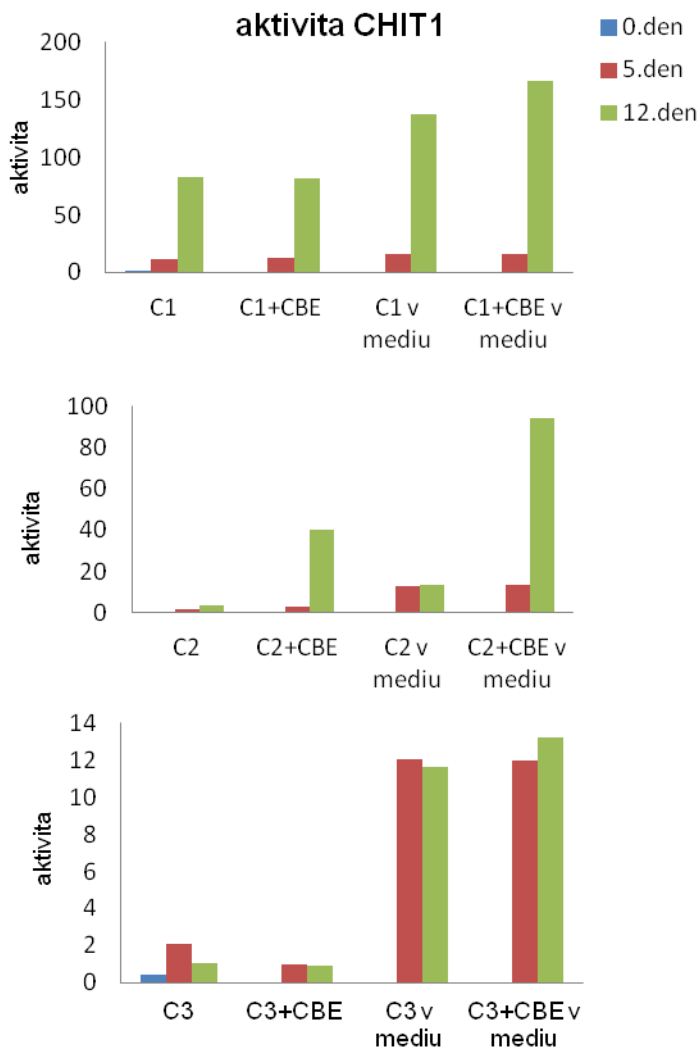


**Obr. 4.5: Aktivita glukocerebrosidázy během diference monocytů na makrofágy *in vitro***  
 Glukocerebrosidázová aktivita byla měřena u vzorků kontrolních a vystavených působení CBE. Aktivita je vyjádřena v nmol 4-MU uvolněného ze substrátu 4-MUGlc 1mg proteinu za 1 minutu.

K identifikaci diferencovaných makrofágů jsme použili několik markerů. Tartarát rezistentní kyselá fosfatáza (ACP5) je lysosomální enzym hojně exprimovaný v makrofázích, nebyl detekován v monocyttech (Bevilacqua, Lord et al. 1991). Exprese tohoto enzymu měřená pomocí real-time PCR se zvyšovala v závislosti na diferenciaci monocytů na makrofágy (obr 4.7).

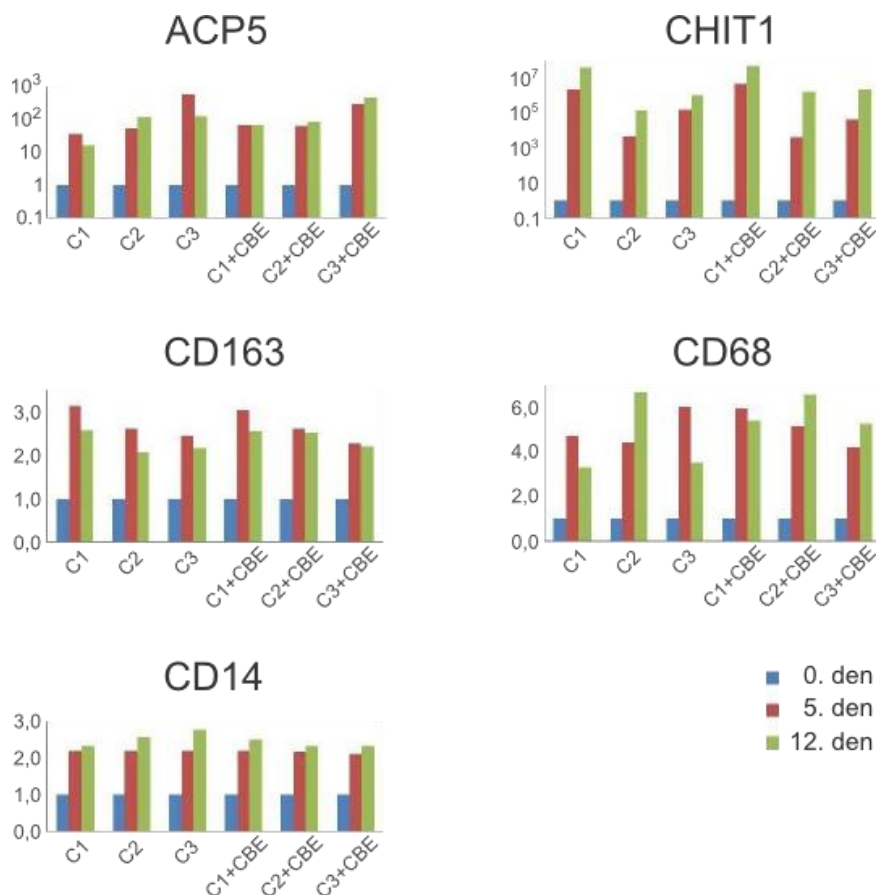
Chitotriosidáza (CHIT1) je enzym vylučovaný makrofágy, jeho aktivita je v plazmě pacientů výrazně zvýšená, může tak sloužit jako pomocný diagnostický nástroj Gaucherovy choroby (Hollak, van Weely et al. 1994). Využívá se pro monitorování léčby Gaucherovy choroby. Není však využitelný u všech osob díky častému výskytu duplikace v genu pro chitotriosidázu projevující se sníženou aktivitou tohoto enzymu. Mírně zvýšenou aktivitu CHIT1 jsme pozorovali už 5. den diferenciaci, 12. den se mnohonásobně zvýšila. Výrazně zvýšenou aktivitu jsme naměřili v mediu, neboť CHIT1 je makrofágy vylučována (obr 4.6). Exprese měřená pomocí real-time PCR byla 5. den kultivace mírně zvýšená a během diferenciaci se výrazně zvyšovala (obr 4.7). Dřívější Northern blot analýzy ukázaly, že exprese *CHIT1* mRNA se objevuje až v pozdějších stádiích diferenciaci monocytů na makrofágy, byla detekována až 7. den kultivace, exprese *ACP5* mRNA se objevuje už 2. den kultivace a s časem výrazně stoupá stejně jako exprese *CHIT1* mRNA (Boot, Renkema et al. 1995). To potvrzují i naše výsledky, kde byla exprese těchto markerů 12. den kultivace výrazně vyšší než 5. den.

V souhrnu lze konstatovat, že zvyšující se exprese CHIT1 a ACP5 spolu s markery diferenciaci monocytů na makrofágy CD163, CD68 a CD14 svědčí pro přeměnu monocytů na makrofágy (obr. 4.7). Dynamika exprese těchto markerů ukazuje, že tento proces je většinou kompletní 12. den kultivace a delší doba kultivace nevedla k dalšímu zvyšování.



**Obr 4.6: Aktivita chitotriosidázy během diferenciacie monocytů na makrofágy *in vitro***

Aktivita chitotriosidázy byla měřena u vzorků kontrolních (C1-3) a vystavených působení CBE (C1-3 + CBE) a zároveň i v jejich médiu. Aktivita je vyjádřena v nmol 4-MU uvolněného ze substrátu MU-( $\beta$ -GlcNAc)<sub>3</sub> 1ml homogenátu za 1 hodinu.

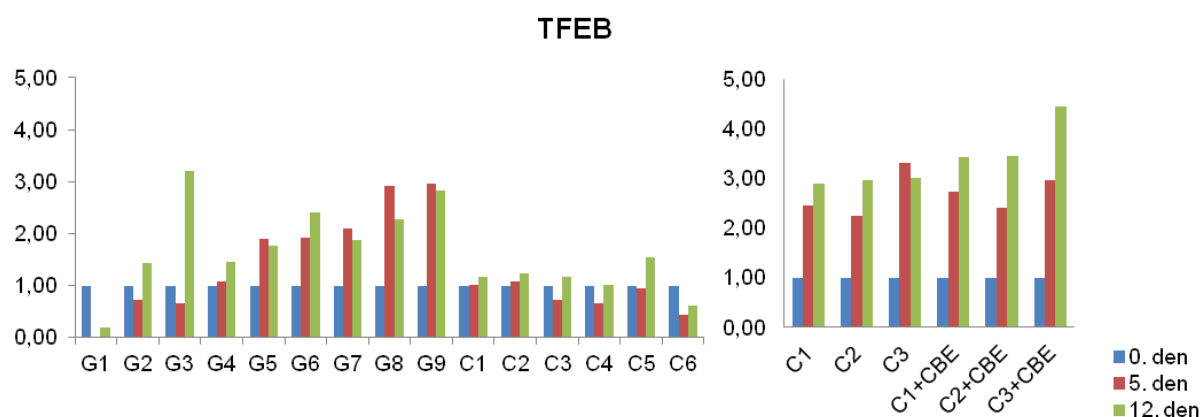


**Obr. 4.7: Expres markerů charakteristických pro diferenciaci monocytů na makrofágy**

Grafy znázorňují relativní hodnoty exprese jednotlivých genů u vzorků kontrolních (C1-3) a vystavených působení CBE (C1-3 + CBE) normalizované k *GAPDH*.

Dále jsme měřili změnu exprese TFEB v monocytech a diferencovaných makrofázích. Transkripční faktor EB (TFEB) se podílí na regulaci exprese lysosomálních genů (Sardiello, Palmieri et al. 2009). V P2 promotoru jsme našli pomocí predikčních programů dva sekvenční motivy pro vazbu TFEB, v P1 promotoru se nacházejí také dva CLEAR motivy. 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 k rozšíření lysosomálního systému v souvislosti s jejich fagocytární funkcí. K výraznému zvýšení exprese TFEB v makrofázích došlo u vzorků pacientů s Gaucherovou chorobou, 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 u vzorků vystavených působení CBE (obr. 4.8). 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. Studie zatím nebyla opakována, protože jsme neměli nadále přístup k pacientům s Gaucherovou chorobou pro opakovaný odběr krve.



**Obr 4.8: Expres TFEB**

Grafy znázorňují relativní hodnoty exprese TFEB normalizované k *GAPDH* ze dvou různých pokusů u vzorků pacientů (G), kontrolních (C) a vystavených působení CBE (C+ CBE).

Během diferenciaci monocytů na makrofágy je více využíván P1, u vzorků kontrolních osob, pacientů s Gaucherovou chorobou, kteří jsou léčeni ERT a vzorků s inhibovanou  $\beta$ -Gluc pomocí specifického ireverzibilního inhibitoru CBE byla exprese z P1 vyšší než z P2. Zároveň jsme zjistili, že exprese z obou promotorů je během diferenciaci vyšší než exprese v izolovaných monocytech. Izolované monocyty vystavené působení CBE jsme kultivovali v přítomnosti hematopoetického faktoru regulujícího diferenciaci monocytů na makrofágy (Miyajima, Mui et al. 1993) a po 5 a 12 dnech kultivace jsme naměřili téměř nulovou aktivitu glukocerebrosidázy. U kontrolních vzorků bez působení CBE aktivita glukocerebrosidázy s diferenciací (dobou kultivace) rostla. Abychom ověřili, že monocyty kultivované 12 až 16 dní v přítomnosti hematopoetického faktoru regulujícího diferenciaci monocytů na makrofágy se diferencují na makrofágy, vybrali jsme nejčastější markery používané k identifikaci diferencovaných makrofágů – 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 diferenciaci jsme pozorovali při expresi CHIT1 a ACP5. Relativní exprese TFEB, hlavního regulátoru lysosomální biogeneze, byla u většiny vzorků v makrofázích zvýšená, s velkým rozptylem hodnot.

V souhrnu lze konstatovat, že promotory P1 a P2 nejsou rozdílně využívány během přeměny monocytů na makrofágy *in vitro*, stejně tak jsme nepozorovali rozdílné využívání promotorů u makrofágů odvozených od kontrolních osob a od osob s Gaucherovou chorobou. Obdobně tomu bylo u buněk, u kterých byla glukocerebrosidáza ireverzibilně inhibována CBE.

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

Gen pro lidskou lysosomální N-acetyltransferázu (*HGSNAT*) byl popsán v roce 2006, ale jeho promotor nebyl studován. Cílem mé práce bylo provést základní charakterizaci tohoto promotoru, prozkoumat sekvenci promotoru u pacientů s MPS IIIC a zjistit, zda nalezené varianty sekvence vedou ke změně exprese genu (viz. publikace 9.6).

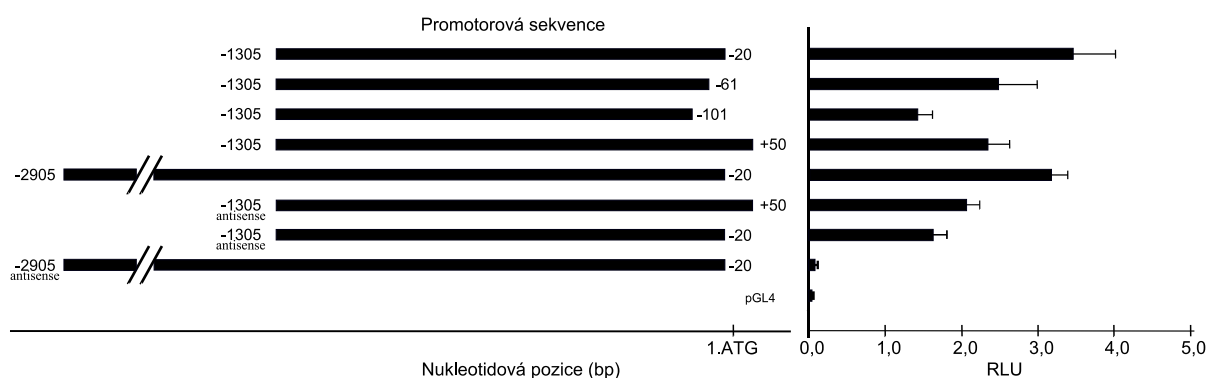
### **4.2.1 Gen *HGSNAT* má dva hlavní začátky transkripce**

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 začátky transkripce v oblasti promotoru, v pozicích -1 a -15 (vztaženo k A v 1. ATG, downstream). V dřívější studii (Hrebicek, Mrazova et al. 2006) jsme byli schopni amplifikovat RT-PCR produkty vzdálené ve směru 3'-5' od těchto začátků, což nasvědčuje tomu, že alespoň část transkriptů může využívat jako iniciační kodon ATG v pozici -84 (upstream ATG). Tyto výsledky nebyly potvrzeny 5'RACE. Je možné, že dále ve směru 3' - 5' od pozice -84 začíná pouze zlomek transkriptů, které reprezentují krátké, vysoce nestabilní RNA nacházející se obvykle 0,5 – 2,5 kb ve směru 3'-5' od aktivního začátku transkripce, tzv. promoter upstream transcripts (PROMPTs) (Preker, Nielsen et al. 2008). PROMPTs byly podrobněji diskutovány výše (viz. 4.1.3). Výsledky z 5'RACE ukazují, že hlavní místa pro iniciaci transkripce se nacházejí v pozicích -1 a -15 a pouze minimální množství transkriptů začíná dále ve směru 3'-5'.

Pomocí bisulfitového sekvenování jsme zjistili, že CpG ostrůvek překrývající se s místy začátku transkripce je nemetylovaný, což je typické pro aktivní promotory. Nemetylované CpG ostrůvky jsou typické pro promotory neobsahující TATA box.

#### 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 luciferázy. 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) (obr. 4.9). Oblast -101 až -20 je zřejmě důležitá pro úplnou transkripční aktivitu. Naopak delší konstrukt na 3'konci pGL4 (-1305/+50) vykazoval nižší luciferázovou aktivitu než pGL4 (-1305/-20). U všech konstruktů byla naměřena výrazně vyšší luciferázová aktivita než v kontrolním pGL4 vektoru.



**Obr 4.9: Luciferázová aktivita *HGSNAT* promotoru**

V grafu jsou znázorněny různě dlouhé sekvence promotoru a jejich RLU (relativní luciferázová aktivita) včetně některých promotorových sekvencí v opačné orientaci (antisense) se směrodatnou odchylkou tří měření z transfekcí v oddělených jamkách v jednom pokusu. pGL4 vektor bez promotorové sekvence byl použit jako negativní kontrola.

Konstrukty pGL4 se zaklonovanými sekvencemi (-1305/-20, -1305/+50) v opačné orientaci také spouštěly transkripci reporterového genu. Luciferázová aktivita byla mírně zvýšená oproti kontrolnímu pGL4 (obr. 4.9). To by mohlo ukazovat na přítomnost bidirekcionálního promotoru. Dříve byly tyto promotory spojovány především s transkripcí genů kódujících proteiny v obou směrech (na vlákně sense i antisense). Pro tyto promotory je charakteristická přítomnost GC-boxu v blízkosti začátku transkripce (Trinklein, Aldred et al. 2004). I když dochází k přepisu genů v obou orientacích, obvykle je jeden z genů upřednostněn. To může

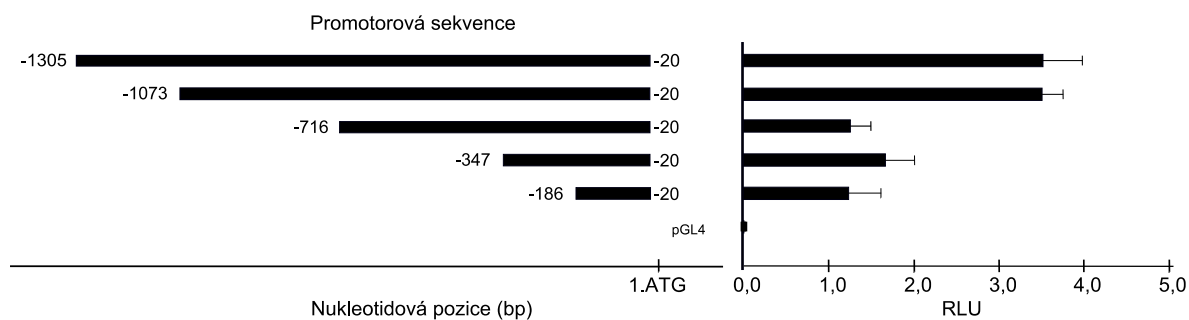


být způsobeno několika faktory: vlastní sekvencí v oblasti promotoru nebo v jeho blízkosti, chromatinovou modifikací nebo 3D strukturou transkriptu. Nedávné studie zaměřené na nekódující RNA (ncRNA), které využívaly i luciferázové reporterové eseje, ukázaly, že se nekódující transkripty často vyskytují 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 (Wei, Pelechano et al. 2011). Funkce ncRNA je spojována s regulací exprese genů jak v bezprostřední blízkosti, tak i genů vzdálených tím, že transkripce ncRNA soustřeďuje transkripční elementy (RNA polymerázu, transkripční faktory) a ovlivňuje strukturu chromatinu.

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 (obr. 4.9). Je to zřejmě způsobeno oddálením důležitých promotorových elementů od reporterového genu nebo vložením represoru přítomného ve směru 3'-5'.

Pro nalezení elementů důležitých pro aktivitu promotoru jsme vytvořili mutantní konstrukty, v sekvenci promotoru -1305/-20 jsme vytvořili delece na 5'konci (obr. 4.10). Luciferázová aktivita delečního konstruktu pGL4 (-1073/-20) byla na podobné úrovni jako aktivita z konstruktů obsahujícího celou sekvenci promotoru pGL4 (-1305/-20). K výraznému poklesu aktivity však došlo při měření dalších delečních konstruktů (pGL4 -716/-20, pGL4 -347/-20 a pGL4 -186/-20) (obr. 4.10). V oblasti -716 až -1073 se zřejmě nachází elementy pozitivně ovlivňující transkripci, neboť při deleci tohoto úseku luciferázová aktivita výrazně poklesla. Tyto výsledky z luciferázové eseje nasvědčují tomu, že oblast -1073 až -20 je důležitá pro spouštění transkripce genu *HGSNAT*.



**Obr 4.10: Luciferázová aktivita promotoru *HGSNAT* s delecemi na 5' konci**

V grafu jsou znázorněny sekvence promotoru s delecemi na 5' konci a RLU (relativní luciferázová aktivita) každého delečního konstruktů se směrodatnou odchylkou tří měření z transfekcí v oddělených jamkách v jednom pokusu. pGL4 vektor bez promotorové sekvence byl použit jako negativní kontrola.

### 4.2.3 Analýza vazby transkripčních faktorů v promotoru

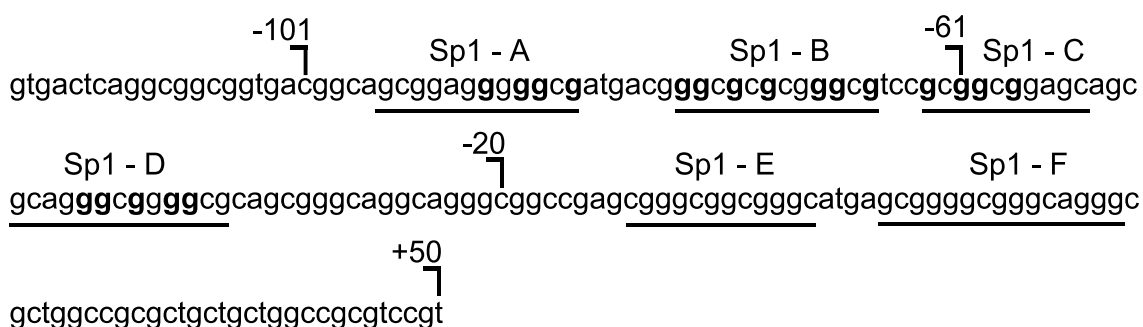
Sekvence promotoru -1073/-20 byla analyzována pro přítomnost vazebných míst pro transkripční faktory pomocí predikčních programů. Nebyla nalezena žádná konvenční sekvence pro TATA box ani CAT box. Bylo nalezeno několik potenciálních vazebných míst pro transkripční faktory Sp1 a dále vazebná místa pro, AP-1, AP-2, CREB, NRSF, EGR. Šest vazebných míst pro Sp1 bylo nalezeno v oblasti -101 až +50 (obr 4.11). Vazebná místa pro Sp1 jsou hojná v promotorech lysosomálních genů, u cystinózy, onemocnění způsobeného deficitem lysosomálního transportního proteinu cystinozinu (Phornphutkul, Anikster et al. 2001), 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. Luciferázovou esejí jsme zjišťovali, zda tato místa ovlivňují promotorovou aktivitu. 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 (Sp1-E a Sp1-F), která se vyskytují 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 transkripční faktor Sp1. Luciferázovou aktivitu konstruktů s mutovanými vazebnými místy jsme porovnávali s luciferázovou aktivitou konstruktů pGL4 (-1305/-20). V konstruktech s mutovaným vazebným místem pro Sp1-A a Sp1-D došlo k výraznému poklesu luciferázové aktivity (obr. 4.12), 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. Toto zvýšení může být zapříčiněno

málo známou inhibiční funkcí faktoru Sp1 (Zaid, Hodny et al. 2001). Nebo toto zvýšení aktivity může být vysvětleno vytvořením nových vazebných míst pro transkripční faktory, které nebyly odhaleny predikčními programy při kontrole mutovaných konstruktů.

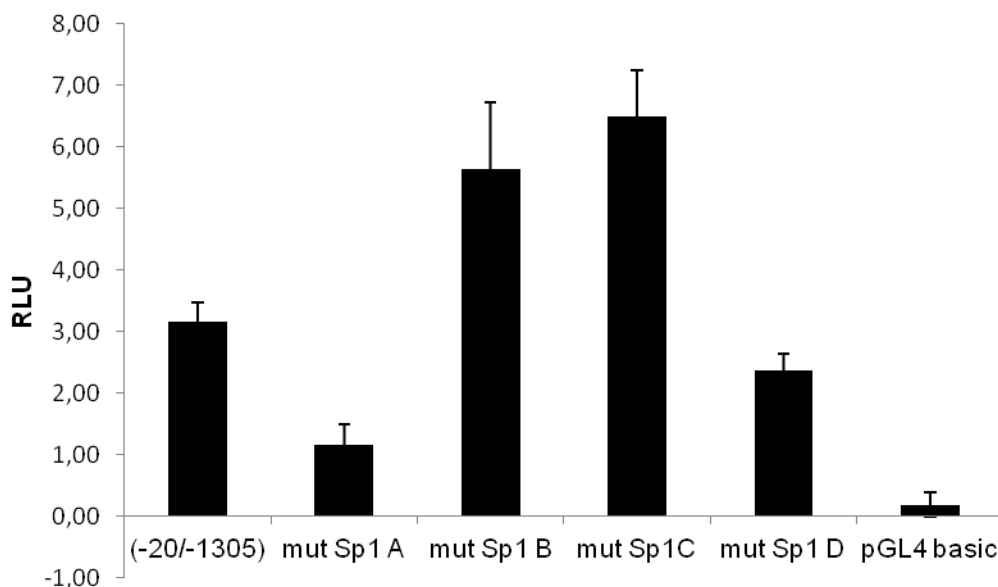
Přítomnost vazebných míst pro Sp1 v oblasti -101 až -20 byla potvrzena pomocí ChIP (chromatinová imunoprecipitace). Jako pozitivní kontrola pro PCR amplifikaci byl použit celkový chromatin (INPUT) a DNA imunoprecipitovaná pomocí protilátky anti-Histone H3. 258 bp fragmenty zahrnující promotorovou oblast -101 až -20 byly amplifikovány v obou těchto kontrolách i v DNA imunoprecipitované pomocí protilátky anti-Sp1 (obr. 4.13). Zároveň jsme pro kontrolu ChIP amplifikovali úsek promotoru *SLC22A18* genu, kde byla popsána vazebná místa pro Sp1 dříve (Ali, Bajaj et al. 2009). Amplifikace úseku obsahujícího vazebná místa pro Sp1 z imunoprecipitátu připraveného s protilátkou anti-Sp1 potvrzuje vazbu Sp1. Výsledky příslušných kontrolních experimentů nesvědčily pro falešnou pozitivitu.

V sekvenci promotoru jsme pomocí predikčních programů našli dva motivy CLEAR, které jsou rozpoznány TFEB účastníkem se regulace exprese lysosomálních genů (Sardiello, Palmieri et al. 2009). Tyto dva nalezené motivy se nachází 737 a 867 bp od 1. ATG ve směru 3'-5'. 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 (Palmieri, Impey et al. 2011). Nelze tedy vyloučit vliv TFEB na expresi *HGSNAT*, neboť při delecii oblasti -716 až -1073, v níž se motivy nacházejí, došlo k výraznému poklesu aktivity reporteru.



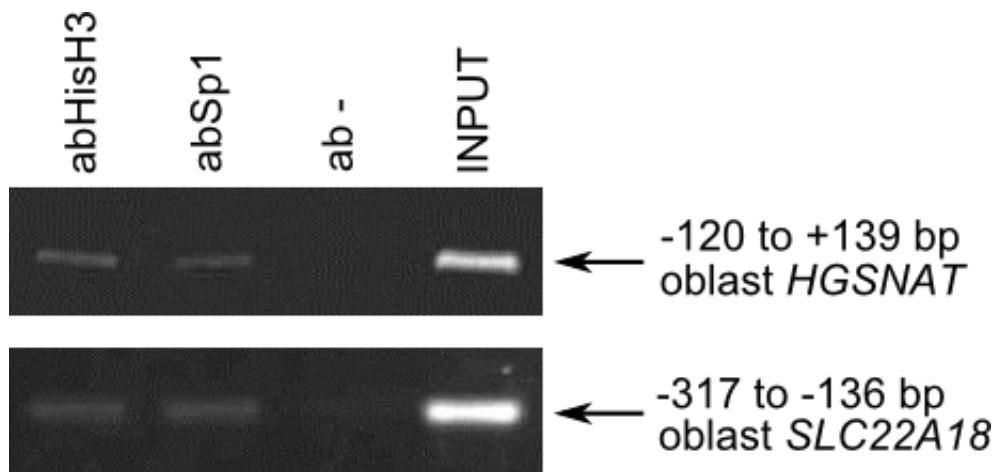
**Obr 4.11: Sp1 vazebná místa na 3'konci *HGSNAT* promotoru**

Konsenzuální sekvence pro vazebná místa transkripčního faktoru Sp1 jsou podtržená, mutované sekvence jsou znázorněny tučným písmem. Symbolem  $\uparrow$  jsou vyznačeny pozice 3'konce promotorových sekvencí.



**Obr 4.12: Luciferázová aktivita mutovaných vazebných míst pro Sp1**

Graf ukazuje luciferázovou aktivitu v RLU (relativní luciferázová jednotka) u konstruktů s mutovanými vazebnými místy pro Sp1 (mut Sp1-A, B, C, D). Výsledky jsou znázorněny se směrodatnou odchylkou tří měření z transfekcí v oddělených jamkách v jednom pokusu. Vektor pGL4 bez promotorové sekvence byl použit jako negativní kontrola.



**Obr. 4.13: ChIP analýza**

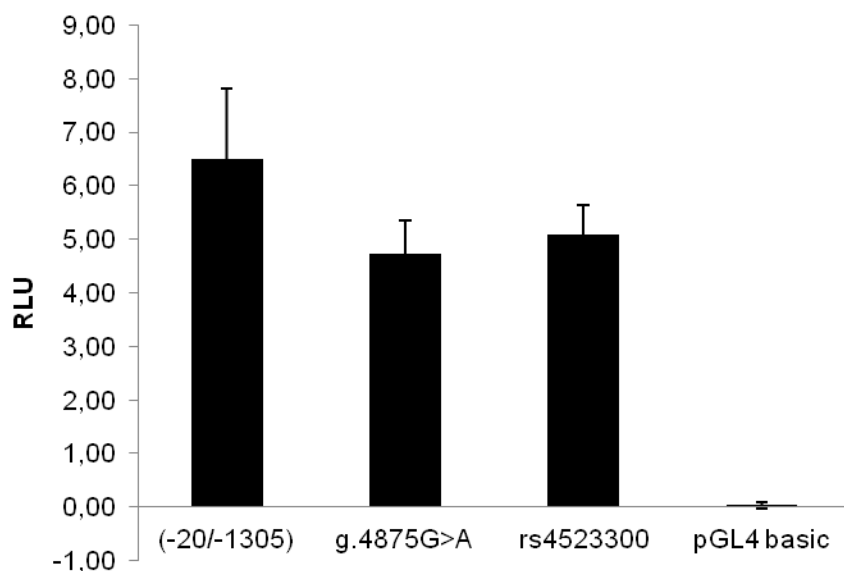
Pro ChIP analýzu byly použity buňky HepG2 a protilátky proti histonu H3 (pozitivní kontrola metody) a Sp1. Vzorek bez přidání protilátky při imunoprecipitaci sloužil jako negativní kontrola metody (ab-). PCR reakce ve známé promotorové oblasti genu *SLC22A18* sloužila jako pozitivní kontrola vazby Sp1. (číslování oblastí *HGSNAT* a *SLC22A18* je vztaženo k 1.ATG = +1bp dle sekvencí NM\_152419.2, respektive NM\_002555.5)

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

*HGSNAT* promotor je podobný promotorům housekeeping genů (Zhu, He et al. 2008), neboť neobsahuje TATA box, který se běžně vyskytuje v tkáňově specifických promotorech (Yang, Bolotin et al. 2007). Má několik začátků transkripce, nemetylovaný CpG ostrůvek a několik vazebných míst pro Sp1. Sp1 je velmi běžně se vyskytující transkripční faktor, hraje důležitou roli v promotorech housekeeping genů (Brandeis, Frank et al. 1994).

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

Vyšetřovali jsme sekvenci *HGSNAT* promotoru -1305/-20 u 23 pacientů MPS IIIC z různých populací. Nalezli jsme jeden běžný polymorfismus rs4523300 u tří pacientů a jednu mutaci g.4875G>A u jednoho pacienta. Vliv těchto záměn na aktivitu promotoru jsme testovali pomocí luciferázové eseje. U konstruktu pGL4 -1305/-20 jsme cíleně vytvořili jednobodové záměny odpovídající mutaci g.4875G>A a polymorfismu rs4523300. Intenzita luminiscence těchto mutovaných konstruktů nevykazovala výrazné snížení luciferázové aktivity oproti pGL4 -1305/-20 (obr. 4.14). Tyto záměny v promotorové oblasti nevedly ke změně genové exprese. V našem souboru 23 pacientů, ve které jsou i pacienti ze čtyř českých rodin s MPS IIIC, jsme nenalezli žádné funkčně významné variace.



**Obr 4.14: Luciferázová aktivita *HGSNAT* promotoru s mutací a polymorfismem**

V grafu je znázorněna luciferázová aktivita v RLU (relativní luciferázová jednotka) promotorových sekvencí -20/-1305 s mutací g.4875G>A a polymorfismem rs4523300. Výsledky jsou znázorněny se směrodatnou odchylkou tří měření z transfekcí v oddělených jamkách v jednom pokusu. pGL4 vektor bez promotorové sekvence byl použit jako negativní kontrola.

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

Tato práce je širokým popisem prvního zvířecího modelu MPS IIIC, který byl vytvořen ve spolupráci se skupinou Prof. Psezhetského (University of Montréal) (viz publikace 9.5). V této studii jsem se podílela na biochemických vyšetřeních.

#### **4.3.1 Homozygotní myši mají výrazně sníženou expresi a aktivitu HGSNAT**

Technikou gene trap byl vytvořen model MPS IIIC. Měření exprese *HGSNAT* pomocí real-time PCR a aktivity HGSNAT měřené s fluorogenním substrátem 4-metylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukosaminidem ve tkáních homozygotních myši prokázala úplný deficit HGSNAT – aktivita byla snížena na 1,5 - 0,6% hodnoty u zdravých myši, což představuje úplný deficit. U heterozygotů poklesla aktivita zhruba na 50% hodnotu oproti kontrolám, podobně jako je tomu u lidí. Aktivity jiných lysosomálních enzymů byly ve tkáních homozygotů stejné nebo vyšší než ve tkáních zdravých myši, s věkem se aktivity postupně zvyšovaly, což bylo zřejmě způsobeno zvyšujícím se počtem lysosomů ve tkáních, to bylo popsáno i u myších modelů jiných podtypů MPS III (Bhaumik, Muller et al. 1999; Li, Yu et al. 1999).

#### **4.3.2 Myši s deficitem HGSNAT vykazují postupné změny chování a poruchy učení**

Myši s deficitem HGSNAT jsou životaschopné a u homozygotních myši s deficitem HGSNAT byl pozorován normální růst a chování stejné jako u zdravých myši či heterozygotů až do věku 5-6 měsíců, poté byla u myši s deficitem HGSNAT pozorována zvýšená úzkost a hyperaktivita. V 11-12 měsících života byly u deficitních myši pozorovány závažné známky onemocnění, do té doby nebyly žádné zjevné známky nemoci pozorovány. Docházelo ke ztrátě hmotnosti, srsti a poruchám chůze a koordinace. Nebyly zaznamenány žádné kosterní abnormality jako skolióza nebo nekróza stehenní hlavice publikované u lidských pacientů (de Ruijter, Maas et al. 2013), ani faciální dysmorfie, která byla popsána u jiných modelů MPS III. Příčinou úmrtí ve 12-16 měsíci byla obvykle retence moči v močovém měchýři, která se vyskytuje i u ostatních myších modelů MPS III, ale není přítomna u lidí.

#### **4.3.3 Patologické změny ve tkáních myši s deficitem HGSNAT**

Při patologickém vyšetření homozygotních myši s deficitem HGSNAT ve věku 2, 4, 6, 10 a 11-12 měsíců nebyly makroskopicky pozorovány žádné výrazné změny vnitřních orgánů, zatímco při mikroskopickém vyšetření byly detekovány patologické změny už ve stáří 2

měsíců s postupným zhoršováním v závislosti na vzrůstajícím věku. U myši s deficitem HGSNAT bylo pozorováno střádání glykosaminoglykanů v játrech, slezině a mozku. Bylo zjištěno sekundární střádání lipidů včetně gangliosidů GM<sub>2</sub> a GM<sub>3</sub> a cholesterolu v mozku stejně jako v dřívějších studiích ve tkáních pacientů MPS III a myších modelech MPS IIIA a MPS IIIB (Bhaumik, Muller et al. 1999; Li, Yu et al. 1999).

#### **4.3.4 V mozku myši s deficitem HGSNAT dochází ke změnám energetického metabolismu mitochondrií**

Protože při elektronové mikroskopii byly pozorovány v neuronech abnormální mitochondrie, jak je uvedeno níže, zkoumali jsme, zda je v mozku myši s deficitem HGSNAT ovlivněn energetický metabolismus. Měřili jsme aktivity enzymů mitochondriálního respiračního řetězce. Výrazně nižší byla aktivita enzymů komplexu IV (cytochrome *c* oxidase, COX) a II (succinate-coenzyme Q reductase, SQR) v mozku myši s deficitem HGSNAT ve věku 8 a 12 měsíců oproti kontrolním myším. Aktivita komplexu II a II+III (succinate-cytochrome *c* reductase, SCCR) byla výrazně snížena s přibývajícím věkem HGSNAT deficitních myši, zatímco u zdravých myši stejného věku nebyly pozorovány žádné změny.

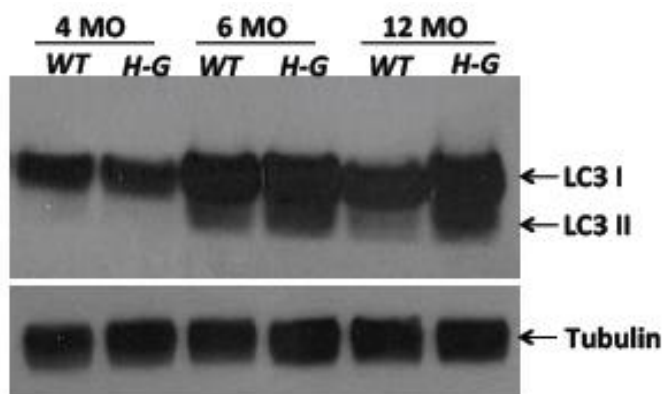
#### **4.3.5 Abnormální autofagie v neuronech u myši s deficitem HGSNAT**

Zvýšená autofagie spojená s poruchou proteolýzy a akumulací chybně sbalených proteinů byla zjištěna v buňkách u mnoha LSDs (Settembre, Fraldi et al. 2013). V játrech myši 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 pouze u myši ve věku 6 měsíců a více (obr. 4.15). Zároveň bylo v neuronech zjištěno výrazné zvýšení podjednotky *c* mitochondriální ATP syntázy (subunit *c* of mitochondrial ATP synthase, SCMAS) a ubikvitinu, což svědčí o mitofagii a poruše lysosomální proteolýzy.

Od věku 2 měsíců byly v mozku myši pozorovány známky neuroinflammace. Ve věku 5-6 měsíců bylo v mikroglíích přítomno významné lysosomální střádání. Charakter střádání v elektronmikroskopickém obraze svědčil pro akumulaci glykosaminoglykanů. Naproti tomu v neuronech byly kromě mírných známek lysosomálního střádání v malé míře přítomny i autofagické vakuoly. Nápadným nálezem byla akumulace abnormálních mitochondrií ve věku 5-6 měsíců v cytoplazmě. Tento nález pravděpodobně svědčí pro poruchu mitofagie, ačkoli ho nelze pokládat bez dalších vyšetření autofagických procesů, která nelze provést ve fixovaných vzorcích tkání, za jednoznačný průkaz poruchy mitofagie. Později jsou přítomny v lysosomech a pravděpodobných autofagických vakuolách částečně degradované organely,

kteře by mohly bŕt mitochondriálního pŕvodu. V mozku myšŕ s deficitem HGSNAT dochází k poškození mitochondrií a až poté k autofagii, neboť zvýšení LC3-II v mozku bylo detekováno až u 6 mĕsŕcŕ starých myšŕ s deficitem HGSNAT.

Naše data charakterizují MPS IIIC jako neurodegenerativní chorobu s pozorovanými zmĕnami mitochondrií. Abnormální autofagie, konkrĕtnĕ mitofagie, se mŕže podílet na akumulaci neodbouranĕho materiálu v lysosomech neuronŕ. Zmĕny v neuronech vĕtne jejich zániku mohou bŕt zapřŕčinĕny patologickými zmĕnami jejich mitochondriálního systému.



**Obr 4.15: Detekce LC3-II v mozku myšŕ**

Na Western blotu bylo detekováno zvýšené množství LC3-II v mozku myšŕ s deficitem HGSNAT ve věku 6 a 10 mĕsŕcŕ, ve věku 4 mĕsŕcŕ detekováno nebylo. Jako kontrola nanášky byla použita detekce  $\beta$ -tubulinu.

#### 4.3.6 Neuroinflamace u myšŕ s deficitem HGSNAT

V mozku myšŕ s deficitem HGSNAT byla v porovnání se zdravými jedinci detekována zvýšená exprese markerŕ zánĕtu MIP1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) a TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) už 10. den života. Koncentrace tĕchto cytokinŕ se zvyšovala až do věku 8 mĕsŕcŕ. Progredující neuroinflamace byla dobře dokumentována u myšŕích modelŕ lysosomálních neurodegenerativních poruch vĕtne MPS IIIA a B, kde docházelo k aktivaci mikroglie a astrocytŕ a ke zvýšené produkci zánĕtlivých cytokinŕ (Ohmi, Greenberg et al. 2003; Ausseil, Desmaris et al. 2008; Wilkinson, Holley et al. 2012). Deficit HGSNAT a akumulace heparan sulfátu v gliových buňkách vede k jejich aktivaci a produkci cytokinŕ, které pravdĕpodobnĕ způsobují poruchu mitochondrií v neuronech vedoucí zřejmĕ k odumření neuronŕ, což vysvětluje, že MPS IIIC se projevuje primárnĕ jako neurodegenerativní choroba.

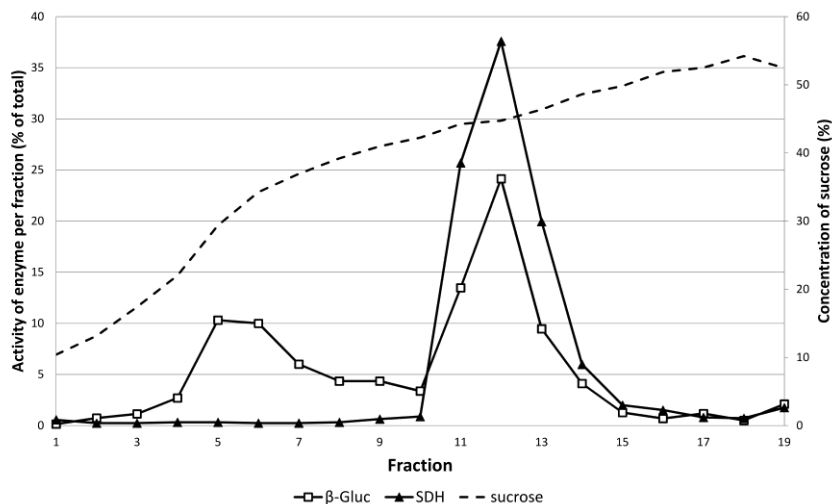


Tento zvířecí model MPS IIIC reprodukuje důležité rysy lidského onemocnění, může být používán pro testování terapie. Průběh onemocnění je srovnatelný s ostatními myšími modely MPS III, u kterých se také - na rozdíl od lidí - vyskytuje retence moči se zvětšením močového měchýře. Ve stěně močového měchýře nebyly pozorovány patologické změny, které by vysvětlily retenci moči. Je pravděpodobné, že příznaky jsou způsobeny postižením míchy, která však v rámci této studie nebyla vyšetřována. Mechanismus postižení mozku u tohoto modelu je charakterizován postupnou ztrátou neuronů, která může souviset s poruchou autofagie poškozených mitochondrií. Tento mechanismus může být společný pro další metabolické a neurodegenerativní choroby (např. Parkinsonova choroba).

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

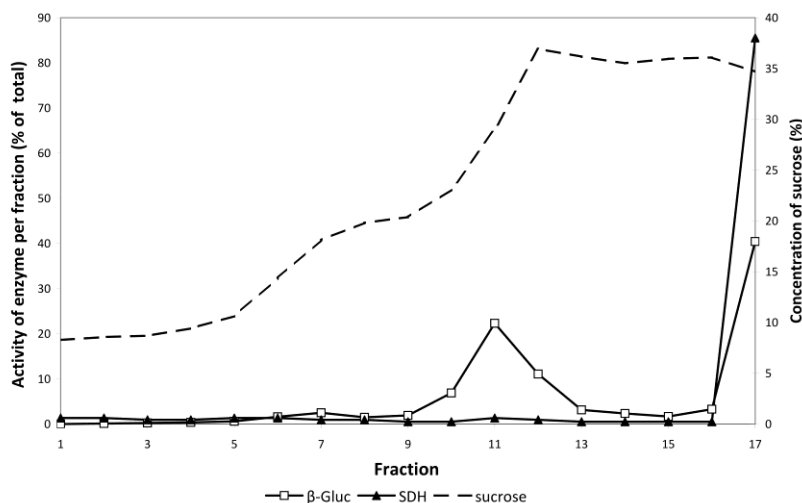
Pro účely výzkumu lipidů a proteinů lysosomálních membrán jsme vyvinuli jednoduchou metodu pro izolaci lysosomálních membrán z kultivovaných buněčných linií HEK293 a HeLa (viz publikace 9.4). Lysosomální membrány byly v minulosti izolovány různými metodami, mezi kterými převládaly techniky využívající diferenciální centrifugaci obvykle následovanou separací v denzitním gradientu.

Pro izolace jsme nejdříve vyzkoušeli metodu diferenciální centrifugace organelového koncentrátu po selektivní lýze lysosomů vycházející z literatury (Ohsumi, Ishikawa et al. 1983). Organelový koncentrát jsme inkubovali s 20 mM metyl esterem methioninu (MME), který se používá k selektivní lýze lysosomů (Goldman and Kaplan 1973). Slabé báze, jako jsou metyl estery některých aminokyselin, snadno prostupují lysosomální membránou do lysosomu, kde jsou zřejmě pomocí lysosomálních hydroláz přeměny na volné aminokyseliny, které se v lysosomu akumulují a způsobují jeho osmotické prasknutí. Frakce získané po diferenciální centrifugaci však nebyly obohaceny o lysosomální membrány v dostatečném množství a čistotě, proto jsme lyzáty ošetřené MME separovali na lineárním 32,5% - 55,5% sacharózovém gradientu. V jednotlivých frakcích byla měřena aktivita lysosomálního enzymu glukocerebrosidázy ( $\beta$ -Gluc) a mitochondriálního enzymu sukcinátdehydrogenázy (SDH). Zvýšená aktivita  $\beta$ -Gluc byla pozorována ve frakcích s 30 - 41% a 45% sacharózou. V 45% sacharóze byla zároveň patrná zvýšená aktivita SDH (obr. 4.16), což svědčí o mitochondriální kontaminaci.



**Obr 4.16: Frakce lysosomálních membrán separovaných na lineárním sacharózovém gradientu**  
 V jednotlivých frakcích je znázorněna aktivita glukocerebrosidázy (β-Gluc) a sukcinátdehydrogenázy (SDH), která je vyjádřena v procentech celkové aktivity. Koncentrace sacharózy je uvedena v procentech (w/v).

Navrhli jsme krokový gradient, kde byl postnukleární supernatant ošetřený MME podvrstven 20% a 41% sacharózou a frakce obohacených lysosomálních membrán byla sbírána z rozhraní 20% / 41% sacharózy. Frakce se zvýšenou aktivitou β-Gluc obsahovala mitochondriální kontaminaci, kterou jsme eliminovali snížením koncentrace sacharózy ve spodní části gradientu z 41% na 35%. Zároveň však došlo ke snížení výtěžku obohacených lysosomálních membrán (obr. 4.17).



**Obr 4.17: Frakce lysosomálních membrán separovaných na krokovém sacharózovém gradientu**  
 V jednotlivých frakcích je znázorněna aktivita glukocerebrosidázy (β-Gluc) a sukcinátdehydrogenázy (SDH), která je vyjádřena v procentech celkové aktivity. Koncentrace sacharózy je uvedena v procentech (w/v).

Protože zvýšená aktivita lysosomálního enzymu  $\beta$ -Gluc bez mitochondriální kontaminace byla naměřena ve frakci lysosomálních membrán získaných z rozhraní 20% / 35% sacharózy, použili jsme tuto frakci k detekci lysosomálního membránového proteinu LAMP1 pomocí Western blotu. LAMP1 byl současně detekován i v homogenátu (H), postnukleárním supernatantu (PNS), organelové peletě (OP) a supernatantu po centrifugaci organel (OS). Nejvyššího signálu bylo dosaženo u frakce lysosomálních membrán a OP (viz. publikace 9.4, fig. 3).

V jednotlivých frakcích jsme hodnotili obohacení lysosomálními membránami, měřili jsme množství proteinu a  $\beta$ -Gluc aktivitu. Postnukleární supernatant obsahoval 89 %  $\beta$ -Gluc aktivity homogenátu, zatímco organelová peleta 77 %. Frakce z rozhraní 20% / 35% sacharózového gradientu byla obohacena 14x oproti homogenátu a obsahovala 12 %  $\beta$ -Gluc aktivity homogenátu. Promytím pelety z této frakce v 10 mmol/l Tris pufru jsme dosáhli dvojnásobného obohacení oproti nepromyté frakci a 8,8%  $\beta$ -Gluc aktivity homogenátu (viz. publikace 9.4, tab. 1). 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 nízké kontaminaci peroxisomy.

Pro monitorování lýzy lysosomů jsme měřili aktivitu hexosaminidázy, enzymu lysosomální matrix, v supernatantu organelové frakce po různě dlouhé inkubaci s MME. Po 15, 30, 45 a 60 minutách supernatant obsahoval 36,7 %, 39 %, 47,6 % a 54,4 % původní hexosaminidázové aktivity. Vzhledem k tomu, že nebylo možné do reakce přidat inhibitory proteáz, protože na aktivitě proteáz závisí mechanismus lýzy, docházelo během inkubace k proteolýze a po 60 minutách už celková aktivita hexosaminidázy klesla o 13 %. Vyšší koncentrace MME nevedla ke zvyšování aktivity hexosaminidázy. Aktivita  $\beta$ -Gluc se během inkubace s MME v supernatantu nezvyšovala. Podle těchto výsledků jsme zvolili inkubaci s MME po dobu 45 minut, abychom dosáhli co nejvyšší lýzy lysosomů, ale vyhnuli se riziku významné proteolýzy.

S lysosomální membránou mohou dočasně interagovat luminální proteiny (Jadot, Dubois et al. 1997) a některé lysosomální proteiny včetně glukocerebrosidázy existují v luminální i

membránové formě (Imai 1985). Další zvyšování výtěžku lysosomálních membrán odstraněním periferních membránových proteinů nebo volně vázaných luminálních proteinů, které mohou kontaminovat obohacené lysosomální membrány, nebylo testováno.

Ověřovali jsme, zda ve frakci promytých lysosomálních membrán zůstává zachována funkce vakuolární ATPázy, protonové pumpy v lysosomální membráně, která je zodpovědná za udržení kyselého prostředí v lysosomech. Promyté lysosomální membrány byly po přidání ATP okyseleny, aktivita ATPázy tudíž zůstala zachována. Změna pH byla sledována na základě změny absorbance akridinové oranže při 492 nm. Po následném přidání síranu amonného došlo k alkalizaci membránových vezikul (viz. publikace 9.4, fig. 4).

Výtěžnost izolace lysosomálních membrán námi optimalizovanou metodou je porovnatelná s metodou izolace magnetickou chromatografií (Diettrich, Mills et al. 1998). Výhodou naší metody je, že nevyžaduje nefyziologickou zátěž lysosomů magnetickými částicemi, která může způsobit jejich poškození. Jedná se o rychlou a účinnou metodu, která má vysokou účinnost v eliminaci mitochondriální kontaminace a dochází při ní k minimální kontaminaci ostatními buněčnými kompartmenty. V obohacené frakci lysosomálních membrán zůstává zachována funkce lysosomální vakuolární ATPázy umožňující okyselování membránových vezikul. 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 prepisovány 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 stádáním 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 Tabulky

Tabulka 1

Amplifikovaná oblast	Forward primer	Reverse primer	TM (°C)
P1_sense <sup>1)</sup>	5'-GGTACCGTGTGCCACTCCCGCTAAATC-3'	5'-CTCGAGAGACCAAGGGGTTCCAAGT-3'	67
P1_antisense <sup>1)</sup>	5'-CTCGAGGTGTGCCACTCCCGCTAAATC-3'	5'-GGTACCAAGACCAAGGGGTTCCAAGT-3'	67
P2_sense <sup>1)</sup>	5'-GGTACCTTTTCAGTGAGCACCCAATCCC-3'	5'-CTCGAGGAGAAAAGCAGCCCTGGGGAG-3'	67
P2_antisense <sup>1)</sup>	5'-CTCGAGTTTTCAGTGAGCACCCAATCCC-3'	5'-GGTACCGAGAAAAGCAGCCCTGGGGAG-3'	67
exon-1, -2	5'-TGAGGAAGGGCTCTGAGTCC-3'	5'-TCAAGCGGAGGGTAGGGACC-3'	65
U3, L9	5'-CCAGCGACACTGTTCGTTCAACTT-3'	5'-GGTCTCCTTCGGGGTTCA-3'	63
-353/-1311 <sup>2)</sup>	5'-CCTAACTGGCCGGTACTAGCTGGGATTACAGG-3'		60
-353/-1164 <sup>2)</sup>	5'-CCTAACTGGCCGGTACTATTACAGGTGTGACTC-3'		60
-353/-920 <sup>2)</sup>	5'-CTAACTGGCCGGTACAAACGTGGTGCTCC-3'		60
-353/-658 <sup>2)</sup>	5'-CCTAACTGGCCGGTACTGTGGGAATTCATCG-3'		60
U1, L1	5'-CCTGAGGCTCTCTAAAGAGGAAGGTTAGGAA-3'	5'-GAGTCTCTGAAAGGATAGAGGATCCACGTAA-3'	65
U2, L1	5'-CGACACGCATGCGTAGTTCTC-3'	5'-GAGTCTCTGAAAGGATAGAGGATCCACGTAA-3'	65
U3, L1	5'-CCAGCGACACTGTTCGTTCAACTT-3'	5'-GAGTCTCTGAAAGGATAGAGGATCCACGTAA-3'	65
U4, L1	5'-GCTGCTGTTTCTCTTCGCCGAC-3'	5'-GAGTCTCTGAAAGGATAGAGGATCCACGTAA-3'	65
U1, L2	5'-CCTGAGGCTCTCTAAAGAGGAAGGTTAGGAA-3'	5'-AAGACCACAGGGGTTCCAAG-3'	65
U2, L2	5'-CGACACGCATGCGTAGTTCTC-3'	5'-AAGACCACAGGGGTTCCAAG-3'	65
U3, L2	5'-CCAGCGACACTGTTCGTTCAACTT-3'	5'-AAGACCACAGGGGTTCCAAG-3'	65
U4, L2	5'-GCTGCTGTTTCTCTTCGCCGAC-3'	5'-AAGACCACAGGGGTTCCAAG-3'	65
Meth1	5'-GGTTGGATTTATTGTGGGAATTAAT-3'	5'-TCAAAAACCTTCTCAAACTCTCATT-3'	56
Meth2	5'-AATGAGATTTGAGGAAGGGTTTTGAG-3'	5'-CCATTACTCCAACCTAAAC-3'	56
Meth3	5'-GTTTAGGTTGGAGTGAATGG-3'	5'-TCATTAATAAAAATAAATCCTTACC-3'	56
RACE_1	5'-GCTGATGGCGATGAA TGAACACTG-3'	5'-GAGTCTCTGAAAGGATAGAGGATCCACGTAA-3'	60
RACE_2	5'-GCTGATGGCGATGAA TGAACACTG-3'	5'-AAGACCACAGGGGTTCCAAG-3'	60
RACE_3	5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'	5'-CAGGAATTGGAGACCA GCCTGAC-3'	60
RACE_4	5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'	5'-GGCAAAACGAAATCCCAACCGCAG-3'	60

<sup>1)</sup> Podtržené sekvence jsou nehybridizující overhangy obsahující restrikční místa

<sup>2)</sup> Podtržené sekvence nasedají na vektor pGL4

Tabulka 2

Název sondy	Forward primer	Tm (°C)	Reverse primer	Tm (°C)	Sonda	Tm (°C)
promlGBA1	AGAGTCTTACTGCGCGGGG	59	AGCCTGCAAAGGGGCC	60	AGTCTCCAGTCCCGCC	69
promlGBA2	GCTCGCAGCGACACTTG	60	GGACTCAGAGCCCTTCTCAA	59	CGTTCAACTTGACCAATG	69
promlGBA3	TCAATCGCCCCATCCA	60	TGCGTGTGCGGTTTTTC	59	CAACAGTGTGCTGGCG	70
promlGBA4	CGGAATTACTTGCA GGGCTTA	58	CAAAAACAAGGATGCA GGTACCT	58	CCTAGTGCCTATAGCTAAG	69

Tabulka 3

Oblast promotoru	Orientace	Forw ard primer	Reverse primer	Tm (°C)
(-20/-1305) <sup>1)</sup>	sense	5'-GGTACC TTC CCGAAA CAGTGCCCCCTA TC-3'	5'-CTCGAGGC C CTTGCCTGCCCGCTG-3'	67
(-20/-1305) <sup>1)</sup>	antisense	5'-CTCGAG TTC CCGAAA CAGTGCCCCCTA TC-3'	5'-GGTACC GC C CTTGCCTGCCCGCTG-3'	67
(-101/-1305) <sup>1)</sup>	sense	5'-GGTACC TTC CCGAAA CAGTGCCCCCTA TC-3'	5'-CTCGAGGTCA CCGCCGCTGACTCAC-3'	67
(-101/-1305) <sup>1)</sup>	antisense	5'-CTCGAG TTC CCGAAA CAGTGCCCCCTA TC-3'	5'-GGTACC GTCA CCGCCGCTGACTCAC-3'	67
(-61/-1305) <sup>2)</sup>	sense	5'-GCGGGCGTCCGCGCTCGAGGATA TCAA-3'	5'- TTGATA TCCTCGAGCGCGGACGCCCGC-3'	63
(+50/-1305) <sup>1)</sup>	sense	5'-GGTACC TTC CCGAAA CAGTGCCCCCTA TC-3'	5'-CTCGAGACGGA CCGCGCCAGCAGCA-3'	67
(+50/-1305) <sup>1)</sup>	antisense	5'-CTCGAG TTC CCGAAA CAGTGCCCCCTA TC-3'	5'-GGTACC ACGGACCGCGCCAGCAGCA-3'	67
(-20/-2905) <sup>1)</sup>	sense	5'-GGTACC TGAC C CTTGCTGTGAAACCAACCA-3'	5'-CTCGAGGC C CTTGCCTGCCCGCTG-3'	68
(-20/-2905) <sup>1)</sup>	antisense	5'-CTCGAG TGAC C CTTGCTGTGAAACCAACCA-3'	5'-GGTACC GC C CTTGCCTGCCCGCTG-3'	68

1) Podtržené sekvence jsou nehybridizující overhangy obsahující restriční místa

2) Oblast promotoru byla vytvořena mutagenézí

Tabulka 4

Deletions and mutations	Forw ard primer	Reverse primer	Tm (°C)
(-20/-1073) <sup>1)</sup>	5'-GCCTAACTGGCCGGTACTCTGGGATTTAATCTGTG-3'		60
(-20/-716) <sup>1)</sup>	5'-GCCTAACTGGCCGGTACA TTCA GCTTGTACAA-3'		60
(-20/-347) <sup>1)</sup>	5'-CCTAACTGGCCGGTACA GTTTGGCAGAA TGCG-3'		60
(-20/-186) <sup>1)</sup>	5'-TAACTGGCCGGTACTAGCATGGCCCGGC-3'		60
rs.4523300	5'-CCAGCCTTGTGTTTGTAGATTTATCC-3'	5'-GGA TAAATCTCAAAA CACAAGGCTGGG-3'	60
g.4875G>A	5'-CTA GCATGGCCCGGCCAGCC-3'	5'-GGA TGGCCCGGCCATGCTAG-3'	60
mut CTG	5'-GGCGCGGGCCTGACCGGGGC-3'	5'-GCCCGCTCA GGC CCGCCGC-3'	60
mut Sp1 A	5'-GTGACGGCAGCGGAGAGATCTATGACGGGCGCGCG-3'	5'-CGCGCGCCCGTCATAGATCTCTCCGCTGCCGTAC-3'	60
mut Sp1 B	5'-CGGAGGGGGCGATGACGATCTCA CGATCTTCGCGCGGAGCAGCG-3'	5'-CGCTGCTCCCGCGGAAGATCGTGAGATCGTCA TCGCCCTCCG-3'	60
mut Sp1 C	5'-CGCGCGGGCGTCCACATCTGAGCAGCGCAGGG-3'	5'-CCCTGCGCTGCTCAGATGTGACGCCCGCGCG-3'	60
mut Sp1 D	5'-CGGAGCAGCGCAGATCTGGTCGACGGGCGAGG-3'	5'-CCTGCCCGCTGCGACCA GATCTGCGCTGCTCCG-3'	60
RACE	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACA CTG-3'	5'-CCAGAACCTGAAACAAGCAGTGATAACA-3'	65
ChIP HGSNAT	5'-GTGACTCAGGCGGCGGTGAC-3'	5'-CGGTAGGAGGTGTGCACTCAC-3'	58
ChIP SLC22A18	5'-GCTCCCGGAACTGGCGATT-3'	5'-CTTTGCA GGGCGGGCTT-3'	60
Meth1_MPSIIIC	5'-ATAGTTAAGAA TGGGTGTGATA-3'	5'-AACCA TACTAAA C C C T A C C T T A A -3'	60
Meth2_MPSIIIC	5'-TAAGGTAGGGTTAGTATGGTT-3'	5'-ATAAAAAA TATACACTCACCTC-3'	60
Meth3_MPSIIIC	5'-GAGGTGAGTGATATTTTTAT-3'	5'-CCTCCTAACTACCAATTTATA-3'	60

1) Podtržené sekvence nasedají na vektor pGL4



## 7 Seznam zkratek

4-MU	4-metylbelliferon
4-MUGlc	4-metylbelliferyl- $\beta$ - D-glukosid
ACP5	kyselá fosfatáza
<i>ACTB</i>	beta-aktin
AMPK	AMP-aktivovaná proteinová kináza
APS	amonium persulfát
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bazí
BRE	TFIIB rozpoznávací element
BSA	bovinní sérový albumin
cADPR	cyklická ADP ribóza
CBE	konduritol $\beta$ -epoxid
CCD	charge-coupled device
CD14	cluster of differentiation 14
CD163	cluster of differentiation 163
CD68	cluster of differentiation 68
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CI-M6PR	kation nezávislý manosa-6-fosfátový receptor
CLEAR	Coordinated Lysosomal Expression and Regulation
CNS	centrální nervová soustava
CUTs	cryptic unstable transcripts
ddNTPs	dideoxynukleosidtrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfát
DPE	downstream core promoter element
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EE	časný endosom
ELS	endosomálně lysosomální systém
ER	endoplazmatické retikulum
ERT	enzymová substituční terapie
ESTs	expressed sequence tags
FBS	fetální bovinní sérum
GA	Golgiho aparát
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-fosfát dehydrogenáza
<i>GBA</i>	gen kódující glukocerebrosidázu
<i>GBAP</i>	pseudogen GBA
GD	Gaucherova choroba
gDNA	genomová deoxyribonukleová kyselina
<i>HGSNAT</i>	gen kódující N-acetyltransferázu
CHIT1	chitotriosidáza
Inr	iniciátor
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
LAMP	lysosomálně asociovaný membránový protein
LAMP1	lysosomálně asociovaný membránový protein typu 1
LAMP2	lysosomálně asociovaný membránový protein typu 2

LAMP2A	lysosomálně asociovaný membránový protein typu 2A
LC3	microtubule-associated protein light chain 3
LE	pozdní endosom
LIMP	lysosomálně integrovaný membránový protein
LMPs	lysosomální membránové proteiny
LSDs	lysosomální střádavá onemocnění
M6P	manosa-6-fosfát
M6PR	manosa-6-fosfátový receptor
MCOLN1	iontový kanál mukolipin 1
MME	metyl ester methioninu
MPS IIIC	mukopolysacharidóza typu IIIC
MPS	mukopolysacharidóza
mRNA	mediátorová RNA
MTE	motif ten element
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
MVB	multivezikulární tělíska
NAADP	adenin dinukleotid fosfát kyseliny nikotinové
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ncRNA	nekódující RNA
NPC	Niemann-Pickova choroba
P1	promotor genu <i>GBA</i>
P2	alternativní promotor genu <i>GBA</i>
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD	Parkinsonova choroba
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PROMPTs	promoter upstream transcripts
RLU	relativní luciferázová jednotka
RNA	ribonukleotidová kyselina
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
SDH	sukcinátdehydrogenáza
SDS	sodiumdodecylsulfát
SR	sarkoplazmatické retikulum
SRT	substrát redukční terapie
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyletylendiamin
TFEB	transkripční faktor EB
TPC	two pore channel
ÚDMP	Ústav dědičných metabolických poruch
UNG	Uracil N-Glykosyláza
β-Gluc	glukocerebrosidáza

## 8 Použitá literatura

- Aki, T., T. Funakoshi, et al. (2013). "Impairment of autophagy: from hereditary disorder to drug intoxication." *Toxicology* **311**(3): 205-215.
- Ali, A. M., V. Bajaj, et al. (2009). "Characterization of the human SLC22A18 gene promoter and its regulation by the transcription factor Sp1." *Gene* **429**(1-2): 37-43.
- Andersen, C. L., J. L. Jensen, et al. (2004). "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* **64**(15): 5245-5250.
- Arai, K., T. Kanaseki, et al. (1991). "Isolation of highly purified lysosomes from rat liver: identification of electron carrier components on lysosomal membranes." *J Biochem* **110**(4): 541-547.
- Ausseil, J., N. Desmaris, et al. (2008). "Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice." *PLoS One* **3**(5): e2296.
- Ausseil, J., K. Landry, et al. (2006). "An acetylated 120-kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC fibroblasts: a candidate molecule for MPS IIIC." *Mol Genet Metab* **87**(1): 22-31.
- Aviezer, D., E. Brill-Almon, et al. (2009). "A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation." *PLoS One* **4**(3): e4792.
- Baek, D., C. Davis, et al. (2007). "Characterization and predictive discovery of evolutionarily conserved mammalian alternative promoters." *Genome Res* **17**(2): 145-155.
- Bame, K. J. and L. H. Rome (1986). "Acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for an active site histidine residue." *J Biol Chem* **261**(22): 10127-10132.
- Bame, K. J. and L. H. Rome (1986). "Genetic evidence for transmembrane acetylation by lysosomes." *Science* **233**(4768): 1087-1089.
- Barranger, J. M. and E. A. Novelli (2001). "Gene therapy for lysosomal storage disorders." *Expert Opin Biol Ther* **1**(5): 857-867.
- Barton, N. W., R. O. Brady, et al. (1991). "Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease." *N Engl J Med* **324**(21): 1464-1470.
- Bartsocas, C., H. Grobe, et al. (1979). "Sanfilippo type C disease: clinical findings in four patients with a new variant of mucopolysaccharidosis III." *Eur J Pediatr* **130**(4): 251-258.
- Bassi, M. T., M. Manzoni, et al. (2000). "Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin and identification of the two major founder mutations causing mucopolysaccharidosis type IV." *Am J Hum Genet* **67**(5): 1110-1120.
- Beavan, M. S. and A. H. Schapira (2013). "Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease." *Ann Med* **45**(8): 511-521.
- Beutler, E. and T. Gelbart (1996). "Glucocerebrosidase (Gaucher disease)." *Hum Mutat* **8**(3): 207-213.
- Bevilacqua, M. A., D. K. Lord, et al. (1991). "Regulation and expression of type V (tartrate-resistant) acid phosphatase in human mononuclear phagocytes." *Mol Biol Med* **8**(1): 135-140.
- Bhaumik, M., V. J. Muller, et al. (1999). "A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome)." *Glycobiology* **9**(12): 1389-1396.
- Blake, M. C., R. C. Jambou, et al. (1990). "Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter." *Mol Cell Biol* **10**(12): 6632-6641.
- Blech-Hermoni, Y. N., S. G. Ziegler, et al. (2010). "In silico and functional studies of the regulation of the glucocerebrosidase gene." *Mol Genet Metab* **99**(3): 275-282.
- Boot, R. G., G. H. Renkema, et al. (1995). "Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages." *J Biol Chem* **270**(44): 26252-26256.

- Bornstein, P., C. E. McKinney, et al. (1995). "Metaxin, a gene contiguous to both thrombospondin 3 and glucocerebrosidase, is required for embryonic development in the mouse: implications for Gaucher disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4547-4551.
- 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.
- Brady, R. O., J. N. Kanfer, et al. (1965). "Metabolism of Glucocerebrosides. Ii. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease." *Biochem Biophys Res Commun* **18**: 221-225.
- Brandeis, M., D. Frank, et al. (1994). "Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation." *Nature* **371**(6496): 435-438.
- Braulke, T. and J. S. Bonifacino (2009). "Sorting of lysosomal proteins." *Biochim Biophys Acta* **1793**(4): 605-614.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clin Chem* **55**(4): 611-622.
- Butler, J. E. and J. T. Kadonaga (2002). "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression." *Genes Dev* **16**(20): 2583-2592.
- Butte, A. J., V. J. Dzau, et al. (2001). "Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues"." *Physiol Genomics* **7**(2): 95-96.
- Calcraft, P. J., M. Ruas, et al. (2009). "NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels." *Nature* **459**(7246): 596-600.
- Callahan, J. W., R. D. Bagshaw, et al. (2009). "The integral membrane of lysosomes: its proteins and their roles in disease." *J Proteomics* **72**(1): 23-33.
- Canals, I., S. C. Elalaoui, et al. (2011). "Molecular analysis of Sanfilippo syndrome type C in Spain: seven novel HGSNAT mutations and characterization of the mutant alleles." *Clin Genet* **80**(4): 367-374.
- Carstea, E. D., J. A. Morris, et al. (1997). "Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis." *Science* **277**(5323): 228-231.
- Cea, M., A. Cagnetta, et al. (2012). "Targeting NAD<sup>+</sup> salvage pathway induces autophagy in multiple myeloma cells via mTORC1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) inhibition." *Blood* **120**(17): 3519-3529.
- Clark, S. J., J. Harrison, et al. (1994). "High sensitivity mapping of methylated cytosines." *Nucleic Acids Res* **22**(15): 2990-2997.
- Clarke, J. T. and R. M. Iwanochko (2005). "Enzyme replacement therapy of Fabry disease." *Mol Neurobiol* **32**(1): 43-50.
- Cookson, M. R. (2011). "A feedforward loop links Gaucher and Parkinson's diseases?" *Cell* **146**(1): 9-11.
- Corden, J., B. Wasyluk, et al. (1980). "Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes." *Science* **209**(4463): 1406-1414.
- Cox, T., R. Lachmann, et al. (2000). "Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis." *Lancet* **355**(9214): 1481-1485.
- Cuervo, A. M., E. Bergamini, et al. (2005). "Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells." *Autophagy* **1**(3): 131-140.
- Das, P. K., G. J. Murray, et al. (1986). "Studies on the turnover of glucocerebrosidase in cultured rat peritoneal macrophages and normal human fibroblasts." *Eur J Biochem* **154**(2): 445-450.
- De Duve, C., B. C. Pressman, et al. (1955). "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." *Biochem J* **60**(4): 604-617.
- de Ruijter, J., M. Maas, et al. (2013). "High prevalence of femoral head necrosis in Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo disease): a national, observational, cross-sectional study." *Mol Genet Metab* **109**(1): 49-53.
- Dell'Antone, P. (1979). "Evidence for an ATP-driven "proton pump" in rat liver lysosomes by basic dyes uptake." *Biochem Biophys Res Commun* **86**(1): 180-189.
- Denzer, K., M. J. Kleijmeer, et al. (2000). "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device." *J Cell Sci* **113 Pt 19**: 3365-3374.

- Dice, J. F. (2007). "Chaperone-mediated autophagy." *Autophagy* **3**(4): 295-299.
- Diettrich, O., K. Mills, et al. (1998). "Application of magnetic chromatography to the isolation of lysosomes from fibroblasts of patients with lysosomal storage disorders." *FEBS Lett* **441**(3): 369-372.
- Doll, R. F., A. Bruce, et al. (1995). "Regulation of the human acid beta-glucosidase promoter in multiple cell types." *Biochim Biophys Acta* **1261**(1): 57-67.
- Doll, R. F. and F. I. Smith (1993). "Regulation of expression of the gene encoding human acid beta-glucosidase in different cell types." *Gene* **127**(2): 255-260.
- Durand, S., M. Feldhammer, et al. (2010). "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* **285**(41): 31233-31242.
- Elleder, M., Sikora J. (2010). "Biologie a patologie lysosomálního systému." <http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/web2/cell/els/els.pdf>.
- Fan, X., I. Tkachyova, et al. (2011). "Characterization of the biosynthesis, processing and kinetic mechanism of action of the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC." *PLoS One* **6**(9): e24951.
- Fan, X., H. Zhang, et al. (2006). "Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C)." *Am J Hum Genet* **79**(4): 738-744.
- Feldhammer, M., S. Durand, et al. (2009). "Sanfilippo syndrome type C: mutation spectrum in the heparan sulfate acetyl-CoA: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (HGSNAT) gene." *Hum Mutat* **30**(6): 918-925.
- Feldhammer, M., S. Durand, et al. (2009). "Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C." *PLoS One* **4**(10): e7434.
- Ferron, M., C. Settembre, et al. (2013). "A RANKL-PKCbeta-TFEB signaling cascade is necessary for lysosomal biogenesis in osteoclasts." *Genes Dev* **27**(8): 955-969.
- Fromont-Racine, M., E. Bertrand, et al. (1993). "A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs." *Nucleic Acids Res* **21**(7): 1683-1684.
- Gagniuc, P. and C. Ionescu-Tirgoviste (2012). "Eukaryotic genomes may exhibit up to 10 generic classes of gene promoters." *BMC Genomics* **13**: 512.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." *J Mol Biol* **196**(2): 261-282.
- Gaucher, P. C. E. (1882). De l'épithélioma primitif de la rate. MD These, Faculte de Medecine de Paris.
- Gilbert, J. R. and J. M. Vance (2001). "Isolation of genomic DNA from mammalian cells." *Curr Protoc Hum Genet* **Appendix 3**: Appendix 3B.
- Ginns, L. C., J. H. Ryu, et al. (1985). "Natural killer cell activity in cigarette smokers and asbestos workers." *Am Rev Respir Dis* **131**(6): 831-834.
- Giugliani, R., P. Harmatz, et al. (2007). "Management guidelines for mucopolysaccharidosis VI." *Pediatrics* **120**(2): 405-418.
- Glick, D., S. Barth, et al. (2010). "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." *J Pathol* **221**(1): 3-12.
- Goecks, J., A. Nekrutenko, et al. (2010). "Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences." *Genome Biol* **11**(8): R86.
- Goldman, R. and A. Kaplan (1973). "Rupture of rat liver lysosomes mediated by L-amino acid esters." *Biochim Biophys Acta* **318**(2): 205-216.
- Grabowski, G. A., N. W. Barton, et al. (1995). "Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources." *Ann Intern Med* **122**(1): 33-39.
- Graham, J. M. (2009). Subcellular fractionation and isolation of organelles. in: *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ.
- Gruenberg, J. and H. Stenmark (2004). "The biogenesis of multivesicular endosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 317-323.

- Hers, H. G. (1963). "alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease)." Biochem J **86**: 11-16.
- Hollak, C. E., S. van Weely, et al. (1994). "Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease." J Clin Invest **93**(3): 1288-1292.
- Hopwood, J. J., Brooks D. A. (1997). An introduction to the basic science and biology of the lysosome and storage diseases. in: Organelle diseases. D. J. E. Applegarth D. A., Hall J. G. (eds). Chapman and Hall Medical, London: pp. 7-36.
- Hopwood, J. J., S. Bunge, et al. (1993). "Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene." Hum Mutat **2**(6): 435-442.
- Horowitz, M., S. Wilder, et al. (1989). "The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution." Genomics **4**(1): 87-96.
- Hoyer-Hansen, M., L. Bastholm, et al. (2007). "Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2." Mol Cell **25**(2): 193-205.
- Hrebicek, M., L. Mrazova, et al. (2006). "Mutations in TMEM76\* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome)." Am J Hum Genet **79**(5): 807-819.
- Hruska, K. S., M. E. LaMarca, et al. (2008). "Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA)." Hum Mutat **29**(5): 567-583.
- Chaineau, M., L. Danglot, et al. (2009). "Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking." FEBS Lett **583**(23): 3817-3826.
- Cheng, S. H. and A. E. Smith (2003). "Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders." Gene Ther **10**(16): 1275-1281.
- Cherqui, S., V. Kalatzis, et al. (2001). "The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif." J Biol Chem **276**(16): 13314-13321.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Churchill, G. C., Y. Okada, et al. (2002). "NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs." Cell **111**(5): 703-708.
- Imai, K. (1985). "Characterization of beta-glucosidase as a peripheral enzyme of lysosomal membranes from mouse liver and purification." J Biochem **98**(5): 1405-1416.
- Jadot, M., F. Dubois, et al. (1997). "Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids." Eur J Biochem **249**(3): 862-869.
- Kaufmann, J. and S. T. Smale (1994). "Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex." Genes Dev **8**(7): 821-829.
- Keller, S., M. P. Sanderson, et al. (2006). "Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function." Immunol Lett **107**(2): 102-108.
- Kishnani, P. S., D. Corzo, et al. (2007). "Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease." Neurology **68**(2): 99-109.
- Klein, U., H. Kresse, et al. (1978). "Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5185-5189.
- Klein, U., J. J. van de Kamp, et al. (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**(1): 55-59.
- Klionsky, D. J., F. C. Abdalla, et al. (2012). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy." Autophagy **8**(4): 445-544.
- Kolter, T. and M. Wendeler (2003). "Chemical chaperones--a new concept in drug research." ChemBiochem **4**(4): 260-264.
- Kramer, M. F., Coen D.M. (1999). The Polymerase Chain Reaction. 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, John Wiley & Sons, Inc.: New York: p. 15.
- Kudo, M., M. Bao, et al. (2005). "The alpha- and beta-subunits of the human UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase [corrected] are encoded by a single cDNA." J Biol Chem **280**(43): 36141-36149.

- Kutach, A. K. and J. T. Kadonaga (2000). "The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters." *Mol Cell Biol* **20**(13): 4754-4764.
- Lagrange, T., A. N. Kapanidis, et al. (1998). "New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB." *Genes Dev* **12**(1): 34-44.
- Landry, J. R., D. L. Mager, et al. (2003). "Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes." *Trends Genet* **19**(11): 640-648.
- Larsen, F., G. Gundersen, et al. (1992). "CpG islands as gene markers in the human genome." *Genomics* **13**(4): 1095-1107.
- Lefrancois, S., J. Zeng, et al. (2003). "The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin." *EMBO J* **22**(24): 6430-6437.
- Leighton, F., B. Poole, et al. (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**(2): 482-513.
- Lemmon, S. K. and L. M. Traub (2000). "Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells." *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 457-466.
- Li, H. H., W. H. Yu, et al. (1999). "Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14505-14510.
- Lieberman, A. P., R. Puertollano, et al. (2012). "Autophagy in lysosomal storage disorders." *Autophagy* **8**(5): 719-730.
- Lim, C. Y., B. Santoso, et al. (2004). "The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II." *Genes Dev* **18**(13): 1606-1617.
- Lloyd-Evans, E., A. J. Morgan, et al. (2008). "Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium." *Nat Med* **14**(11): 1247-1255.
- Long, G. L., S. Winfield, et al. (1996). "Structure and organization of the human metaxin gene (MTX) and pseudogene." *Genomics* **33**(2): 177-184.
- Malinova, V., G. Wegrzyn, et al. (2012). "The use of elevated doses of genistein-rich soy extract in the gene expression-targeted isoflavone therapy for Sanfilippo disease patients." *JIMD Rep* **5**: 21-25.
- Masson, C., I. Cisse, et al. (2004). "Fabry disease: a review." *Joint Bone Spine* **71**(5): 381-383.
- Mazzulli, J. R., Y. H. Xu, et al. (2011). "Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies." *Cell* **146**(1): 37-52.
- Medina, D. L., A. Fraldi, et al. (2011). "Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance." *Dev Cell* **21**(3): 421-430.
- Meikle, P. J. and J. J. Hopwood (2003). "Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis." *Eur J Pediatr* **162 Suppl 1**: S34-37.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, et al. (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." *JAMA* **281**(3): 249-254.
- Meikle, P. J., A. M. Whittle, et al. (1995). "Human acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Kinetic characterization and mechanistic interpretation." *Biochem J* **308 ( Pt 1)**: 327-333.
- Mijaljica, D., M. Prescott, et al. (2011). "Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum." *Autophagy* **7**(7): 673-682.
- Miyajima, A., A. L. Mui, et al. (1993). "Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5." *Blood* **82**(7): 1960-1974.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, et al. (2010). "Methods in mammalian autophagy research." *Cell* **140**(3): 313-326.
- Moran, D., E. Galperin, et al. (1997). "Identification of factors regulating the expression of the human glucocerebrosidase gene." *Gene* **194**(2): 201-213.
- Muenzer, J., M. Guzsavas-Calikoglu, et al. (2007). "A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome)." *Mol Genet Metab* **90**(3): 329-337.

- Narendra, D., A. Tanaka, et al. (2008). "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy." *J Cell Biol* **183**(5): 795-803.
- Naureckiene, S., D. E. Sleat, et al. (2000). "Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease." *Science* **290**(5500): 2298-2301.
- Neufeld E. F., M. J. (2006). The mucopolysaccharidoses. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. B. A. L. Valle D., Vogelstein B., Kinzler K. W., Antonarakis S. E., Ballabio A., Gibson K. M., Mitchell G., eds.
- Ni, X. and C. R. Morales (2006). "The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor." *Traffic* **7**(7): 889-902.
- Nishino, I., J. Fu, et al. (2000). "Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease)." *Nature* **406**(6798): 906-910.
- Noskova, L., V. Stranecky, et al. (2011). "Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis." *Am J Hum Genet* **89**(2): 241-252.
- Ohmi, K., D. S. Greenberg, et al. (2003). "Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1902-1907.
- Ohsumi, Y., T. Ishikawa, et al. (1983). "A rapid and simplified method for the preparation of lysosomal membranes from rat liver." *J Biochem* **93**(2): 547-556.
- Palmieri, M., S. Impey, et al. (2011). "Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways." *Hum Mol Genet* **20**(19): 3852-3866.
- Patel, S., J. S. Marchant, et al. (2010). "Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals." *Cell Calcium* **47**(6): 480-490.
- Phornphutkul, C., Y. Anikster, et al. (2001). "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* **69**(4): 712-721.
- Poorthuis, B. J., R. A. Wevers, et al. (1999). "The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands." *Hum Genet* **105**(1-2): 151-156.
- Preker, P., K. Almvig, et al. (2011). "PROMoter uPstream Transcripts share characteristics with mRNAs and are produced upstream of all three major types of mammalian promoters." *Nucleic Acids Res* **39**(16): 7179-7193.
- Preker, P., J. Nielsen, et al. (2008). "RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters." *Science* **322**(5909): 1851-1854.
- Reczek, D., M. Schwake, et al. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." *Cell* **131**(4): 770-783.
- Reiner, O. and M. Horowitz (1988). "Differential expression of the human glucocerebrosidase-coding gene." *Gene* **73**(2): 469-478.
- Rome, L. H., D. F. Hill, et al. (1983). "Utilization of exogenously added acetyl coenzyme A by intact isolated lysosomes." *J Biol Chem* **258**(5): 3006-3011.
- Ron, I., D. Rapaport, et al. (2010). "Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: a possible link between Parkinson disease and Gaucher disease." *Hum Mol Genet* **19**(19): 3771-3781.
- Saftig, P. and J. Klumperman (2009). "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 623-635.
- Sardiello, M., M. Palmieri, et al. (2009). "A gene network regulating lysosomal biogenesis and function." *Science* **325**(5939): 473-477.
- Settembre, C., R. De Cegli, et al. (2013). "TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop." *Nat Cell Biol* **15**(6): 647-658.
- Settembre, C., C. Di Malta, et al. (2011). "TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis." *Science* **332**(6036): 1429-1433.
- Settembre, C., A. Fraldi, et al. (2013). "Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(5): 283-296.
- Settembre, C., A. Fraldi, et al. (2008). "Lysosomal storage diseases as disorders of autophagy." *Autophagy* **4**(1): 113-114.



- Settembre, C., R. Zoncu, et al. (2012). "A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB." *EMBO J* **31**(5): 1095-1108.
- Shenoy, A. R. and S. S. Visweswariah (2003). "Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA." *Anal Biochem* **319**(2): 335-336.
- Shimura, H., N. Hattori, et al. (2000). "Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase." *Nat Genet* **25**(3): 302-305.
- Schroder, B., H. P. Elsasser, et al. (2007). "Characterisation of lipofuscin-like lysosomal inclusion bodies from human placenta." *FEBS Lett* **581**(1): 102-108.
- Schroder, B., C. Wrocklage, et al. (2007). "Integral and associated lysosomal membrane proteins." *Traffic* **8**(12): 1676-1686.
- Schroder, B. A., C. Wrocklage, et al. (2010). "The proteome of lysosomes." *Proteomics* **10**(22): 4053-4076.
- Smale, S. T. (2001). "Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation." *Genes Dev* **15**(19): 2503-2508.
- Smale, S. T. and J. T. Kadonaga (2003). "The RNA polymerase II core promoter." *Annu Rev Biochem* **72**: 449-479.
- Somsel Rodman, J. and A. Wandinger-Ness (2000). "Rab GTPases coordinate endocytosis." *J Cell Sci* **113 Pt 2**: 183-192.
- Spampanato, C., E. Feeney, et al. (2013). "Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease." *EMBO Mol Med* **5**(5): 691-706.
- Stenmark, H. and V. M. Olkkonen (2001). "The Rab GTPase family." *Genome Biol* **2**(5): REVIEWS3007.
- Stuart, L. M. and R. A. Ezekowitz (2008). "Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly." *Nat Rev Immunol* **8**(2): 131-141.
- Suzuki, Y., T. Tsunoda, et al. (2001). "Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes." *Genome Res* **11**(5): 677-684.
- Tanaka, Y., G. Guhde, et al. (2000). "Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice." *Nature* **406**(6798): 902-906.
- Taute, A., K. Watzig, et al. (2002). "Presence of detergent-resistant microdomains in lysosomal membranes." *Biochem Biophys Res Commun* **298**(1): 5-9.
- Trinklein, N. D., S. F. Aldred, et al. (2004). "An abundance of bidirectional promoters in the human genome." *Genome Res* **14**(1): 62-66.
- Tsuji, S., P. V. Choudary, et al. (1987). "A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease." *N Engl J Med* **316**(10): 570-575.
- Tsuji, S., B. M. Martin, et al. (1988). "Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(7): 2349-2352.
- Tylki-Szymanska, A., M. Keddache, et al. (2006). "Characterization of neuronopathic Gaucher disease among ethnic Poles." *Genet Med* **8**(1): 8-15.
- Ungewickell, E. J. and L. Hinrichsen (2007). "Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding." *Curr Opin Cell Biol* **19**(4): 417-425.
- Valstar, M. J., G. J. Ruijter, et al. (2008). "Sanfilippo syndrome: a mini-review." *J Inherit Metab Dis* **31**(2): 240-252.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* **3**(7): RESEARCH0034.
- Velayati, A., W. H. Yu, et al. (2010). "The role of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease and Lewy body disorders." *Curr Neurol Neurosci Rep* **10**(3): 190-198.
- Vives-Bauza, C., R. L. de Vries, et al. (2010). "PINK1/Parkin direct mitochondria to autophagy." *Autophagy* **6**(2): 315-316.
- Wattiaux, R., Wattiaux-De Coninck S. (1983). Separation of cell organelles. *in: Iodinated Density Gradient Media: A Practical Approach*. D. Pickwood, ed., Oxford University Press, Oxford.: pp. 119-137.

- Wei, W., V. Pelechano, et al. (2011). "Functional consequences of bidirectional promoters." Trends Genet **27**(7): 267-276.
- Wilkinson, F. L., R. J. Holley, et al. (2012). "Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB." PLoS One **7**(4): e35787.
- Winfield, S. L., N. Tayebi, et al. (1997). "Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease." Genome Res **7**(10): 1020-1026.
- Wraith, J. E., L. A. Clarke, et al. (2004). "Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase)." J Pediatr **144**(5): 581-588.
- Yang, C., E. Bolotin, et al. (2007). "Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters." Gene **389**(1): 52-65.
- Yap, T. L., J. M. Gruschus, et al. (2011). "Alpha-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases." J Biol Chem **286**(32): 28080-28088.
- Yap, T. L., A. Velayati, et al. (2013). "Membrane-bound alpha-synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity." Mol Genet Metab **108**(1): 56-64.
- Zaid, A., Z. Hodny, et al. (2001). "Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter." Eur J Biochem **268**(21): 5497-5503.
- Zhu, J., F. He, et al. (2008). "On the nature of human housekeeping genes." Trends Genet **24**(10): 481-484.
- Zimran, A., G. Altarescu, et al. (2010). "Phase 1/2 and extension study of velaglucerase alfa replacement therapy in adults with type 1 Gaucher disease: 48-month experience." Blood **115**(23): 4651-4656.
- Zimran, A., D. Elstein, et al. (1995). "Enzyme replacement therapy in type 1 and type 3 Gaucher's disease." Lancet **345**(8947): 451-452.
- Zimran, A., J. Sorge, et al. (1990). "A glucocerebrosidase fusion gene in Gaucher disease. Implications for the molecular anatomy, pathogenesis, and diagnosis of this disorder." J Clin Invest **85**(1): 219-222.

## 9 Publikace a prezentace

### 9.1 Seznam publikací

**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.

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.

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

## 9.2 Seznam prezentací

**Svobodová E.**, Uřinová J., Sikora J., Hřebíček M.: Charakterizace proteinu HGSNAT pomocí protilátky Ca 14-0010. Poster. Závěrečná konference doktorského projektu GAČR 303/03/H065, Praha (18.6. 2007).

**Hřebíček M.**, Mrázová L., Majewski J., Morgan K., Seyrantepe V., Durand S., Nosková L., Hartmannová H., Ivánek R., Čížková A., Poupětová H., Sikora J., Uřinová J., **Svobodová E.**, Stránecký V., Michelakakis H., Stuke-Sontheimer A., Steifeld R., Zeman J., Psezhetsky A. and Kmoch S.: Mutations in TMEM76 are associated with acetyl coenzyme A:  $\alpha$ -glucosaminide N acetyltransferase deficiency in MPS III C (Sanfilippo C) patients: an update. Přednášel M. Hřebíček. 16th ESGLD Workshop, Perugia, Italy (27.9. -30.9. 2007).

**Uřinová J.**, Sikora J., **Svobodová E.**, Cmarko D., Hřebíček M.: Microscopic evidence for HGSNAT-containing microdomains in lysosomal membrane. Poster. 47th ASCB Annual Meeting, Washington, DC (1.12. -5.12. 2007).

**Svobodová E.**, Lukšan O., Mrázová L., Stolnaya L., Minks J., Eberová J., Dvořáková L., Jirsa M., Hřebíček M.: Glucocerebrosidase gene has an alternative promoter 2.6 kb upstream of usual promoter, leading to variant glucocerebrosidase transcripts, but identical predicted amino-acid sequence. Poster. 24. pracovní dny DMP, Jeseník (13.5. – 15.5. 2009).

**Svobodová E.**, Lukšan O., Mrázová L., Sikora J., Majer F., Stolnaya L., Minks J., Eberová J., Dvořáková L., Jirsa M., Hřebíček M.: The alternative glucocerebrosidase promoter is located in a 1000-bp region 2.6 kb upstream of the usual promoter. Poster. 17th ESGLD Workshop, Bad Honnef, Germany (10.9. – 13.9. 2009).

**Svobodová E.**, Lukšan O., Mrázová L., Sikora J., Majer F., Stolnaya L., Minks J., Eberová J., Dvořáková L., Jirsa M., Hřebíček M.: The alternative glucocerebrosidase promoter is located in a 1000-bp region 2.6 kb upstream of the usual promoter. Poster. 59th ASHG Annual Meeting, Honolulu, Hawaii (20.10. - .24.10.2009).

**Svobodová E.**, Lukšan O., Mrázová L., Stolnaya L., Dvořáková L., Jirsa M., Hřebíček M.: Glucocerebrosidase alternative promoter has features and expression characteristic of housekeeping genes. Přednáška. 9th EWGGD Workshop, Cologne, Germany (30.6. – 3.7. 2010).

**Svobodová E.**, Lukšan O., Mrázová L., Stolnaya L., Dvořáková L., Jirsa M., Hřebíček M.: Glucocerebrosidase alternative promoter has features and expression characteristic of housekeeping genes. Poster. 51<sup>th</sup> Annual Short Course on Medical and Experimental Mammalian Genetics (18. – 30. 7. 2010).

**Richtrová E.**, Lukšan O., Mrázová L., Stolnaya L., Dvořáková L., Jirsa M., Hřebíček M.: Characterization of *TATA*-less *HGSNAT* promoter. Poster. 28. pracovní dny DMP, Tábor (15. - 17.5. 2013).

**Richtrová E.**, Lukšan O., Mrázová L., Stolnaya L., Dvořáková L., Jirsa M., Hřebíček M.: Characterization of *TATA*-less *HGSNAT* promoter. Poster. 19th ESGLD Workshop, Leibnitz, Austria (26.9. – 29.9. 2013).

## 9.3 Svobodová et al., Blood Cells Mol Dis. 2011

Blood Cells, Molecules, and Diseases 46 (2011) 239–245



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules, and Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybcmd](http://www.elsevier.com/locate/ybcmd)



### Glucocerebrosidase gene has an alternative upstream promoter, which has features and expression characteristic of housekeeping genes

Eva Svobodová<sup>a</sup>, Lenka Mrázová<sup>a</sup>, Ondřej Lukšan<sup>b</sup>, Deborah Elstein<sup>c</sup>, Ari Zimran<sup>c</sup>, Larisa Stolnaya<sup>a</sup>, Jakub Minks<sup>a,1</sup>, Jitka Eberová<sup>b,2</sup>, Lenka Dvořáková<sup>a</sup>, Milan Jirsa<sup>b</sup>, Martin Hřebíček<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University, 1st Faculty of Medicine and University Hospital, Ke Karlovu 2, Prague 120 08, Czech Republic

<sup>b</sup> Laboratory of Experimental Hepatology, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Vládkova 1958/9, Prague 140 21, Czech Republic

<sup>c</sup> Gaucher Clinic, Shaare Zedek Medical Center, PO Box 3235, Jerusalem 910 31, Israel

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Submitted 22 December 2010

Available online 20 January 2011

(Communicated by A. Zimran, M.D., 22 December 2010)

##### Keywords:

Glucocerebrosidase  
Alternative promoter  
Housekeeping gene  
Gene expression  
Gaucher disease

#### ABSTRACT

Database searches have shown that a part of glucocerebrosidase (*GBA*) transcripts may originate at an alternative upstream promoter (P2) located 2.6 kb upstream of the known (P1) *GBA* promoter. The putative alternative transcripts contained one or two extra exons (exon -2 or exons -2, -1, respectively), but the first ATG codon and predicted amino-acid sequence are the same as in the transcript from P1. Luciferase assays confirmed promoter activity of both sites in HepG2 cells: the P1 construct exhibited the highest activity of luciferase ( $17.82 \pm 1.10$  relative luciferase units), while the P2 construct reached  $3.01 \pm 0.43$  relative luciferase units. Serial 5' deletions of P2 led to changes in reporter activity, the most prominent decreases were observed in deletion constructs carrying bases -353 to -658, and -353 to -920 (numbered as in NM\_001005750.1), respectively. This suggests that the P2 core promoter is contained within the region of -920 bp to -1311 bp.

Three P2 transcription initiation sites were found by 5' RACE at positions 347, 380, and 413 bp upstream of the +1 ATG. The expression stability of transcripts from P2, P1 was studied in 20 human tissues and was higher than that of GAPDH and ACTB, which are commonly used as reference housekeeping genes. The P2 contains an unmethylated CpG island, multiple Sp-1 consensus binding sites and, unlike P1, does not contain a TATA box, features all common to the majority of housekeeping gene promoters.

We have examined DNA samples from a phenotypically diverse group of twenty Ashkenazi Jewish Gaucher patients homozygous for the common mild mutation N370S. Both P1 and P2, as well as exons -2 and -1, did not contain any sequence variations, with the exception of the known polymorphism rs10908459 found on one allele. The phenotypical differences in the patients were thus not explained by nucleotide variations in both promoters.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### Introduction

Gaucher disease is a glycolipid storage disorder caused by an inherited deficiency of activity of glucocerebrosidase, a hydrolase that catalyzes one step in lysosomal degradation of glycosphingolipids [1]. Gaucher patients carry mutations in the gene encoding glucocerebro-

sidase (*GBA*) located in a gene-rich region at 1q21; the gene spans 7.8 kb and contains 11 exons and 10 introns. A highly homologous transcribed but untranslated pseudogene (*psGBA*), which is a result of a tandem duplication event involving ancestral *GBA* and neighbouring metaxin genes, is located 16 kb downstream from *GBA* [2]. This duplication, which probably occurred before the divergence of great apes and Old World monkeys, has been found only in primates and humans [3].

Although glucocerebrosidase is expressed in all cell types – a feature characteristic of housekeeping genes – differences in its expression levels in cell lines suggested at least some degree of differential regulation of expression. Also, glucocerebrosidase activity to mRNA levels ratios has not been concordant in all examined cell lines. Because of this, it has been suggested that in addition to regulation by mRNA levels, *GBA* activity must be controlled also by other mechanisms [4,5].

The majority of housekeeping genes characteristically have TATA-less promoters containing CpG islands and are enriched in binding

\* Corresponding author. Fax: +420224967212.

E-mail addresses: [evas@email.cz](mailto:evas@email.cz) (E. Svobodová), [lmraz@lf1.cuni.cz](mailto:lmraz@lf1.cuni.cz) (L. Mrázová), [onlu@medicon.cz](mailto:onlu@medicon.cz) (O. Lukšan), [debbyelstein@gmail.com](mailto:debbyelstein@gmail.com) (D. Elstein), [azimran@gmail.com](mailto:azimran@gmail.com) (A. Zimran), [larisastolnaya@lf1.cuni.cz](mailto:larisastolnaya@lf1.cuni.cz) (L. Stolnaya), [minksj@interchange.ubc.ca](mailto:minksj@interchange.ubc.ca) (J. Minks), [jitule1@centrum.cz](mailto:jitule1@centrum.cz) (J. Eberová), [lenka.dvorakova@lf1.cuni.cz](mailto:lenka.dvorakova@lf1.cuni.cz) (L. Dvořáková), [miji@ikem.cz](mailto:miji@ikem.cz) (M. Jirsa), [mhreb@lf1.cuni.cz](mailto:mhreb@lf1.cuni.cz) (M. Hřebíček).

<sup>1</sup> Present address: Dept. of Medical Genetics, University of British Columbia, B.C., Canada.

<sup>2</sup> Present address: Genetwister Technologies B.V., Nieuwe Kanaal 7b, 6709 PA Wageningen, Netherlands.

sites for some transcription factors, including Sp1 [6]. The glucocerebrosidase promoter located immediately upstream of exon 1 (P1) does not have an associated CpG island and contains a TATA box [2]. Other regulatory elements were identified in the promoter, whose ability to drive expression of a reporter gene was shown in several human cell lines. Binding of transcription factors was confirmed by gel-shift assays. It has been elucidated, by deletion analysis, that there are several enhancers and a repressor [7].

Currently, there are five alternative transcripts annotated in the databases, four of which apparently originate at an alternative promoter (P2) located 2.6 kb upstream of the first ATG and contain either one or two extra exons (exon -2 or both exons -2 and -1, respectively) (Fig. 1). These transcripts are not predicted to alter the amino-acid sequence of the glucocerebrosidase as their variable 5' ends do not contain initiation codons.

In this study, we show that the region 1 kb upstream of exon -2 can function as an alternative promoter of glucocerebrosidase and we also analyze its properties. We found transcripts from P2 promoter in multiple tissues, confirming that the promoter is used *in vivo*.

We have also examined the sequence of exons -2, -1 and the P1 and P2 promoters in a group of Ashkenazi Jewish Gaucher patients homozygous for the N370S mutation [8] who presented with discordant phenotypes.

## Patients and methods

### Patients and genotyping

A group of 20 Ashkenazi Jewish type 1 Gaucher patients homozygous for the N370S mutation were included in the study on the basis of written informed consent. Ten of them had mild Gaucher phenotype, which is the usual presentation of the disease in patients with this genotype, while the remaining patients had severe form of the disease. The P1, P2, exons -1 and -2 were amplified from genomic DNA in each patient and sequenced. Primer sequences are in Table 1.

### Numbering of sequences

The promoter and cDNA sequences were numbered beginning with the A in the initiation ATG codon according to Reference Sequence NM\_000157.2 for the P1 promoter and Reference Sequence NM\_001005750.1 for the P2 promoter. No base was assigned to zero position.

### Sequencing of RT-PCR products

GBA transcripts originating at P2 were probed by RT-PCR using primers U4 and L9 (Table 1). Upstream primer annealed to exon -2, while downstream primer annealed in exon 9 to the sequence deleted in the pseudogene, making the amplification specific for the active

gene. The products were gel-purified, cloned, and individual clones were sequenced.

### Generation of reporter gene constructs

PCR products (921 and 1156 bp long, respectively) containing the sequence of P1 (-948/-27, NM\_000157.2; NG\_009783.1, g.7639-8559) or P2 (-1509/-353, NM\_001005750.1, NG\_009783.1, g.3892-5047) promoters were amplified using primers with overhangs containing sequences recognized either by *KpnI* or *XhoI* restriction enzymes (forward and reverse primers, respectively, Table 1). Primer sequences were derived from genomic sequence of chromosome 1 (Reference Sequence NG\_009783.1). The fragments were gel-purified and directly cloned in the TA cloning vector pCR®4-TOPO® (Life Technologies (Invitrogen, Carlsbad, USA), and the resulting constructs were verified by sequencing. Positive clones were double digested with *KpnI* and *XhoI* (Fermentas), released fragments were cloned in both sense and antisense orientations into pGL4.16 (luc2CP/Hygro) vector (Promega, Madison, USA) upstream of the firefly luciferase reporter gene, generating pGL4 -1509/-353 and pGL4 -948/-27 constructs, respectively.

### Generation of serial deletions in P2 constructs

Serial deletions of P2-containing construct pGL4 -1509/-353 were created by site-directed mutagenesis using the QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, USA) [9]. Primers listed in Table 1 were used to generate mutant constructs with different 5' end deletions (pGL4 -1311/-353, pGL4 -1164/-353, pGL4 -920/-353 and pGL4 -658/-353) according to the manufacturer's instructions. All deletions were confirmed by DNA sequencing.

### Cell culture, transfection and reporter gene analysis

HepG2 (human hepatoblastoma) cells cultured in Opti-MEM® (Invitrogen) were supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum. The cells were grown in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. A total of 5 × 10<sup>4</sup> HepG2 cells per well were seeded into a 24-well culture plate 1 day prior to transfection. 500 ng of each construct was transfected into HepG2 cells using the Tfx™-20 Reagent (Promega). The empty pGL4 vector was transfected simultaneously. The pRL-TK vector (Promega) harboring the Renilla luciferase gene was co-transfected as an internal control to normalize for the transfection efficiency. Each construct was transfected in triplicate, and each transfection experiment was repeated independently at least three times. After 48 h, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with 100 µl of the passive lysis buffer (Promega). The luciferase reporter gene activity was assayed using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). The intensity of chemiluminescence in the supernatant was measured using a luminometer (Berthold, Bad

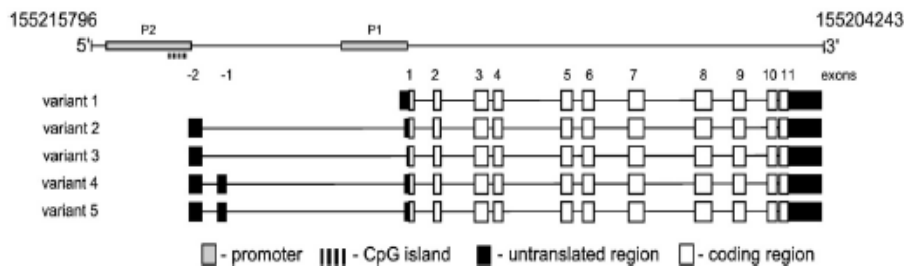


Fig. 1. Alternative transcripts of GBA. GBA transcripts according to GeneBank reference sequences: variant 1 (Acc.No. NM\_000157.2) variant 2 (Acc.No. NM\_001005741.1), variant 3 (Acc.No. NM\_001005742.1), variant 4 (Acc.No. NM\_001005749.1), and variant 5 (Acc.No. NM\_001005750.1). The position of P1, P2, and of the P2-associated CpG island are shown.

**Table 1**  
Primers used for amplifications and generation of deletions constructs (see Patients and methods).

Amplified region	Forward primer	5' Position	Reverse primer	5' Position	Annealing temp. (°C)	Length (bp)
P1_sense <sup>a</sup>	5'-GCTACCGTGTGCCACTCCGGCTAAATC-3'	g. 7638 (NC_009783.1)	5'-CTCGAGACCCACAGGGGTCCAGACT-3'	g. 8559 (NC_009783.1)	67	921
P1_antisense <sup>a</sup>	5'-CTCGAGGTGTGCCACTCCGGCTAAATC-3'	g. 7638 (NC_009783.1)	5'-GGTACCAGACCCACAGGGGTCCAGACT-3'	g. 8559 (NC_009783.1)	67	921
P2_sense <sup>a</sup>	5'-GCTACCTTTCACTGACACCCAAATCCC-3'	g. 3892 (NC_009783.1)	5'-CTCGAGGAGAAAAGCAGCCCTGGGGAG-3'	g. 5047 (NC_009783.1)	67	1156
P2_antisense <sup>a</sup>	5'-CTCGAGTTTCACTGACACCCAAATCCC-3'	g. 3892 (NC_009783.1)	5'-GGTACCCAGAAAAGCAGCCCTGGGGAG-3'	g. 5047 (NC_009783.1)	67	1156
Exons -1, -2	5'-TGAGGAAGGGCTCTGAGTCC-3'	g. 4958 (NC_009783.1)	5'-TCAAGCGGAGGGTAGGGACC-3'	g. 5828 (NC_009783.1)	65	871
U4_L9	5'-GCTGCTGTTCTCTTCCGGAC-3'	g. 5170 (NC_009783.1)	5'-GGTCTCTCTTCCGGGTCA-3'	c.1485 (NM_001005750.1)	63	1515
-353/-1311 <sup>b</sup>	5'-CCTAACTGCCCGCTACTACTGGGATTACAGG-3'	g. 4090 (NC_009783.1)			60	
-353/-1164 <sup>b</sup>	5'-CCTAACTGCCCGCTACTACTAGAGGCTGCACTC-3'	g. 4237 (NC_009783.1)			60	
-353/-920 <sup>b</sup>	5'-CTAACTGCCCGCTACTACTGGGATTACAGG-3'	g. 4481 (NC_009783.1)			60	
-353/-658 <sup>b</sup>	5'-CCTAACTGCCCGCTACTACTGGGATTACAGG-3'	g. 4743 (NC_009783.1)			60	
U1_L1	5'-CCTGAGGCTCTCTAAAGAGGAGGTTAGGAA-3'	g. 4683 (NC_009783.1)	5'-GAGTCTCTGAAGGATAGAGGATCCCTTAA-3'	c.323 (NM_001005750.1)	65	674
U2_L1	5'-CGACACCGATCGGTACTTCTC-3'	g. 4795 (NC_009783.1)	5'-GAGTCTCTGAAGGATAGAGGATCCCTTAA-3'	c.323 (NM_001005750.1)	65	562
U3_L1	5'-CCAGCGACACTGTTCTTCAACTT-3'	g. 4920 (NC_009783.1)	5'-GAGTCTCTGAAGGATAGAGGATCCCTTAA-3'	c.323 (NM_001005750.1)	65	437
U4_L1	5'-GCTGCTGTTCTCTTCCGGAC-3'	g. 5170 (NC_009783.1)	5'-GAGTCTCTGAAGGATAGAGGATCCCTTAA-3'	c.323 (NM_001005750.1)	65	187
U1_L2	5'-CCTGAGGCTCTCTAAAGAGGAGGTTAGGAA-3'	g. 4683 (NC_009783.1)	5'-AAGACCCACAGGGCTTCCAGAC-3'	c.351 (NM_001005750.1)	65	692
U2_L2	5'-CGACACCGATCGGTACTTCTC-3'	g. 4795 (NC_009783.1)	5'-AAGACCCACAGGGCTTCCAGAC-3'	c.351 (NM_001005750.1)	65	580
U3_L2	5'-CCAGCGACACTGTTCTTCAACTT-3'	g. 4920 (NC_009783.1)	5'-AAGACCCACAGGGCTTCCAGAC-3'	c.351 (NM_001005750.1)	65	455
U4_L2	5'-GCTGCTGTTCTCTTCCGGAC-3'	g. 5170 (NC_009783.1)	5'-AAGACCCACAGGGCTTCCAGAC-3'	c.351 (NM_001005750.1)	65	205
Meth1	5'-GGTGGATTATTCTGGGAATTAAT-3'	g. 4731 (NC_009783.1)	5'-TCAAAACCCCTCTCAAATCTCATT-3'	g. 4973 (NC_009783.1)	56	242
Meth2	5'-AATGAGATTGAGGAGCGTTTTCAG-3'	g. 4949 (NC_009783.1)	5'-CCATTACACTCCAACTAAAC-3'	g. 5340 (NC_009783.1)	56	391
Meth3	5'-GTTTACGTTGCACTGTAATCG-3'	g. 5320 (NC_009783.1)	5'-TCATTATAAAAATCTAACCTCTTACC-3'	g. 5630 (NC_009783.1)	56	310

Primer positions correspond to 5' end of the primers, either in genomic or cDNA reference sequence.

<sup>a</sup> Underlined sequence is a non-hybridizing overhang.

<sup>b</sup> Primer used for generation of serial deletions in P2 insert by site-directed mutagenesis. Underlined sequence anneals to the vector pGL4, while the rest of the primer anneals to P2. The position indicates the 5' end of the P2-hybridizing sequence.

Wildbad, Germany) and expressed as the ratio of Renilla luciferase to firefly luciferase luminescence (RLU, relative luciferase units).

**Identification of the transcription initiation site**

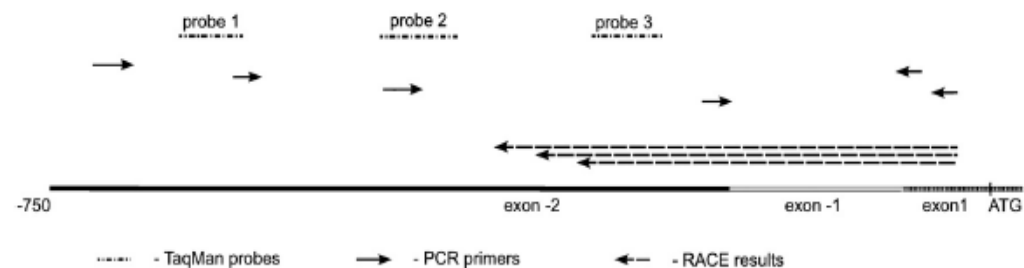
**PCR**

RT-PCR was used to approximate the position of the transcription initiation site. Four upper primers and two lower primers were

designed (Table 1). PCR products were gel-purified and sequenced. Upper primers were designed to anneal to the presumed 5' ends of the transcript. Lower primers annealed to the junction of exon -1 and exon 1 and in the exon 1, respectively (Fig 2).

**5' RACE**

Transcription initiation sites of the gene were identified by 5' RACE technique that amplifies products only from capped mRNAs [10]. 5'



**Fig. 2.** Location of TaqMan probes and primers relative to transcription initiation sites.



RACE was carried out using the GeneRacer™ Kit (Invitrogen) with RNAs isolated from human leukocytes, liver, and placenta. Alternatively, the FirstChoice® RLM-RACE Kit (Ambion (Life Technologies), Austin, USA) was used with the FirstChoice® Human Placenta Total RNA (Ambion). Nested PCR was performed with 5' RACE universal primers and gene-specific primers. Primers 5'-aagaccacaggggtcca-gag-3' or 5'-gagtcctctgaaggatagggatccagctaa-3' were used for the first round of amplification, while 5'-caggaatggagaccagctgac-3' and 5'-ggcaaacgaaatccaccgcag-3', for the second, respectively. Obtained cDNA fragments were gel purified and sequenced directly and/or after cloning into TA cloning vector pCR®4-TOPO® (Invitrogen).

#### Real-time PCR

The utilization of transcription initiation sites was studied by quantitative RT-PCR. Primers and TaqMan probes were designed using Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems (Life Technologies), Foster City, USA) to be specific for the sequence upstream (probe 1 and probe 2) and downstream (probe 3) of transcription initiation sites identified by 5' RACE (Fig. 2, Table 2). Amplification conditions are available upon request. All reactions were performed using StepOne™ Real-time PCR system (Applied Biosystems). cDNA was obtained by reverse transcription of Human Placenta Total RNA (Ambion) using High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems). A standard curve was generated by tenfold serial dilutions of the gDNA for each assay, yielding correlation coefficients  $\geq 0.98$  in all experiments. Each standard and sample value was determined in duplicate. The expression of targets of all three assays was quantified from the standard curve.

#### Expression profile of P2 and P1 transcripts

TaqMan probes 3 and 4, respectively (Table 2), were used for the determination of expression stability of promoters P2 and P1. The specificity of probe 4 was verified by absolute quantification using oligonucleotides complementary to GBA gene and pseudogene (Generi Biotech, Prague, Czech Republic, sequence not shown). Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -actin (ACTB) was quantified with probes purchased from Applied Biosystems (Cat. No. 4326317E and 4326315E, respectively). cDNAs were reverse transcribed from FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel (Ambion) as described above. Purified RNAs were precisely quantified by the manufacturer and declared concentrations of RNA were used. Negative controls without template were included in each plate. Amplification efficiencies of all probes were tested by construction of standard curves using serial dilutions of cDNA and ranked between 91% and 114%.

The expression stability of GBA and commonly used housekeeping genes GAPDH and ACTB were evaluated using geNorm (version 3.5) and NormFinder software packages, which examine expression stability of genes using different algorithms [11,12]. Ct values were transformed to relative quantities using delta Ct method assuming the amplification efficiency equal to 2 in all cases.

#### DNA methylation

The methylation status of the CpG island overlapping with P2 was studied using bisulphite sequencing. Bisulphite-modified genomic

DNA [13] of three control individuals served as a template for amplification of the CpG-rich sequence in the vicinity of P2 in three fragments. Primers designed to anneal to the modified DNA are listed in Table 1. Gel-purified products were sequenced.

#### Bioinformatics—identification of putative transcription factor binding sites

The search for putative transcription factor binding sites was performed using TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), MatInspector program (<http://www.genomatix.de/shop/evaluation.html>) [14] and Alibaba2 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#alibaba2>).

GBA reference transcripts were obtained from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), the sequences were last accessed on 26th August 2010). Expressed sequence tags (ESTs) containing sequence homologous to exons -2 and -1 were identified using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and/or UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

The multiple alignment of -2 exon and P2 region (Supplementary data) was modified from 44-way alignment of assembled genomes available from Galaxy (<http://main.g2.bx.psu.edu/>) [15].

#### Results

The constructs containing the sequence of both P1 (in pGL4\_P1+) and P2 (in pGL4\_P2+), respectively, delivered significantly higher levels of reporter activity than negative controls with the same sequence in antisense orientation as well as the empty vector. The P1 construct exhibited the highest activity of luciferase ( $17.82 \pm 1.10$  relative luciferase units), while the P2 construct reached  $3.01 \pm 0.43$  relative luciferase units (Fig. 3).

The pGL4 -1509/-353 containing the whole sequence of P2 and the deletion construct pGL4 -1164/-353 displayed comparable levels of luciferase activity, but the other deletion constructs led to changes in reporter activity. The highest activity was observed in pGL4 -1311/-353, while pGL4 -658/-353 exhibited dramatically lower luciferase activity. The lowest activity was observed in pGL4 -920/-353 (Fig. 4). This suggests that the P2 core promoter is located within the region ranging from -920 bp to -1311 bp. The region -1311 bp to -1509 bp probably contains a negative regulator of transcription activity.

RT-PCR products corresponding to transcript variants containing exon -2 or both exons -1 and -2 were found by RT-PCR in cDNA prepared from placental RNA. 5' RACE identified three transcription initiation sites at the P2, corresponding to the positions 347, 380 and 413 bp upstream of the +1 ATG (Fig. 2, Supplementary data). Most of the clones had 5' ends at the position -347 and only few clones at the position -413. Two clones (of the total of 40) were at positions -452 and -563, respectively. We were, however, able to amplify weak RT-PCR products up to position -500 bp. RT amplifications with primers annealing upstream of this region did not yield any products.

The levels of transcripts initiating upstream of sites identified by 5' RACE were studied by quantitative RT-PCR. The signal from probe 3 (downstream of -347) was 300 times higher than that of probe 1 (upstream of -563); the signal from probe 2 (upstream of -413) was only twice as high as the signal from probe 1. This result

**Table 2**  
TaqMan probes and primers.

TaqMan assay	Forward primer	$T_m$ (°C)	Reverse primer	$T_m$ (°C)	Probe	$T_m$ (°C)
promII GBA1	5'-AGAGTCTTACTGCCGGGG-3'	59	5'-AGCCTCGAAAGCCGCC-3'	60	5'-AGTCTCAGTCCC GCC-3'	69
promII GBA2	5'-GCTCGCCAGCGACACTTC-3'	60	5'-GGACTCAGAGCCCTTCTCAA-3'	59	5'-CGTTCAACTGACCAATG-3'	69
promII GBA3	5'-TCAATCGCCCAATCCA-3'	60	5'-TGGCTGTCCGCTTTTC-3'	59	5'-CAACAGTGTCTGGCC-3'	70
promII GBA4	5'-CGGAATTACTTGCAGCCCTTA-3'	58	5'-CAAAAACAAGGATGACGCTAOCCT-3'	58	5'-CCTAGTGCCTATAGCTAAG-3'	69

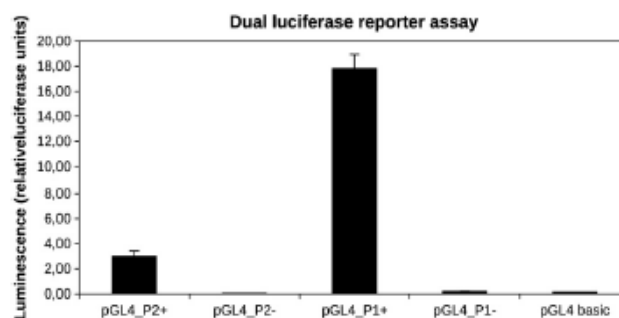


Fig. 3. Reporter activity of P1 and P2 of the GBA. Both the P1 (pGL4\_P1+) and P2 (pGL4\_P2+) reporter luciferase activities are shown in RLU (relative luciferase unit). The RLU activity of each construct is plotted as fold increases over that of the pGL4 vector. Error bars represent standard deviation. The pGL4 vector, and the constructs with P1 (pGL4\_P1-) and P2 (pGL4\_P2-) promoters cloned in antisense orientation, were used as a negative control and exhibited negligible luciferase activity.

corresponds well with 5' RACE, where most clones had 5' end at positions -347, -380, -413 (Fig. 2).

The expression stability of transcripts from P2, P1, and two housekeeping genes (GAPDH and ACTB) was studied in 20 human tissues. The Ct values determined by real-time PCR for the mRNAs from P1, P2, GAPDH, and ACTB are shown in Fig. 5. Both geNorm and NormFinder found the expression stabilities of P1 and P2 transcripts comparable, while both were higher than stabilities of the established housekeeping genes GAPDH and ACTB (Table 3). The expression profile of P1 and P2 followed the same trend among tissues (Fig. 5). The results of bisulphite sequencing showed that the CpG island was unmethylated (data not shown).

The multiple sequence alignment showed that P2 is conserved in primates. The best homology was obtained in chimpanzee, gorilla, and orangutan. Exon -1 homology was found only in gorilla. Analysis of P2 sequence predicted consensus binding sites for a number of transcription factors. No consensus TATA or CAAT boxes were identified, but multiple Sp1 binding sites were found. In addition, conserved binding sites for several other transcription factors, GATA-1, AP-1, YY1, CREB, CRE-BP, E2F, and two CLEAR motifs were also found (Supplementary data).

The results of sequencing study in Ashkenazi Jewish Gaucher patients homozygous for the N370S did not support our hypothesis that sequence variations in P1, P2, exons -2 and -1 may influence Gaucher phenotype. No sequence variations have been found in the

patients with the exception of a known polymorphism rs10908459 (dbSNP build 131, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>) found in heterozygosity in one of the patients.

### Discussion

Four of the five known glucocerebrosidase transcripts contain exon -2 (variants 2, 3, 4, and 5) or both exon -2 and exon -1 (variants 4 and 5). Transcripts 4 and 5 differ in three nucleotides at the junction of exons -2 and -1 and transcripts 2 and 3 differ in nineteen nucleotides at the junction of exon -1 and 1 (Fig. 1). The existence of these variant transcripts is supported by a number of full-length clones and ESTs in databases (not shown). Horowitz and co-workers [2] confirmed that the region immediately upstream of exon 1 (P1 promoter) functions as a promoter of glucocerebrosidase from which variant 1 mRNA is transcribed.

In this paper, we show that the sequence upstream of exon -2 (P2 promoter) drives transcription of mRNA in the *in vitro* reporter assay and the deletions of parts of the region lead to severe reduction of the reporter activity. The P2 promoter fragment drove the transcription of the reporter gene markedly higher than the control plasmid pGL4; the reached levels of luminescence, however, were about six times lower than that from P1 under the same conditions. This may suggest that the P2 is a weaker promoter than P1. Nonetheless, it is important to note that the fragment may not have contained all functionally

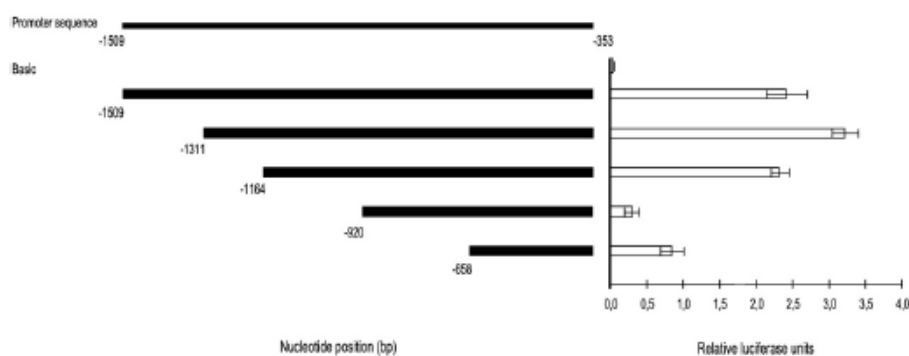


Fig. 4. Deletion analysis of the 5' flanking region of the GBA gene. The RLU (relative luciferase activity) of each deletion construct is plotted as fold increases over that of the pGL4 vector. The results are represented as the mean  $\pm$  S.D. of three separately transfected wells in one experiment. The pGL4 basic vector was used as a negative control and exhibited no luciferase activity.

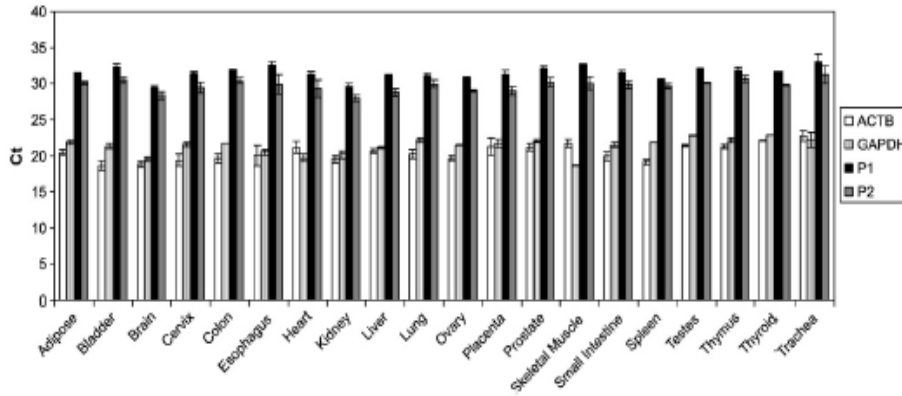


Fig. 5. Cycle threshold values of P1, P2, GAPDH and ACTB in different tissues. The expression levels of P1, P2, GAPDH and ACTB in 20 different tissue samples were evaluated using qRT-PCR. Ct values in P1 are in the range of 29.4 – 32.9 and in P2 27.9 – 30.6. Error bars represent standard deviation ( $n=2$ ).

important elements of the promoter, including distant enhancers as well as all regulatory sequences downstream of the initiation site. We used fragments of similar size, which did not contain a larger part of the downstream exons in both P1 and P2 constructs. For these reasons, reporter gene expression from P1 and P2 constructs may not be proportional to the strength of the native promoters.

Analysis of 5' RACE products has shown that transcripts originate at three initiation sites (347, 380, and 413 bp upstream of the +1 ATG). We have confirmed by quantitative RT-PCR that the above sites are the major transcription initiation sites of P2. The weak RT-PCR products originating upstream of these sites in the 5' region may represent promoter upstream transcripts (PROMPTs) [16].

Sardiello and co-workers [17] have recently found that most lysosomal genes exhibit coordinated transcriptional behavior and are regulated by the transcription factor EB (TFEB). They identified a 10-bp motif named CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation), which is enriched in promoters of lysosomal genes. P1 promoter of GBA contains two such elements and overexpression of TFEB led to approximately 3 times higher expression of GBA. We have found two elements compatible with the CLEAR consensus sequence in P2, located –417 and –891 bp from TSS found by 5' RACE (347 bp upstream of the +1 ATG) (Supplementary data). While CLEAR elements are usually found within 200 bp of the transcription start site (TSS), more distal CLEAR elements were found in promoters upregulated by TFEB.

Multiple Sp-1 binding sites, an unmethylated CpG island, and the absence of a TATA box are features that the P2 has in common with the majority of housekeeping promoters. The P1 does not share these properties, and the presence of the TATA box may suggest that P1 is a regulated promoter [4,5]. However, the results from the quantitative RT-PCR in RNA from normal adult human tissues did not show significant differences in expression stability between the both promoters. Moreover, the expression stability of P1 and P2 appears to be higher than commonly used reference housekeeping genes GAPDH and ACTB. Earlier studies showed that levels of glucocer-

ebrosidase mRNA differ between cell lines of different origin, suggesting that glucocerebrosidase expression may at least partially be regulated. While the mRNA levels differed between cell lines, they did not always correlate with enzyme activity, suggesting that other mechanisms are also important in regulation of glucocerebrosidase activity [4]. These results are not directly comparable with our observations, because we have measured the amount of glucocerebrosidase transcripts in total RNA extracted from normal human tissues which contain a mixture of cells of different origin. Importantly, the lines employed in the above studies included also immortal cancerous cell lines that may not faithfully reflect properties of the underlying cell type.

Transcripts from both promoters were detected in all studied tissues. While we did not measure the absolute levels of transcripts from each promoter, the ratio between P1 and P2 expressions appeared to be similar among tissues.

Although we did not find significant differences in expression from both promoters, steady-state levels of mRNA in normal adult tissues do not exclude that one or both glucocerebrosidase promoters may be differentially regulated under certain conditions including Gaucher disease.

We hypothesized that differences in the manifestation of Gaucher disease in patients with the same genotype may be caused by variable expression of mutant glucocerebrosidase due to variants in the 5' flanking sequences and the promoters. However, in the group of patients homozygous for the common mild mutation N370S with discordant phenotypes we found only one known polymorphism (rs10908459) in heterozygosity in one case. It remains to be elucidated what role the P2 promoter plays in the regulation of glucocerebrosidase and possibly also in the pathogenesis of Gaucher disease.

#### Acknowledgments

The study was supported by a grant from Grant Agency of Charles University (GA UK 121407). O.L. and M.J. were supported by IKEM MZ0 00023001, the project also received institutional support from VZ MŠM ČR 0021620806.

#### Appendix A. Supplementary Data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.bcmd.2010.12.011.

Table 3  
Expression stability coefficients of P1, P2, GAPDH and ACTB.

Gene	GeNorm	NormFinder
P1	0.923	0.376
P2	0.900	0.397
GAPDH	1.141	0.631
ACTB	1.290	0.740

## References

- [1] E. Beutler, G.A. Grabowski, Gaucher disease, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, D. Valle, W.S. Sly (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 3635–3668.
- [2] M. Horowitz, S. Wilder, Z. Horowitz, et al., The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution, *Genomics* 4 (1989) 87–96.
- [3] S.L. Winfield, N. Tajebi, B.M. Marín, E.I. Ginns, E. Sidransky, Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: implications for Gaucher disease, *Genome Res.* 7 (1997) 1020–1026.
- [4] R.F. Doll, F.J. Smith, Regulation of expression of the gene encoding human acid beta-glucosidase in different cell types, *Gene* 127 (1993) 255–260.
- [5] R.F. Doll, A. Bruce, F.J. Smith, Regulation of the human acid beta-glucosidase promoter in multiple cell types, *Biochim. Biophys. Acta* 1261 (1995) 57–67.
- [6] W.S. Dynan, S. Sazer, R. Tjian, R.T. Schimke, Transcription factor Sp1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter, *Nature* 319 (1986) 246–248.
- [7] Y.N. Blech-Hermoni, S.G. Ziegler, K.S. Hruska, et al., In silico and functional studies of the regulation of the glucocerebrosidase gene, *Mol. Genet. Metab.* 99 (2010) 275–282.
- [8] S. Tsuji, B.M. Marín, J.A. Barranger, et al., Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2349–2352.
- [9] A.R. Shenoy, S.S. Visweswariah, Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA, *Anal. Biochem.* 319 (2003) 335–336.
- [10] M. Fromont-Racine, E. Bertrand, R. Pictet, T. Grange, A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 1683–1684.
- [11] RESEARCH0034, J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (2002).
- [12] C.L. Andersen, J.L. Jensen, 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.* 64 (2004) 5245–5250.
- [13] S.J. Clark, J. Harrison, C.L. Paul, M. Prommer, High sensitivity mapping of methylated cytosines, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 2990–2997.
- [14] K. Gartharius, K. Frech, K. Grote, et al., MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites, *Bioinformatics* 21 (2005) 2933–2942.
- [15] J. Goecks, A. Nekrutenko, J. Taylor, Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences, *Genome Biol.* 11 R86.
- [16] P. Preker, J. Nielsen, S. Kammler, et al., RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters, *Science* 322 (2008) 1851–1854.
- [17] M. Sardiello, M. Palmieri, A. di Ronza, et al., A gene network regulating lysosomal biogenesis and function, *Science* 325 (2009) 473–477.

## Supplementary data

```

-1518 -1508 -1498 -1488 -1478 -1468 -1458 -1448 -1438 -1428
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
human TTTCAGTGAGCACCCCAATCCCATCGCAGTCATTCTATCACATAGCCATGTTTTTTTGTGTTGTTTCATTTTGTCTTTTTTGAGACAGGGTCTT
chimp .....G...T.....
gorilla .....
orangutan .....C.....T.....G.....T.....
marmoset .....
tarsier CC.....A.....G.....C.T...G.....A.G...C.....
bushbaby .CC..A..AT...C.C.A...C.....GG.T.GAG...A.C.A.AA..A...G.....

                               Sp1
-1418 -1408 -1398 -1388 -1378 -1368 -1358 -1348 -1338 -1328
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
human GCTTGTGTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATTGGGCTCACGCAACCTCCCTGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTA
chimp ...C.C.C.....C.....A.....T.....C.....G.....T.....
gorilla .....
orangutan .....C.....A.....
marmoset .....
tarsier .....
bushbaby .....C.....G.GC..G..A...A..TA.A...A..GT

                               GATA-1 CLEAR
-1318 -1308 -1298 -1288 -1278 -1268 -1258 -1248 -1238 -1228
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
human GCTGGGATTACAGGCGCCGCTCCCATGCCGCCAGCTAAATTTGTATTTTAGAGAGATAGGGTTTCACCATGTTGCCAGGCGGGTCTCAAACCTC
chimp .....T.T.T.....A.....TG.....G.....C..T.....CG.....TG.....G.....
gorilla .....C.....C.....C.....
orangutan .....C.....T.....A.....
marmoset .....
tarsier .....
bushbaby .GC...T.CGA.....GC..G.G..C..C.G.....C.AC.AT...C.G..A..AAA.....A...C..G.AA.

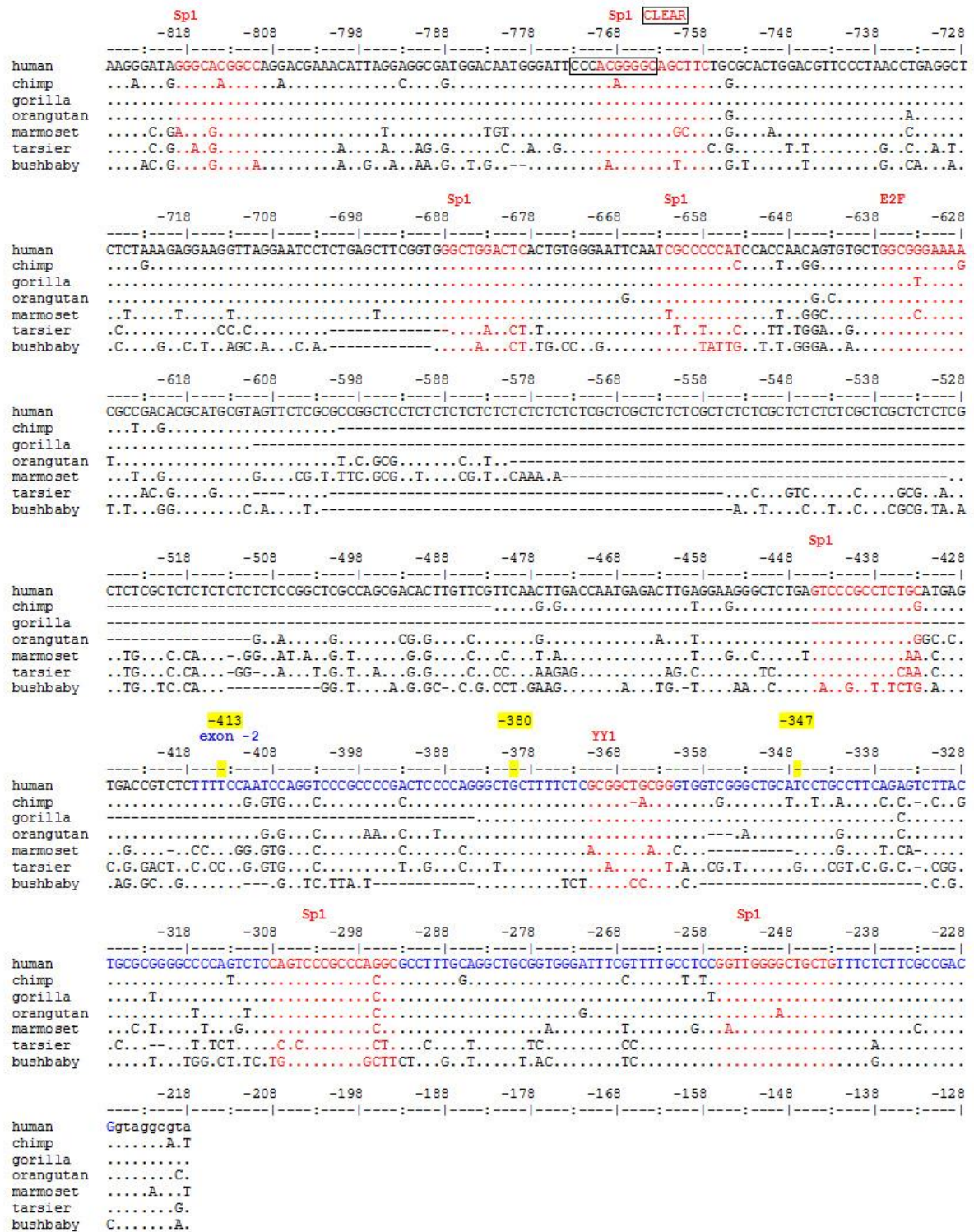
CREB AP-1 Sp1
-1218 -1208 -1198 -1188 -1178 -1168 -1158 -1148 -1138 -1128
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
human CTGACCTCAAGTAATCCGCCTGCCCTCGGTCTCCCAAAGTCTGGGATTACAGGTGACTCAACCGCGCTGGCCACATACCCATGGTTTCAGCATGTATC
chimp .....G...A.....A.C.....C.A.T...AT.....C...GC...T..T..C.....G.....T...A.....
gorilla .....
orangutan .....T.....G.....G.....C..G.....
marmoset .....
tarsier .....G...CT...
bushbaby T..GAGG..G.AG.CT...T...CA..AG..GG.GGT...T.....CA...TG.....A...ACTC.....G..GGAT...T..AGG.

GATA-1 GATA-1
-1118 -1108 -1098 -1088 -1078 -1068 -1058 -1048 -1038 -1028
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
human ACTATCTAAAATTATATTTTGTATTATATCTGTGTGCTCCCATAGAATGTTAAGTCCCAAGATCAGAACTTGCTCATGCACTGGGTCTACACT
chimp .....CG.T.....TG.....A.....GG.....C.....A.....
gorilla .....
orangutan .....T.....T.....T.....
marmoset .....
tarsier .....T.....C..G.....T.....GC.A..C.....G..GG.....G.....A.....A.....A.....
bushbaby T.C.....G.C..CA.....A.....

                               Sp1
-1018 -1008 -998 -988 -978 -968 -958 -948 -938 -928
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
human CAGTAGGTCCTCAACAAACATTCGTTAAGATACTAAAGTGGCAGGGTGGGGCCCTGTAAACAGCTCAGGACCCCTGTGCTTGTAGGGGCAACGTGGTGCC
chimp .....GCT.....C.....C.....A.....T.....T.....A.A.....
gorilla .....
orangutan .....A.....A.T.....T.....A.....A..
marmoset .....
tarsier .....T.....C.....C.C.....TG.A.....T..G..T.....C.A..CG.....T.....
bushbaby .....A..A...T.C..C.A..T.....ACA.....TA...T.....A.A..GGCA.....A..

                               Sp1 CRE-BP1 Sp1
-918 -908 -898 -888 -878 -868 -858 -848 -838 -828
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
human CTCCAAGGAAGACAGGGAGGTGGGAGGAGCACTGCCCGAGATGGCGTCAGGCTGCAAGACTTCTTGAATAATTCAGCATCATAACACCCAGCCTCAGG
chimp .....AT.C.....A.....C...G.....
gorilla .....A.....C.....A.....
orangutan .....A.....A.....A.....C..G.....
marmoset .....C.....A..A.....G.....G.C.....C.....A.....
tarsier T..T.G...GG...G..A...G.....T.....C...G.....C.....T.....GG..
bushbaby .....A...A...AG...A.....G.....C.....C.....T...A

```



### The multiple sequence alignment of the 5' regulatory sequence.

Multiple sequence alignment of the 5' regulatory sequence includes the P2 and exon -2. Bases identical with the reference human sequence are represented by dots, while positions which are not occupied are described by hyphens. Consensus sequences for Sp1 and GATA-1, AP-1, YY1, CREB, CRE-BP, E2F binding sites conserved among the species are depicted in bold red letters. The transcription initiation sites (-347, -380, -413) identified by 5'RACE are shown in yellow.

## 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.

## 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<sub>2</sub> in 1 millimolar final concentration to postnuclear supernatant improves their separation from lysosomes in Percoll gradients (Arai et al., 1991).

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.

*Folia Biologica* (Praha) 59, 41-46 (2013)

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 cm<sup>2</sup> flasks were washed twice by PBS, collected by scraping, washed once in isotonic TEA buffer (10 mmol/l triethanolamine, 1 mmol/l EDTA Na<sub>2</sub>, 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 Na<sub>2</sub>) 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*<sub>max</sub> 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*<sub>max</sub> 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 (Schimadzu, 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 MgCl<sub>2</sub>, 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%



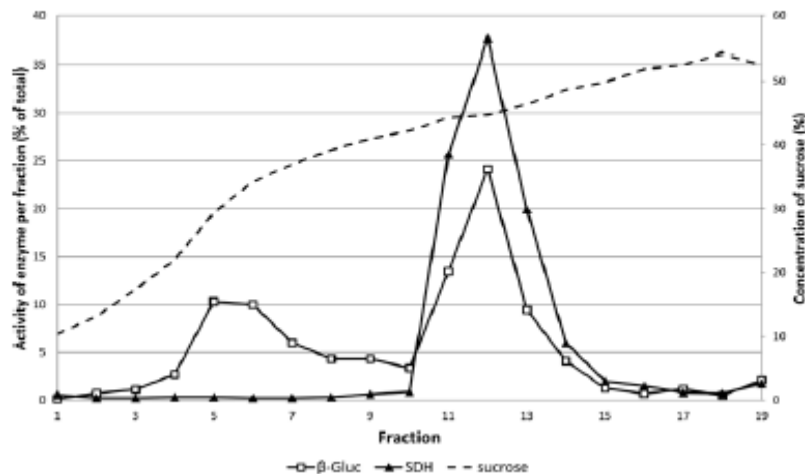


Fig. 1. Resolution of LM fraction from HeLa cells on the linear sucrose gradient

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 ( $\beta$ -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

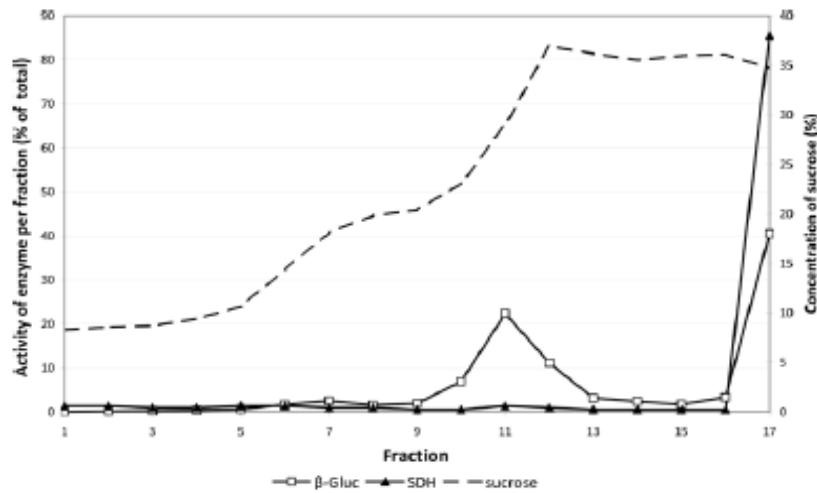


Fig. 2. Resolution of LM fraction from HeLa cells on the step sucrose gradient

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 ( $\beta$ -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).

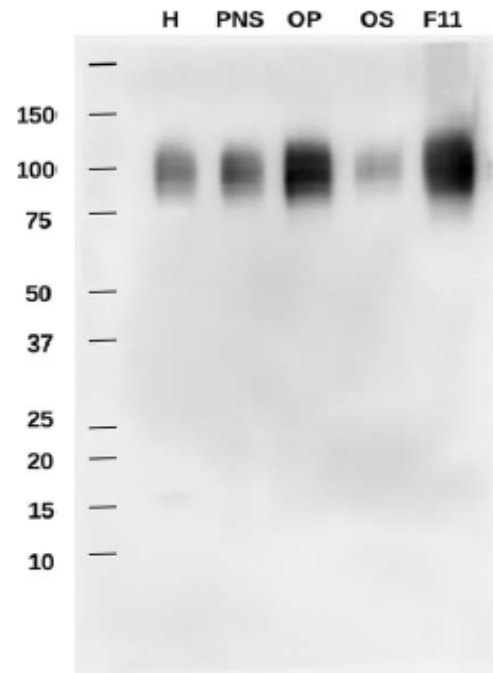


Fig. 3. Western blotting of subcellular fractions with anti-LAMP1 antibody

Ten  $\mu$ 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
Postorganelle 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).

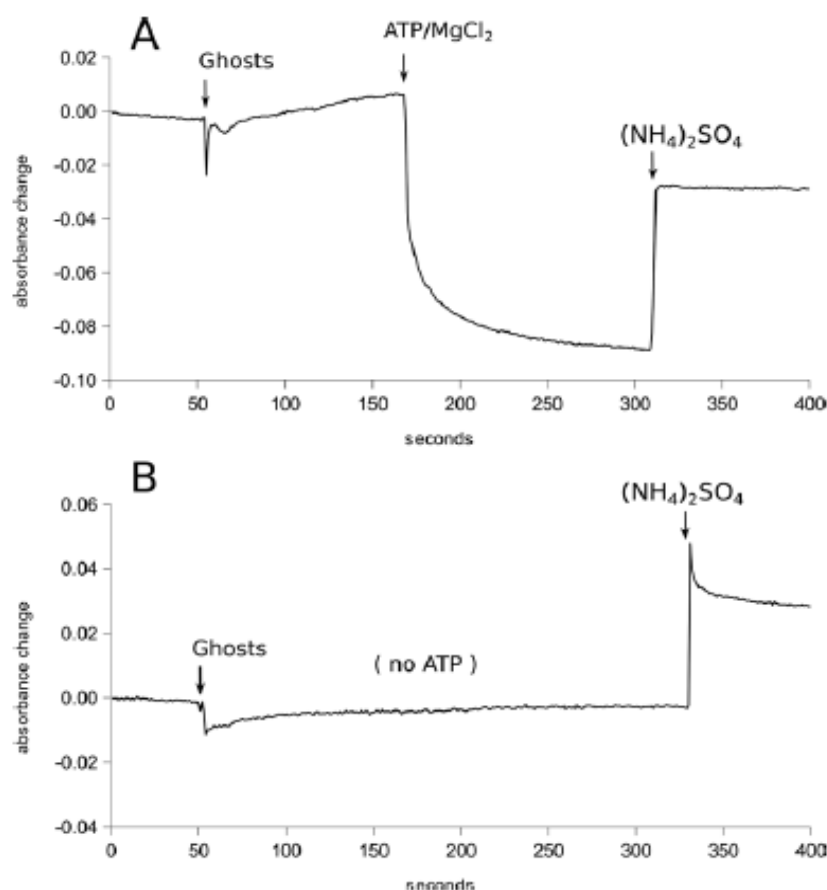


Fig. 4. Acidification of lysosomal ghosts after the addition of ATP

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  $\mu$ mol/l acridine orange (Sigma-Aldrich). Lysosomal ghosts (10  $\mu$ g of protein) were added (Ghosts) and the following reagents were added at the time points depicted by arrows: ATP and MgCl<sub>2</sub> (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 Diettrich 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.
- Diettrich, 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  $\beta$ -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:  $\alpha$ -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.

## 9.5 Martins et al., Ann Neurol. – v recenzním řízení

### Neuroinflammation, Mitochondrial Defects and Neurodegeneration in MPS IIIC Mouse

Carla Martins, M.Sc.<sup>1</sup>, Helena Hůlková, M.D.<sup>2</sup>, Larbi Dridi, Ph.D.<sup>1</sup>, Lubov Grigoryeva, B.Sc.<sup>1</sup>, Yoo Choi, B.Sc.<sup>1</sup>, Virginie Dormoy-Raclet, Ph.D.<sup>1</sup>, Alexander Langford-Smith, Ph.D.<sup>3</sup>, Fiona L. Wilkinson, Ph.D.<sup>3</sup>, Kazuhiro Ohmi, Ph.D.<sup>4</sup>, Graziella DiCristo, Ph.D.<sup>1</sup>; Edith Hamel, Ph.D.<sup>5</sup>, Jérôme Ausseil, Ph.D.<sup>6</sup>, David Cheillan, M.D.<sup>7</sup>, Alain Moreau, Ph.D.<sup>1</sup>, Eva Svobodová, Ph.D.<sup>2</sup>, Zuzana Hájková, Ph.D.<sup>8</sup>, Markéta Tesařová, Ph.D.<sup>8</sup>, Hana Hansíková, Ph.D.<sup>8</sup>, Brian W. Bigger, Ph.D.<sup>3</sup>, Martin Hřebíček, M.D.<sup>2</sup> and Alexey V. Pshezhetsky, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CHU Ste-Justine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada; <sup>2</sup>Institute of Inherited Metabolic Disorders, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Charles University, Prague, Czech Republic; <sup>3</sup>Stem Cell & Neurotherapies, University of Manchester, Manchester; <sup>4</sup>Centre de Biologie Humaine, Biochimie Spécialisée, <sup>4</sup>Department of Biological Chemistry, David Geffen School of Medicine, University of California Los Angeles, Los Angeles, California, United States of America, <sup>5</sup>Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, QC, Canada; <sup>6</sup>CHU Amiens, and Unité INSERM U1088, UFR de Médecine, Université de Picardie-Jules Verne, Amiens, France; <sup>7</sup>Service des Maladies Héritaires du Métabolisme et Dépistage Néonatal - Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France; <sup>8</sup>Department of Pediatrics, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine and General University Hospital in Prague, Charles University, Prague, Czech Republic.

Alexey V. Pshezhetsky

Service de génétique médicale, CHU Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (QC) H3T 1C5 – Canada

Tel. (514) 345-4931/2736, Fax. (514) 345-4766

E-Mail: [alexei.pchejetski@umontreal.ca](mailto:alexei.pchejetski@umontreal.ca)

Running head: **Pathophysiology of brain disease in MPS IIIC mouse**

## **Abstract**

**Objective:** Severe progressive neurological pediatric disease mucopolysaccharidosis IIIC (MPS IIIC) is caused by deficiency of acetyl-CoA:  $\alpha$ -glucosaminide N-acetyltransferase (Hgsnat), involved in lysosomal catabolism of heparan sulfate (HS). To understand the pathophysiology of MPS IIIC we generated a mouse model of the disease by germline inactivation of the Hgsnat gene.

**Results:** At 6-8 months mice showed hyperactivity, and reduced anxiety. Cognitive memory decline was detected at 10 months and at 12-13 months mice showed signs of unbalanced hesitant walk and urinary retention. Lysosomal accumulation of HS was observed in hepatocytes, splenic sinus endothelium, cerebral microglia, liver Kupffer cells, fibroblasts and pericytes. Starting from 5 months brain neurones showed enlarged, structurally disorganized and dysfunctional mitochondria, impaired mitochondrial energy metabolism, and storage of densely packed autofluorescent material, gangliosides, lysozyme, pTau, and beta amyloid.

**Interpretation:** Altogether, our data for the first time demonstrate that Hgsnat deficiency and lysosomal accumulation of HS in microglial cells followed by their activation and cytokine release result in mitochondrial dysfunction in the neurones causing their death explaining why MPS IIIC manifests primarily as a neurodegenerative disease.

## INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis III or Sanfilippo syndrome is a metabolic genetic disease caused by lysosomal accumulation of heparan sulfate (HS) (reviewed in<sup>1, 2</sup>) which includes four allelic subtypes caused by the genetic deficiencies of heparan N-sulfatase (MPS III type A; MIM #252900),  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase (MPS III type B; MIM #252920), heparan sulfate acetyl-CoA:  $\alpha$ -glucosaminide N-acetyltransferase or HGSNAT (MPS III type C; MIM #252930), and N-acetylglucosamine 6-sulfatase (MPS III type D; MIM #252940).

The majority of MPS IIIC patients have severe clinical manifestations with onset in early childhood. They rapidly develop progressive and severe neurological deterioration causing hyperactivity, sleep disorders, loss of speech, behavioral abnormalities, neuropsychiatric problems, mental retardation, hearing loss, visceral manifestations, such as mild hepatomegaly, mild dysostosis multiplex, mild coarse facies, and hypertrichosis<sup>3</sup>. Most patients die before adulthood but some survive to the fourth decade with progressive dementia and retinitis pigmentosa<sup>1, 2, 4</sup>. In the very rare MPS IIIC patients with the onset in adulthood the disease progression is similar in severity and time course<sup>5</sup>. The birth prevalence of MPS IIIC in Portugal and the Netherlands is 0.12 and 0.21 per 100,000, respectively<sup>6, 7</sup>.

HGSNAT transfers an acetyl group from cytoplasmic acetyl-CoA to terminal N-glucosamine residues of HS within the lysosomes<sup>8</sup>. To date, more than 80 *HGSNAT* mutations have been identified including 13 splice-site mutations, 11 insertions and deletions, 8 nonsense, and 18 missense mutations (reviewed in<sup>9</sup> [http://chromium.liacs.nl/LOVD2/home.php?select\\_db=HGSNAT](http://chromium.liacs.nl/LOVD2/home.php?select_db=HGSNAT)). Interestingly, all missense mutations detected to date result in misfolding of the enzyme<sup>10</sup>.

Important insights into the physiological mechanism of MPS III have been obtained from studying animal models of the disease. Spontaneous avian<sup>11</sup> and canine<sup>12, 13</sup> models of MPS IIIA and B and a caprine model of MPS IIID<sup>14</sup> have been described, but the majority of data has been obtained by studying a knockout mouse model of MPS IIIB<sup>15</sup> and a spontaneous mouse model of MPS IIIA<sup>16</sup>. Several mechanisms potentially underlying neurodegenerative process in MPS III were described. First, in both mouse models microglia cells are activated through interaction of their Toll-like receptor 4 (TLR4) with under-

degraded HS fragments, as are astrocytes and the entire immune system in the brain<sup>17-20</sup>. At the same time, inhibition of TLR4 signaling pathway in MPS IIIB mouse while delaying brain inflammation did not stop progression of the neurodegenerative process<sup>20</sup>. Second, storage of G<sub>M2</sub> ganglioside and G<sub>M3</sub> ganglioside detected in brain cerebral cortical and cerebellar neurons<sup>21, 22</sup> can cause neuronal apoptosis as was reported for Tay-Sachs and Sandhoff diseases<sup>23, 24</sup>. However, recently described double-mutant MPS IIIA and IIIB mice with a knockout GalNAc transferase crucial for the synthesis of G<sub>M2</sub> and G<sub>M3</sub> gangliosides have significantly reduced lifespan and increased neurodegeneration as compared to the corresponding single-mutant MPS IIIA and MPS IIIB mice, suggesting that G<sub>M2</sub>/G<sub>M3</sub> ganglioside accumulation is not a primary cause of neuronal loss in MPS III<sup>25</sup>. Third, neurodegeneration could be caused by aggregates of missfolded proteins<sup>14, 26, 27</sup> accumulated in memory neurons in critical areas (such as medial entorhinal cortex and the dentate gyrus) as a result of impaired autophagy and/or increased extralysosomal level of HS proteoglycans, glypicans<sup>28</sup>. Fourth, stored HS fragments, which are in excess and abnormally sulfated in MPS IIIA and IIIB<sup>29</sup> can cause adverse signaling reactions in brain neurons inducing, in particular, overexpression of GM130 protein and subsequent alterations of the Golgi ribbon architecture<sup>30</sup>, enhanced proliferation and outgrowth of neurites<sup>31</sup> as well as alteration of neural cell migration (Bruyere 2013, submitted) all potentially contributing to neuropathology.

However it still remains to be determined which of the above mechanisms are important for the development of neuronal dysfunction and therefore should be the target for the pharmaceutical intervention along with finding the ways to restore deficient HGSNAT activity in the patients' cells. It is also not understood whether the pathophysiological mechanism in all 4 subtypes of MPS III is the same despite different genetic and biochemical defects and severity of the clinical manifestation.

In the current work we report the generation of the first animal model of the MPS IIIC by inactivation of the Hgsnat gene in mice and present new pathological and mechanistic insights explaining the brain disease progression by the neuronal loss associated with mitochondrial dysfunction.



## SUBJECTS/MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Generation of C57Bl6 mice with targeted disruption of *Hgsnat* gene has been performed at TIGM as previously described<sup>32, 33</sup>. The heterozygous mice were crossed to C57BL/6NCrl strain distributed by Charles River Quebec or bred to each other and the litter genotyped by PCR as described below. The *Hgsnat-Geo* mice were compared with the appropriate age and sex-matching WT controls. All mice were bred and maintained at the Canadian Council on Animal Care (CCAC)-accredited animal facilities of the CHU Ste-Justine Research Center according to the CCAC guidelines. Mice were housed in an enriched environment with continuous access to food and water, under constant temperature and humidity, on a 12 h light/dark cycle. Approval for the animal experimentation was granted by the Animal Care and Use Committee of the CHU Ste-Justine.

**Genotyping of mice.** The genotypes of mice were determined using genomic DNA extracted from the clipped tail tip. The PCR was performed in a total volume of 50  $\mu$ l containing 100 pmol of each primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 U taq polymerase (Invitrogen) and 100 ng genomic DNA in 20 mM Tris (pH 7.4), 50 mM KCl, and 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Multiplex primers for detection of *Hgsnat* allele were 5'-AGG CTC CAC ACG TGG TAA GT (*Hgsnat*-F) and 5'-CTT ATC TCC ACG CGT CAA TG (*Hgsnat*-R), and for the detection of *Hgsnat-Geo* allele, 5'-CCA ATA AAC CCT CTT GCA GTT GC (*Geo*) and *Hgsnat*-R. A 463 and 297 bp fragments were amplified separately in WT and *Hgsnat-Geo* homozygous mice, respectively, and both fragments were amplified in mice heterozygous for the *Hgsnat-Geo* allele.

**Quantitative RT-PCR.** Total RNA was isolated from cultured cells or mouse tissues using the Trizol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol and reverse-transcribed to cDNA using random primers and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). Quantification of mouse *Hgsnat* mRNA was performed using a Stratagene Mx3000P QPCR System and the following set of primers: 5'-AGC AGA GCA GAC CCT CTC AG-3' (E7-F) and 5'-ACA AAC CAT GGG AAG ACG AG-3' (E10-R). Quantification of cytokines in mouse brain tissues was performed with the following sets of primers: 5'-TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG-3' (TNF $\alpha$ -F), 5'-CAC TTG GTG GTT TGC TAC GA-3' (TNF $\alpha$ -R), 5'-GCC CTT GCT GTT CTT CTC TG-3' (MIP1 $\alpha$ -F), 5'-CAG ATC TGC CGG TTT CTC TT-3' (MIP1 $\alpha$ -R), 5'-TGA AAT GCC ACC TTT TGA CA-3' (IL- $\beta$ -F), 5'-GTA GCT GCC ACA GCT TCT CC-3' (IL- $\beta$ -R), 5'-GTC AGA CAT TCG GGA AGC AG-3'

(TGF1- $\beta$ -F), 5'-CTG CCG TAC AAC TCC AGT GA-3' (TGF1- $\beta$ -R). RLP32 mRNA was used as a reference control.

**Neurological examination of mice.** The motor performance of mice was evaluated using a simplified neurological examination as previously described<sup>34</sup>. The evaluation was composed of the following tests: gait, posture/forelimb, posture/hind limb, posture/trunk, posture/tail, avoidance response, rolling over, body righting acting on head, parachute reflex, inverted and vertical wire netting as well as 1 min exploratory activity in a clean cage.

**Rotating rod.** The rotating rod motor coordination test was performed using an accelerating 5-line Rotarod treadmill for mice (3 cm in diameter). Animals were briefly trained at 4 rpm and tested using an accelerating mode (from 4 to 40 rpm over 5 min). Three trials separated by 20 min rest intervals were performed on 3 consecutive days.

**Open Field Test.** The test was performed by individually placing 2, 4, 6, 8, 10 MO *Hgsnat-Geo*, or WT mice into the center of an arena (40 cm length x 40 cm width x 50 cm height, white Plexiglas). Mouse behavior was recorded for one hour and analyzed using Top Scan software version 2.0 (Clever Sys. Inc., Reston, VA, USA). The path length, rapid exploratory behavior (speed >100 mm/s), immobility (speed <0.05 mm/s) as well as frequency, path length, duration and speed in the central (25%) area of the cage were analyzed. OFT was performed one hour into the mouse light cycle<sup>35, 36</sup>. A 30 min room adjustment period was implemented prior to the start of each test. All experiments were performed by the same investigator (LG).

The 4, 5, 8 and 10 MO mice were subjected to the Morris Water Maze test for spatial learning essentially as described<sup>37</sup>. During a 3-day habituation period mice were required to swim (60 s) to a visible platform located in a selected quadrant of a circular (1.4 m in diameter) tank filled with water made opaque with inert paint (25 $\pm$ 1°C). Then, visual wall cues were switched, the platform was moved to a different quadrant and submerged (1 cm), and a 5 days of hidden-platform testing ensued. Next day following hidden-platform testing, all mice were given a probe trial (60 s) in which the percentages of time spent and distance traveled in the target quadrant (no longer containing a platform), as well as the number of crossings over the previous location of the hidden platform were recorded, along with swimming speed. In the hidden platform testing, mice were given 5 trials of 90 s to find the platform (maximum inter-trial interval of 45 min). On days 1 and 4, mice that could not find the platform in the allotted time were guided to and allowed to stay on it for 5 s. Visual acuity and motivation were tested

during the habituation period. Escape latencies were acquired with the 2020 Plus tracking system and Water 2020 software (Ganz FC62D video camera; HVS Image, UK). All experiments were started at the same time every day and performed by the same investigator (CM).

**Analysis of glycosaminoglycans and gangliosides in mouse tissues.** Total GAG and lipids were extracted from brain and liver tissues as previously described<sup>20</sup>. Briefly, frozen tissues were homogenized in water (10% v/w). Lipids were extracted by addition of 2 volumes of methanol and 1 volume of chloroform to 1 volume of the homogenate. After 10 min centrifugation at 1000 g the organic phase was collected, evaporated and used for the gangliosides analysis. The pellet was re-suspended in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5, containing 5 mM cysteine, 5 mM EDTA and 1 mg/ml of papain, digested overnight at 65°C and cleared by centrifugation at 2500 g for 15 min. For the analysis of total GAG, 100 µl of the supernatant was added to 2.5 ml of dimethylmethylene blue reagent<sup>38</sup> and the absorbance at 535 nm was measured. GAG concentration (µg per mg of dried pellet) was calculated using purified HS standard.

Sphingolipids were extracted from the lipid fraction in the presence of deuterium-labeled standards (N-stearoyl (D<sup>3</sup>)-monosialoganglioside G<sub>M2</sub> and N-stearoyl (D<sup>3</sup>)-monosialoganglioside G<sub>M3</sub>, Matreya LLC, USA) by saponification<sup>39</sup> and then fractionated and desalted using reverse-phase Bond Elut C18 columns. Samples were analyzed by direct flowinjection at a rate of 200 µl/min on a triple-quadrupole mass spectrometer (API 3200 MS/MS; Sciex Applied Biosystems, Toronto, Canada) in the negative ionization mode using the multiple reactions monitoring (MRM) method. G<sub>M2</sub> and G<sub>M3</sub> species were measured separately. The concentrations of individual molecular species were calculated by comparing with the corresponding internal standards. Total G<sub>M2</sub> and G<sub>M3</sub> concentrations (pmol per mg of dried pellet) were calculated as sums of the concentrations of all molecular species.

**Lysosomal enzyme assays.** N-acetyltransferase, β-galactosidase, α-galactosidase and β-hexosaminidase activities in cellular and tissue homogenates were assayed using the corresponding fluorogenic 4-methylumbelliferyl glycoside substrates as previously described<sup>40</sup>. Protein concentration was measured using a Bio-Rad Bradford kit.

**Analysis of LC3 in the mouse brain tissues by Western blot.** Total brains were homogenized in five volumes of 250 mM sucrose buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4,

1 mM EDTA and protease inhibitor cocktail using a Dounce homogenizer. Nuclei were cleared by centrifugation at 500 g for 10 min at 4°C. Supernatants were mixed with an equal volume of sucrose buffer containing 1% Triton X-100 and incubated for one hour at 4°C. Resulting lysates were centrifuged for 15 min at 13,000 g and supernatants separated by SDS-PAGE on 15% gels. Western blot analyses were performed according to standard protocols using anti-LC3 (Sigma, 1:2,000) and 12G10 anti- $\alpha$ -tubulin antibody (DSHB, 1:15,000). Equal protein loading was assured by Ponceau S staining. Signals were quantified using ImageQuant software.

**Tissue processing for morphological studies.** To prepare tissues for morphological studies, animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and perfused via intracardiac catheter with phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in PBS. Brains and visceral organs (liver, spleen, heart, lungs, kidney and urinary bladder) were removed and immersed in 4% paraformaldehyde in PBS overnight. Tissues for light microscopy were trimmed, dehydrated with an ethanol series followed by acetone, acetone-xylene mixture and xylene and then embedded in paraffin. Tissues for fluorescent confocal microscopy were treated sequentially in 10%, 20% and 30% sucrose in PBS overnight at 4°C and embedded in OCT compound before freezing at -80°C. Tissues for electron microscopy were trimmed into small cubes, post-fixed with 1% osmium tetroxide, dehydrated with an ethanol series and propylene oxide and embedded in Durcupan-Epon mixture.

**Histopathology and immunohistochemistry.** Four  $\mu$ m-thick sections of paraffin-embedded tissues were deparaffinized in xylene and rehydrated with isopropylalcohol, and then 96%, 70%, and 60% ethanol. The sections were stained with either hematoxylin and eosin (H&E), or periodic acid-Shiff technique (PAS), and a set of primary antibodies. In the latter case the sections were treated with 1% NaN<sub>3</sub> and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min to inactivate endogenous peroxidase, blocked with 5% bovine fetal serum in PBS for 30 min (both at room temperature), and incubated with primary antibodies diluted in 5% bovine serum albumin in PBS overnight at 4°C.

The following primary antibodies were used: rabbit monoclonal anti-Cathepsin D (clone EPR3057Y, Lifespan Bioscience, USA), mouse monoclonal IgM anti-O-GlcNAc (CTD110.6, kind gift of Dr. Gary Hart) rat monoclonal anti-mouse macrophages (clone BM8, Lifespan Bioscience), rabbit polyclonal anti-SCMAS<sup>41</sup>, rabbit polyclonal anti-GFAP, (Novus Biologicals, NB300-141; dilution 1/1000) rabbit polyclonal anti-LC3 (Novus Biologicals,

NB100-2331; dilution: 1/1000). Detection of primary antibodies was performed using Dako EnVision + System-HRP Rabbit kit (Dako) or Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins/HRP (Dako), both with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as a substrate.

The sections were viewed and photographed using a Nikon epifluorescent light microscope (E800) equipped with Olympus digital camera (DP70). Autofluorescence was analyzed in unlabeled sections using fluorescence filter BV-2A (Ex 400-440 nm/DM 455/BA 470).

**Fluorescent confocal microscopy.** Forty  $\mu\text{m}$ -thick sagittal sections were cut from OTC-embedded frozen brains using CM3050 S Microtome (Leica). The sections were treated with 1% Triton X-100, blocked with 10% goat serum in PBS and incubated overnight at 4°C with primary antibodies in 2% goat serum in PBS. The following antibodies were used: mouse anti-HS (10E4 epitope, USBiological, 1:100), rat anti-mouse LAMP-1 (DHSB 1D4B-s, 1:100); mouse anti-mouse NeuN (Millipore MAB377, 1:400); rabbit anti-mouse NeuN (Millipore MABN140, 1:200) rat anti-mouse LAMP2 (DHSB ABL-93-s, 1:100) rabbit anti-mouse GFAP (Abcam, 1:100); mouse humanized anti-G<sub>M2</sub> (KM966, 1:400); mouse anti-G<sub>M3</sub> (Cosmo Bio M2590, 1:50); [PubMed](#) isolectin GS-IB4 568 conjugate, (Invitrogen, 1:20). The slides were further counter-stained with Alexa fluoro 555-conjugated Goat anti-mouse IgG, Alexa fluoro 488, 555 and 647-conjugated Goat anti-rat IgG (all Life Technologies) and DyLight 488-conjugated Affinipure Goat anti-human IgG (Jackson immunoresearch laboratories). The slides were mounted with Vectashield mounting medium and analyzed using a LSM510 Meta Laser inverted confocal microscope (Zeiss). Images were processed and quantified using the LSM image browser software (Zeiss) and Photoshop (Adobe).

**Electron microscopy.** Semi-thin sections were cut and stained with toluidin blue and viewed by light microscopy. The regions of interest for electron microscopy were selected and ultrathin sections were cut and mounted on 200 mesh coppergrids. Sections were double contrasted with uranyl acetate and lead nitrate and then analyzed using a transmission electron microscope (JEOL 1200 EX).

**Analyses of mitochondrial energy metabolism in mouse brain.** Frozen brain tissues were homogenized at 4°C in 20 volumes of 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, containing 150 mM KCl, 2 mM EDTA and 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of aprotinin. Mitochondria were isolated from the homogenate by differential centrifugation as described<sup>42</sup>. The activities of the mitochondrial enzymes, NADH: ubiquinone oxidoreductase (NQR, complex I), succinate:CoQ reductase

(SQR, complex II), ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (QCCR, complex III), cytochrome c oxidase (COX, complex IV), NADH:cytochrome c reductase (NCCR, complex I+III), succinate:cytochrome c reductase (SCCR, complex II+III) and citrate synthase (CS) were measured as described<sup>43, 44</sup>. Pyruvate dehydrogenase activity was determined as described<sup>45</sup>. Protein concentration was measured according to Lowry<sup>46</sup>.

Total content of coenzyme Q10 in brain homogenate was determined as described<sup>47</sup> with minor modifications. 100  $\mu$ l of brain homogenate was diluted with 100  $\mu$ l of MilliQ H<sub>2</sub>O. Mixture was supplemented with 50  $\mu$ l of a 1,4-benzoquinone solution (2 mg/ml) and vortexed for 10 s. After 10 min 1 ml of n-propanol was added. The mixture was vortexed for 10 s and centrifuged at 10,000 rpm for 2 min. 50  $\mu$ l of the supernatant was analyzed by HPLC using the Supelcosil LC 18 column (Supelco) eluted by ethanol/methanol (70/30 v/v) mixture at a flow rate of 1 ml/min. UV detection was performed at 275 nm. Results were expressed as pmol of Q10 per mg of total protein.

**Quantitative analysis of affected neurons in mouse brain.** The cerebral cortex of mice from each group was subdivided into superficial and deep regions. Adjacent superficial and deep areas stained with anti-NeuN antibodies were photographed for manual counting of neurons by a non-biased observer blinded for the genotype of mice. Three superficial sections for somatosensory cortex were analyzed for each mouse and 3 mice were studied for each genotype and age.

**Statistical analysis.** Statistical analysis has been performed using two-tailed unpaired t-test (Fig. 1, 5C, 7A, 8B), two-tailed paired t-test (Fig. 6A, S2, S9), linear regression (Fig. 7C) and two-way repeated measures ANOVA (Fig. 2B and C, 3A, 5A, 8A) using Prism GraphPad software or STATISTICA version 10.0 software (StatSoft, Prague, CZ). P-value of 0.05 or less was considered significant. Bonferroni post-hoc test was used to compare specific means, if significance was determined by ANOVA tests.

## RESULTS

### ***1. Mice homozygous for Hgsnat-Geo allele show deficient HGSNAT mRNA and activity in tissues.***

A functional knockout of the *Hgsnat* locus in C57Bl/6 mice was generated using gene trap technology as previously described<sup>32, 33</sup>. A selectable marker  $\beta$ -geo, a functional fusion between the  $\beta$ -galactosidase and neomycin resistance genes, was inserted into the intron 7 of

the *Hgsnat* gene leading to splicing of exon 7 into the  $\beta$ -geo cassette to generate a non-functional *Hgsnat* fusion transcript (Fig. 1A).

Mice homozygous for *Hgsnat-Geo* allele (*Hgsnat-Geo* mice) were viable and born in the frequency expected from Mendelian inheritance (26 of the first 100) indicating that disruption of the *Hgsnat* gene does not cause embryonic lethality. Mice show normal growth, are fertile and behaviorally indistinguishable from WT or heterozygous animals until the age of 5-6 months.

Both expression of *Hgsnat* mRNA measured by RT-q-PCR (Fig. 1B) and the level of HGSNAT activity measured with fluorogenic substrate Muf- $\beta$ -D-glucosaminide (Fig. 1C) in tissues and primary cultures of skin fibroblasts from the homozygous animals were reduced to 1.5-0.6% of that in WT mice (below or close to detection limit of the method) confirming efficiency of the splicing outcome and validating the model biochemically. In the heterozygous mouse tissues *Hgsnat* activity was reduced to ~50% of WT (Fig. 1C).

In contrast, activities of other lysosomal enzymes measured in the tissues of homozygous *Hgsnat-Geo* mice were either similar or higher than those in WT mice and progressively increased with age of the animals suggesting augmented production of lysosomes previously described for the mouse models of other subtypes of MPS III and linked to lysosomal storage phenotype<sup>15, 16</sup>. In the *Hgsnat-Geo* mice the highest increase was observed in liver tissues where  $\alpha$ -galactosidase activity was induced ~5 fold and  $\beta$ -hexosaminidase activity, ~20 fold by the age of 6 months (Fig. 1D).  $\beta$ -Hexosaminidase activity was also increased 2-3 fold in the brain, lungs and kidney suggesting that lysosomal storage occurs also in these tissues.

## ***2. Hgsnat-Geo mice show reduced longevity, progressive behavioral changes and learning impairment.***

No visible signs of illness were observed in the homozygous *Hgsnat-Geo* mice until the age of 11-12 months, when they showed weight loss, loss of fur, and hesitant tremor-like walk. About 30% of animals at this age showed spasticity of hind limbs and loss of coordination in a balance test (supplemental video 1). At ~65 weeks of age mice presented signs of urinary retention resulting in abdominal distension (absent in human patients but present in mouse models of both MPS IIIA and MPS IIIB<sup>15 16</sup> and had to be euthanized (Fig. 2A). At all ages, heterozygous mice were clinically undistinguishable from their WT siblings. No signs of skeletal abnormalities such as scoliosis reported previously in human patients or shortened skull with a “blunt” snout described in several MPS mouse models including those of MPS

MPS IIIA<sup>16</sup> were detected in the homozygous *Hgsnat-Geo* mice by x-ray analysis (Fig. S1). Similarly, we did not detect any signs of femoral head necrosis also reported for human MPS III patients<sup>48</sup>.

To detect signs of neurodegeneration, we performed neurological assessment (gait, posture/forelimb, posture/hind limb, posture/trunk, posture/tail, avoidance response, rolling over, body righting acting on head, parachute reflex, inverted and vertical wire netting) and studied behavior of mice by the open field test. The first examination was performed at 2 months (when MPS IIIA and B mice still show normal behavior) and then repeated every 2 months with a naïve group of animals. Also starting from the age of 4 months we studied motor activity using motor coordination test performed on an accelerating Rotarod treadmill for mice. The test was repeated every 2 months until the animals were in the terminal stage of the disease.

Neither neurological assessment nor the accelerating Rotarod test (Fig. S2) revealed any signs of neuromuscular pathology in *Hgsnat*-deficient mice up to the age of 10 months. In contrast, open field test performed 1 hour into their light cycle showed definite signs of increased activity and reduced anxiety including higher than average speed and distance travelled, increased frequency of crossing the central field and central distance traveled, as well as decreased frequency and duration of periods of immobility (Fig. 2B and supplemental video 2). The same trend was observed for both male and female mice but for female mice the differences with the control group became significant already at the age of 6 months whereas for male mice for most studied parameters the significant difference was observed only at 8 months. By the age of 10 months the signs of hyperactive behavior diminished resembling the trend observed in patients (Fig. 2B).

Hippocampal function was assessed at 5, 7, 8 and 10 months using the Morris Water Maze test to measure memory and spatial learning capability. To make sure that *Hgsnat*-deficient mice had no visual or motor deficits that could affect the outcome of the test we determined first their ability to reach a visible platform in a 3 days pre-training test. We found that there were no differences between the mutant and WT groups as *Hgsnat*-deficient and WT mice of all age groups showed similar escape latencies in the visible platform testing (Fig. 2C). Similarly, learning progress of mutant mice at ages of 5, 7 and 8 months was similar to that of their WT counterparts, as shown here for the 8 month-old group (Fig. 2C). In contrast, at the age of 10 months, *Hgsnat*-deficient mice needed significantly more time to find the hidden platform compared to their WT counterparts, and to both WT and mutant 8 MO mice,



suggesting impaired spatial learning. Additionally, in the probe trial on day 9 when the platform was removed, HGSNAT-deficient mice spent significantly less time and traveled less distance than WT mice in the target quadrant where the platform used to be located, which indicated a decline of spatial memory (Fig. 2C). Moreover, 10 MO mutant mice displayed lack of precision with less platform crossings compared to WT counterparts, and to younger WT and *Hgsnat*-deficient mice (Fig. 2C).

### ***3. Pathological changes in tissues of Hgsnat-Geo mice***

Pathological examination of homozygous *Hgsnat-Geo* mice performed at the ages of 2, 4, 6, 10 and 11-12 months did not reveal any gross changes in the visceral organs, except for the strikingly reduced abdominal fat detected at 11-12 months. The same animals usually also had largely distended bladder filled with 1–2 ml of urine consistent with urinary retention (Fig. S3). Microscopic examination however revealed multiple pathological changes in numerous tissues and organs already detectable at 2 months and progressively increasing with age as detailed below.

Hepatocytes in the centrilobular and intermediate zones showed microvacuolization of cytoplasm, which became more prominent with age (Fig. S4A). Immunostaining with antibody against cathepsin D (CathD) detected expanded lysosomal system in hepatocytes indicating lysosomal storage starting from 2 months (Fig. S4B). Kupffer cells are increased in number starting from 2 months and become enlarged and strongly stained for CathD at later stages, with occasional transformation into foam cells (Fig. S4C). Besides Kupffer cells, liver sinusoids contained a sparse mixed inflammatory infiltrate. High-resolution analysis of liver tissues by electron microscopy revealed massive accumulation of vacuoles, either electron-lucent or containing a fine sparse material characteristic of glycosaminoglycan (GAG) storage in the cytoplasm of hepatocytes and less prominent storage of this type in Kupffer cells and in Ito cells. Structures resembling autophagic vacuoles were occasionally detected along with lysosomes with storage material in hepatocytes (Fig. S4C-H).

In the spleen, storage dominated in splenic sinus endothelial cells (SSE) giving them an appearance resembling that of foam cells. Population of macrophages in red pulp represented a mixture of small dendritic macrophages and slightly enlarged round cells containing autofluorescent lipopigment and corresponding with phagocytic phenotype. Macrophages in white pulp revealed mostly an inconspicuous stellate appearance. In general, there was no convincing presence in spleen tissue of macrophages with storage material even at the most advanced stages of disease (surviving 16 MO mice). CathD immunostaining was compatible

with lysosomal storage in SSE and was increased starting from 2 months (Fig. S5A). Electron-lucent storage vacuoles in SSE were also detected by electron microscopy (Fig. S5I). Brain cortex in general stayed without massive neurodepletion disrupting stratification even at the age of 12 months. However, counting NeuN-stained neurons in the two selected areas of somatosensory cortex showed that neuronal loss in homozygous *Hgsnat-Geo* mice actually occurs starting from the age of 4 months and continues throughout the life resulting by the age of 12 months in the ~30% reduction of neuronal density in these areas (Fig. 3A). In the cerebellar cortex, Purkinje cell loss was massive in the anterior lobe with lobules I, II and III most severely affected and lobules IX and X less affected at 12 months of age (Fig. S6). The number of GFAP-positive astrocytes became increased at 5 months in hippocampus and in deep cerebellar nuclei of *Hgsnat-Geo* as compared with WT mice, and at the age of 12 months it also became increased in neocortex and cerebellar cortex (Fig. 3B).

The most striking phenomenon observed in all parts of brain was a coarse vacuolization of the cytoplasm of multiple CD68-positive cells giving them foam cell-like appearance (Fig. 3C and Fig. S7). These cells dispersed in gray and less so in white matter were frequently found adjacent to neurons suggesting that they represent perineuronal microglia. Individual macrophage-like CD68-positive cells with cytoplasmic vacuoles were also detected in perivascular areas. Microglia cells containing storage materials were most prominent in caudatoputamen and in brain cortex. They were first detected in 2 MO mice, thus preceding pathologic changes in neurons and become more frequent at later stages. Contrary to microglial cells, neurons were mostly featured by finely granular appearance of their perikarya without marked distension. The granular material accumulated in these neurons with a variable intensity was strongly PAS-positive (Fig. 3D) and displayed autofluorescence of ceroid type (Fig. 3E). Immunostaining with antibodies against CathD (Fig. 3F), revealed expanded lysosomal system in neurons of mutant mice. Neurons with storage materials were found in brain cortex, thalamus, hypothalamus, amygdala, midbrain, pons and cerebellum. Accumulation of PAS-positive autofluorescent material was most prominent in neurons present in deep cortical layers, in hippocampus and in cerebellum. Neurons in caudatoputamen showed little involvement. Incipient neuronal storage was detectable in 5 MO mice and widespread yet irregular neuronal storage was present in 12 MO animals. No signs of lysosomal storage were detected in vascular endothelial cells (Fig. 4B).

EM performed in brain cortex confirmed that neurons and microglial cells had two distinct types of storage (Fig. 4). Cortical microglia displayed prominent accumulation of electron-

lucent storage vacuoles or those with a sparse fine content. In contrast, neuronal pathology was dominated by progressive lysosomal storage of electron-dense heterogeneous ceroid-like material and early detectable mitochondrial structural abnormalities. Mitochondria were pleomorphic and increased in number with many of them swollen with disorganized or reduced inner membranes. Storage in microglia was not accompanied by any structural mitochondrial changes. Storage compartments in neurons contained heterogeneous, granular and/or lamellar material, occasionally with lipid droplets. At the same time, EM of neurons did not reveal lysosomes containing classical zebra-bodies, but some storage deposits contained structures resembling degenerated mitochondria. Part of the cytoplasmic vacuoles with variably rich content and a double-layered character of limiting membranes were reminiscent of autophagic origin. At the most advanced stages of the disease (14-16 months), ultrastructural pattern in neuronal lysosomes was dominated by massive accumulation of closely packed fibrillary deposits often resembling storage material of a rectilinear and/or fingerprint type in neuronal ceroid lipofuscinoses (Fig. 4). Besides, individual neurons underwent severe regressive changes detectable at the ultrastructural level.

Other studied mouse organs and tissues stayed generally unaffected even at 12 months of age except for urinary bladders, which were markedly distended with thin walls at 12 months of age. A sparse presence of cells staining for CathD and containing storage materials was detected in lamina, muscularis propria and adventitia. Normally arranged cardiomyocytes without regressive changes were observed in heart. There was no fibrosis in the interstitium and interstitial elements did not show signs of lysosomal storage at the optical level. Similarly, lysosomal storage was not detectable in alveolar septa in lungs. Population of septal and alveolar macrophages was rich, with focally increased phagocytic activity and undistinguishable from that seen in WT. Respiratory bronchial epithelium displayed increased staining for CathD indicative of lysosomal storage. In kidney, increased immunostaining for CathD was detected in glomeruli and in epithelial cells of distal tubules and collecting ducts (Fig. S5E). Storage of electron-lucent vacuoles in fibroblasts, vascular pericytes and rarely in vascular endothelial cells was detectable at the ultrastructural level (Fig. S5J-L).

#### ***5. Hgsnat-Geo mice show lysosomal GAG storage in microglial cells and ganglioside storage in non-lysosomal compartments of neurons***

To investigate if Hgsnat deficiency in mouse tissues resulted in impairment of heparan sulfate catabolism, total GAG in mouse brain and liver tissues were measured at the age of 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months (Fig. 5A). In both tissues GAG levels were slightly increasing with age

while remaining significantly higher than in the WT mice (on average 2 fold increase in brain and almost 10 fold increase in liver at 12 months). At the same time, total GAG in brain tissues of *Hgsnat-Geo* mice at all ages was significantly lower than in MPS IIIB mice.

GAG accumulation at the cellular level was studied by immunohistochemistry using monoclonal 10E4 antibody specific against a native HS epitope<sup>49</sup>, which detected increased staining of cytoplasmic LAMP-1-positive organelles in multiple cells throughout the cortex and hippocampus. The cells storing HS were not stained with the antibody against the neuronal marker NeuN, but were positive for Alexa 568-labeled isolectin B4 (ILB4), specific for activated microglia cells (Fig. 5B).

Tandem mass spectrometry demonstrated ~2-fold increased levels of  $G_{M2}$  and  $G_{M3}$  gangliosides in the brain tissues of 4 MO *Hgsnat-Geo* mice as compared to their WT siblings (Fig. 5C), consistent with previously reported storage of these lipids in the mouse models of MPS IIIA and B<sup>15, 16</sup>. Accumulation of gangliosides in brain tissues was further studied by immunohistochemistry using the human-mouse chimeric monoclonal antibody, KM966<sup>50</sup> specific to  $G_{M2}$  ganglioside<sup>23</sup> and mouse monoclonal antibody specific to  $G_{M3}$  ganglioside. Both gangliosides, almost undetectable in the brain of WT mice (Fig. S8) were highly present in the brains of *Hgsnat-Geo* mice (Fig. 5D). The ganglioside storage was observed in most areas of the brain, including the cerebellum, but was more prominent in deep layers of cortex and hippocampus (Fig 5D and Fig. S8).

All ganglioside-accumulating cells were recognized by the anti-NeuN antibody and were not stained with ILB4 indicating that they are neurons but not microglial cells (Fig. 5D). In contrast to GAG accumulation both the number of ganglioside-positive granules in the neurons and their size were dramatically increasing between the ages of 8 and 12 months (Fig. S8). Intriguingly, when the tissue sections were co-stained for both  $G_{M3}$  and  $G_{M2}$  gangliosides, we detected only modest level of co-localization indicating that the corresponding storage granules tend to segregate from each other (Fig. 5D). Similar pattern was previously observed in MPS IIIA and B mouse models<sup>21</sup>. Also, we observed only partial co-localization between the stored gangliosides and lysosomal marker LAMP-1 (Fig. 5D), which could indicate that the gangliosides are accumulated in the compartments having both lysosomal and non-lysosomal origin.

When we, however, co-stained the cells for gangliosides and the mitochondrial marker cytochrome c oxidase subunit 4 (Cox4) we detected a high degree of co-localization (Fig. 5D) suggesting that some of the storage granules could appear in the result of impaired mitophagy also consistent with the results of the EM analysis of neurons (as described above). Cox4 staining also revealed that the mitochondrial network is less organized and the ratio between the fused and single mitochondria is reduced in the tissues of the mutant mice (Fig. 5D).

### ***6. Brain tissues of Hgsnat-Geo mice show compromised autophagy, impaired proteolysis and accumulation of missfolded proteins.***

Impaired autophagy associated with decreased lysosomal and proteosomal proteolysis was found to be a characteristic feature of cells in many lysosomal disorders (reviewed in<sup>51</sup>). To test whether it is also the case for liver and brain tissues of Hgsnat-deficient mice we have analyzed the relative abundance of the two forms of light chain 3 protein (LC3). During the formation of the autophagosome a cytosolic form of LC3 (LC3-I) is cleaved and conjugated with phosphatidylethanolamine to form the LC3-phosphatidylethanolamine conjugate (LC3-II) tightly associated with the autophagosomal membranes, so the amount of LC3-II or the presence of LC3-positive punctate in the cytoplasm reflects the existence of autophagosome. In the liver tissues of *Hgsnat-Geo* mice the increased levels of the LC3-II were detected at all ages indicating impaired autophagy (Fig. S9). In the brain, the increase of LC3-II was also detected, but only at the age of 6 months and older coinciding with detection of the signs of impaired autophagy by EM (Fig. 6A).

The results of Western blot were consistent with the results of immunohistochemistry that showed presence of LC3 in the cytoplasm of medial entorhinal cortex (MEC) neurons at 10 months of age (Fig. 6B). We also detected drastically increased neuronal levels of lysosomal SCMAS (subunit C of mitochondrial ATP synthase) and ubiquitin suggestive of mitophagy and a general impairment of lysosomal proteolysis and increased levels of O-GlcNAc-modified proteins, a clear indication of the ER stress often associated with impaired cellular proteolysis (Fig. 6C)

Recent studies have demonstrated that neurons in certain brain areas of MPS IIIB and MPS IIIA mice, primarily dentate gyrus and MEC involved in learning and memory have increased levels of protein markers of Alzheimer disease and other tauopathies leading to dementia such as lysozyme, hyperphosphorylated tau (Ptau), Ptau kinase, Gsk3 $\beta$ , and beta amyloid<sup>27, 28</sup>. All these markers are also increased in the brains of Hgsnat-deficient mice (Fig. S10)

although their levels are somewhat lower than those in the MPS IIIA and MPS IIIB mice of similar age<sup>28</sup>.

### **7. Mitochondrial energy metabolism is compromised in brain tissues of *Hgsnat-Geo* mice**

To verify whether mitochondrial energy metabolism is affected in the brain cells of *Hgsnat-Geo* mice we have measured activities of several mitochondrial respiratory chain enzymes including NADH:CoQ reductase (NQR, complex I), succinate:CoQ reductase (SQR, complex II), cytochrome c oxidase (COX, complex IV), NADH:cytochrome c reductase (NCCR, complex I+III), succinate:cytochrome c reductase (SCCR, complex II+III) in the isolated brain mitochondria. We also measured activities of pyruvate dehydrogenase (PDH) complex and citrate synthase (CS).

Activities of complex IV (COX) and complex II (SQR) enzymes were significantly lower in *Hgsnat-Geo* mice than in the corresponding WT controls at the ages of 8 and 12 months and 8 months, respectively (Fig. 7A). No significant differences in activities of enzymes of complex I, complex I+III, complex III, and complex II+III of respiratory chain as well as PDH and control mitochondrial enzyme citrate synthase (CS) were found between *Hgsnat-Geo* and WT mice, but when we analyzed the activities of individual enzymes as a function of mouse age we found that the activities of complex II (SQR), complex II+III (SCCR) and citrate synthase in *Hgsnat-Geo* mice decreased significantly with age, whereas no dependence was detected for the WT animals (Fig. 7B).

Consistent with the gradual reduction of the activities of respiratory chain enzymes was the observed decrease of the total content of coenzyme Q10 in the brain tissues of *Hgsnat-Geo* mice. At the age of 4 months the levels of Q10 in the WT and *Hgsnat*-deficient mice were the same, but while in the WT mice of older age Q10 stayed at the same level in the brains of *Hgsnat-Geo* mice it showed a negative correlation with age and became significantly lower than in WT at the age of 12 months (Fig. 7).

### **9. Progressive neuroinflammation in *Hgsnat-Geo* mice**

Chronic progressive neuroinflammation is well documented in mouse models of lysosomal neurodegenerative diseases including those of MPS IIIA and B, which are characterized by activation of resident microglia and astrocytes, infiltration of leucocytes from the periphery and production of the inflammatory cytokines<sup>17, 20, 29</sup>. Two fold increased expression of inflammation markers, MIP1 $\alpha$  (CCL3) and TNF $\alpha$ , in the brains of homozygous *Hgsnat-Geo* mice was detected as early as at 10 days after birth. The levels of these cytokines further increased with age reaching the maximum at 8 months of age (Fig. 8A). At the same time, IL-

1- $\beta$  and TGF- $\beta$  were not significantly increased as compared with WT controls. Similarly increased expression of MIP1 $\alpha$  and TNF $\alpha$  cytokines was detected also in the brain tissues of MPS IIIA mice, whereas MPS IIIB mice had ~2 fold higher levels at all ages.

Consistent with high expression level of cytokines brain tissues of HGSNAT-deficient showed increased levels of activated microglia cells detected by isolectin B4 staining (Fig. 8B) or antibodies against CD68, whereas almost no staining was detected in matching controls (Fig. S7). Besides, significantly higher amount of astrocytes stained with anti-GFAP antibodies was detected in the hippocampal area of mutant mice starting from the age of 4 months (Fig. 3B).

Signs consistent with an immune reaction were detected also in the liver. Early activation of Kupffer cells preceding the substantial storage and increased presence in liver sinusoids of inflammatory cells was detectable in *Hgsnat-Geo* mice but not in WT mice (Fig. S4).

## DISCUSSION

Altogether our data demonstrate that HGSNAT deficiency in mice results in lysosomal accumulation of GAG and specifically of HS, in multiple cell types. GAG accumulation is followed by secondary accumulation of gangliosides as well as increased lysozyme, pTau, Gsk3 $\beta$ , and beta amyloid levels in brain neurons. Signs of general inflammation in the brain such as activation of astrocytes, microglia and cytokine production, previously reported for other MPS mouse models are clearly present from the very early age. At the same time a lower level of GAG storage as compared to the MPS IIIB mouse model results in a reduced level of brain inflammation, later onset and slower progression of the disease.

The main organs affected at the optical and ultrastructural levels are the brain, liver and spleen. Lysosomal storage consistent with accumulation of undegraded GAG developed early in hepatocytes, splenic sinus endothelium, and cerebral microglia, and later to a lesser extent in liver Kupffer and Ito cells, in fibroblasts and in perivascular cells.

In peripheral tissues, storage in epithelial and mesenchymal cells, except for hepatocytes occurred later and with a lesser intensity compared to mouse MPS IIIA and MPS IIIB models<sup>15, 16</sup>. Presence in visceral organs of macrophages with storage materials was limited, except for liver Kupffer cells, which were early activated and developed storage phenotype with age.

In the brain, substantial storage was found in population of microglia at early age and showed further progression with age in all examined brain regions. Foam microglial cells were

frequently in a close contact to neurons. Sparse foam cells of microglial origin were detectable in the brain even at 2 months, so the storage in microglia seems to be the initial pathological event preceding pathological changes in neurons. Storage vacuoles in microglia had a uniform electron-lucent appearance different from ceroid-type accumulation in neurons. The apparently different storage patterns detected in microglia and neurons by EM could be also attributed to the loss of GAG during fixation of the cells, however further immunohistochemical analysis confirmed that lysosomal storage of HS was detected predominantly in microglia, whereas gangliosides accumulated mainly in neurons.

Neuronal pathology was also featured by cytoplasmic accumulation of autofluorescent granular material with a variably expressed positive immunostaining for SCMAS in neuronal perikarya. Storage of granular autofluorescent material was restricted to individual neurons at 5 months but detected throughout the whole neuronal population at 12 months. Even at this advanced stage, neurons showed some variations in the intensity of storage between brain regions and between cells within a region. Similar heterogeneous storage character was reported in other MPS disease mouse models<sup>21</sup>. Neuronal loss was not a dominant feature at the early stage of the disease but it became significant at 6 months and further progressed with age. At the EM level, neuronal pathology was characterized by a combination of early detectable structural alterations of mitochondria, accumulation of vacuoles suggestive of autophagic origin, progressive lysosomal storage of heterogeneous material and massive terminal lysosomal accumulation of deposits resembling those detected in neuronal ceroid lipofuscinoses. Similar “fingerprint-like” structures were previously detected in MPS IIIB mouse and identified as SCMAS deposits<sup>41</sup>. The mitochondrial network in neurons was disorganized and the partial impairment of OXPHOS enzymes (complex II, II+III and IV) in brain tissues was detected by enzymatic assays and immunohistochemical analysis, while mitochondrial compartment in age-matching controls did not reveal any abnormalities.

Altogether our data characterize MPS IIIC as a neurodegenerative disorder with a dominant lysosomal and mitochondrial alteration in neurons. Further, our findings suggest that autophagy, namely mitophagy represent a substantial source for accumulation of undegraded materials in the lysosomal system of neurons.

The precise sequence of events that starts with the accumulation of HS and leads to a widespread brain pathology and neuronal death is yet to be determined, however our results allow hypothesizing that the malfunction and loss of neurons is mediated primarily by pathological changes in their mitochondrial system. We speculate that the disease starts with



accumulation of primary storage materials (mostly HS and HS-derived oligosaccharides) in microglia cells as documented by EM analysis and immunohistochemistry with HS-specific antibodies. These materials released from the microglia presumably by exocytosis of lysosomes are known to affect neurogenesis (Bruyere et al, submitted) and cause other adverse reactions in neurons<sup>20</sup>. HS and derived oligosaccharides also induce general inflammation reactions in the brain by activating TLR receptors of microglia cells, resulting in release of multifunctional cytokines such as TNF- $\alpha$  and MIP-1- $\alpha$ , known to cause mitochondrial damage through formation of ROS and oxidative stress<sup>52-55</sup>. Mitochondrial abnormalities detected at both ultrastructural and biochemical levels in the brain of MPS IIIC mice starting from the age of 5 months could eventually lead to neuronal death observed in somatosensory cortex and cerebellum (Purkinje cells). Although neurodegenerative disease can develop even without neuronal loss it is important to mention that neuronal death is observed in MPS III patients<sup>26</sup>. Ganglioside accumulation detected in neurons starting from 2 months is probably of non-lysosomal origin. It could be caused by altered Golgi function as described previously for MPS IIIB mouse model<sup>30</sup>. Stored lipids and gangliosides can also be partially of mitochondrial origin due to mitophagy and impaired catabolism of autophagosomal content. Indeed, our data define accumulation of densely packed material displaying a strong autofluorescence as a determining feature in brain neurons of MPS IIIC mice at the advanced stage of the disease. Since these granules are SCMAS positive and their ultrastructural pattern strongly resembles that in neuronal ceroid lipofuscinoses we speculate that they are derived from autophagosomes.

Impairment of autophagosome-lysosome fusion can by itself result in accumulation of deformed and dysfunctional mitochondria otherwise eliminated through autophagy and lysosomal catabolism<sup>56, 57</sup>. Our data however demonstrate that in contrast to liver, brain tissues of MPS IIIC mice up to the age of 6 months do not contain increased levels of impaired autophagy marker, LC3-II. We therefore suggest that in brain neurons of MPS IIIC mice mitochondrial damage develops in parallel with impairment of autophagy.

Together, our data validate *Hgsnat-GEO* mouse as an adequate animal model of MPS IIIC, useful for future testing of therapies. The mechanism of brain disease in MPS IIIC mouse model explaining the progression of neuronal loss by mitochondrial dysfunction secondary to brain inflammation may be a common phenomenon for metabolic neurodegenerative

diseases. It also justifies future studies to determine if the mitochondrial defects in MPS IIIC cells can be at least partially rescued by known anti-oxidative drugs.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge Drs. Elizabeth Neufeld and Mila Ashmarina for critical reading of the manuscript and helpful advice. We also thank Dr. Nobuo Hanai, Dr. Akiko Furuya and Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. for a generous gift of monoclonal antibodies against G<sub>M2</sub> ganglioside, Dr. Pascal Vachon for the help with neurological examination of mice, Saadallah Bouhanik for the help with X-ray analysis, Dr. Volkan Seyrantepe for the help with ganglioside analysis by TLC and Carmen Movila for the help in preparation of the manuscript.

This work was supported in part by the operating grant (111068) from Canadian Institutes of Health Research and from JJB Foundation to A.V.P., the grant NT13122-3/2012 from the Ministry of Health of the Czech Republic to Helena Hůlková and M.H. and by Charles University institutional program PRVOUK-P24/LF1/3 to Hana Hansíková, M.T. and Z.H.

#### REFERENCES

1. Neufeld EF, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. USA, New-York: McGraw-Hill; 2001. p. 3421-52.
2. Valstar MJ, Ruijter GJ, van Diggelen OP, et al. Sanfilippo syndrome: a mini-review. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:240-52.
3. Bartsocas C, Grobe H, van de Kamp JJ, et al. Sanfilippo type C disease: clinical findings in four patients with a new variant of mucopolysaccharidosis III. *Eur J Pediatr* 1979;130:251-8 [PubMed](#) .
4. Ruijter GJ, Valstar MJ, van de Kamp JM, et al. Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Mol Genet Metab* 2008;93:104-11 [PubMed](#) 5. Berger-Plantinga EG, Vanneste JA, Groener JE, et al. Adult-onset dementia and retinitis pigmentosa due to mucopolysaccharidosis III-C in two sisters. *J Neurol* 2004;251:479-81 [PubMed](#) .
6. PoorthuisBJ, Wevers RA, Kleijer WJ, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 1999;105:151-6 [PubMed](#) .
7. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet* 2004;12:87-92 [PubMed](#) .
8. Klein U, Kresse H, von Figura K. Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:5185-9.
9. Feldhammer M, Durand S, Mrazova L, et al. Sanfilippo syndrome type C: mutation spectrum in the heparan sulfate acetyl-CoA: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (HGSNAT) gene. *Hum Mutat* 2009;30:918-25 [PubMed](#) .
10. Feldhammer M, Durand S, Pshezhetsky AV. Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C. *PLoS One* 2009;4:e7434.
11. Aronovich EL, Johnston JM, Wang P, et al. Molecular basis of mucopolysaccharidosis type IIIB in emu (*Dromaius novaehollandiae*): an avian model of Sanfilippo syndrome type B. *Genomics* 2001;74:299-305 [PubMed](#) .

12. Aronovich EL, Carmichael KP, Morizono H, et al. Canine heparan sulfate sulfamidase and the molecular pathology underlying Sanfilippo syndrome type A in Dachshunds. *Genomics* 2000;68:80-4 [PubMed](#) .
13. Ellinwood NM, Wang P, Skeen T, et al. A model of mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo syndrome type IIIB): N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase deficiency in Schipperkedogs. *J Inherit Metab Dis* 2003;26:489-504 [PubMed](#) .
14. Ginsberg SD, Galvin JE, Lee VM, et al. Accumulation of intracellular amyloid-beta peptide (A beta 1-40) in mucopolysaccharidosis brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:815-24.
15. Li HH, Yu WH, Rozengurt N, et al. Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14505-10.
16. Bhaumik M, Muller VJ, Rozaklis T, et al. A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology* 1999;9:1389-96 [PubMed](#) .
17. Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, et al. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1902-7.
18. Villani GR, Gargiulo N, Faraonio R, et al. Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB. *J Neurosci Res* 2007;85:612-22 [PubMed](#) .
19. DiRosario J, Divers E, Wang C, et al. Innate and adaptive immune activation in the brain of MPS IIIB mouse model. *J Neurosci Res* 2009;87:978-90 [PubMed](#) .
20. Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, et al. Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One* 2008;3:e2296.
21. McGlynn R, Dobrenis K, Walkley SU. Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *J Comp Neurol* 2004;480:415-26 [PubMed](#) .
22. Crawley AC, Gliddon BL, Auclair D, et al. Characterization of a C57BL/6 congenic mouse strain of mucopolysaccharidosis type IIIA. *Brain Res* 2006;1104:1-17 [PubMed](#) .
23. Huang JQ, Trasler JM, Igdoura S, et al. Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum Mol Genet* 1997;6:1879-85 [PubMed](#) .
24. Wada R, Tiffit CJ, Proia RL. Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10954-9.
25. Mohammed EE, Snella EM, Rutz-Mendicino MM, et al. Accelerated clinical disease and pathology in mucopolysaccharidosis type IIIB and GalNAc transferase double knockout mice. *Mol Genet Metab* 2012;107:129-35 [PubMed](#) .
26. Hamano K, Hayashi M, Shioda K, et al. Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta Neuropathol* 2008;115:547-59 [PubMed](#) .
27. Ohmi K, Kudo LC, Ryazantsev S, et al. Sanfilippo syndrome type B, a lysosomal storage disease, is also a tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8332-7.  
Ohmi K, Zhao HZ, Neufeld EF. Defects in the medial entorhinal cortex and dentate gyrus in the mouse model of Sanfilippo syndrome type B. *PLoS One* 2011;6:e27461.
29. Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, et al. Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PLoS One* 2012;7:e35787.
30. Roy E, Bruyere J, Flamant P, et al. GM130 gain-of-function induces cell pathology in a model of lysosomal storage disease. *Hum Mol Genet* 2012;21:1481-95 [PubMed](#) .
31. Hocquemiller M, Vitry S, Bigou S, et al. GAP43 overexpression and enhanced neurite outgrowth in mucopolysaccharidosis type IIIB cortical neuron cultures. *J Neurosci Res* 2010;88:202-13 [PubMed](#) .
32. Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R, et al. Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14109-14.

33. Hansen GM, Markesich DC, Burnett MB, et al. Large-scale gene trapping in C57BL/6N mouse embryonic stem cells. *Genome Res* 2008;18:1670-9 [PubMed](#) .
34. Lema PP, Girard C, Vachon P. Evaluation of dexamethasone for the treatment of intracerebral hemorrhage using a collagenase-induced intracerebral hematoma model in rats. *J Vet Pharmacol Ther* 2004;27:321-8.
35. Langford-Smith A, Langford-Smith KJ, Jones SA, et al. Female mucopolysaccharidosis IIIA mice exhibit hyperactivity and a reduced sense of danger in the open field test. *PLoS One* 2011;6:e25717.
36. Langford-Smith A, Malinowska M, Langford-Smith KJ, et al. Hyperactive behaviour in the mouse model of mucopolysaccharidosis IIIB in the open field and home cage environments. *Genes Brain Behav* 2011;10:673-82 [PubMed](#) .
37. Seyrantepe V, Lema P, Caqueret A, et al. Mice doubly-deficient in lysosomal hexosaminidase A and neuraminidase 4 show epileptic crises and rapid neuronal loss. *PLoS Genet* 2010;6.
38. Whitley CB, Ridnour MD, Draper KA, et al. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion. *Clin Chem* 1989;35:374-9 [PubMed](#) .
39. Kyrklund T. Two procedures to remove polar contaminants from a crude brain lipid extract by using prepacked reversed-phase columns. *Lipids* 1987;22:274-7 [PubMed](#) .
40. Seyrantepe V, Canuel M, Carpentier S, et al. Mice deficient in Neu4 sialidase exhibit abnormal ganglioside catabolism and lysosomal storage. *Hum Mol Genet* 2008;17:1556-68 [PubMed](#) .
41. Ryazantsev S, Yu WH, Zhao HZ, et al. Lysosomal accumulation of SCMAS (subunit c of mitochondrial ATP synthase) in neurons of the mouse model of mucopolysaccharidosis III B. *Mol Genet Metab* 2007;90:393-401 [PubMed](#) .
42. Makinen MW, Lee CP. Biochemical studies of skeletal muscle mitochondria. I. Microanalysis of cytochrome content, oxidative and phosphorylative activities of mammalian skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1968;126:75-82.
43. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994;228:35-51 [PubMed](#) .
44. Srere PA. [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. In: John ML, editor. *Methods Enzymol*: Academic Press; 1969. p. 3-11.
45. Dudkova Z, Zeman J, Hansikova H, et al. Determination of pyruvate dehydrogenase Complex Activity in Muscle Tissue. *Klin Biochem Metab* 1995;3:178-82 [PubMed](#) .
46. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75 [PubMed](#) .
47. Mosca F, Fattorini D, Bompadre S, et al. Assay of coenzyme Q(10) in plasma by a single dilution step. *Anal Biochem* 2002;305:49-54 [PubMed](#) .
48. de Ruijter J, Maas M, Janssen A, et al. High prevalence of femoral head necrosis in Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo disease): a national, observational, cross-sectional study. *Mol Genet Metab* 2013;109:49-53 [PubMed](#) .
49. David G, Bai XM, Van der Schueren B, et al. Developmental changes in heparan sulfate expression: in situ detection with mAbs. *J Cell Biol* 1992;119:961-75 [PubMed](#) .
50. Nakamura K, Koike M, Shitara K, et al. Chimeric anti-ganglioside GM2 antibody with antitumor activity. *Cancer Res* 1994;54:1511-6 [PubMed](#) .
51. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, et al. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:283-96.
52. Chuang YC, Su WH, Lei HY, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy via reactive oxygen species generation. *PLoS One* 2012;7:e37613.
53. Chen XH, Zhao YP, Xue M, et al. TNF-alpha induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2010;328:63-9 [PubMed](#) .
54. Baregamian N, Song J, Bailey CE, et al. Tumor necrosis factor-alpha and apoptosis signal-regulating kinase 1 control reactive oxygen species release, mitochondrial autophagy, and c-Jun N-terminal kinase/p38 phosphorylation during necrotizing enterocolitis. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:297-306.

55. Vitner EB, Farfel-Becker T, Eilam R, et al. Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease. *Brain* 2012;135:1724-35 [PubMed](#) .
56. Osellame LD, Rahim AA, Hargreaves IP, et al. Mitochondria and quality control defects in a mouse model of Gaucher disease--links to Parkinson's disease. *Cell Metab* 2013;17:941-53 [PubMed](#) .
57. de Pablo-Latorre R, Saide A, Polishhuck EV, et al. Impaired parkin-mediated mitochondrial targeting to autophagosomes differentially contributes to tissue pathology in lysosomal storage diseases. *Hum Mol Genet* 2012;21:1770-81 [PubMed](#) .

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. Targeting the *Hgsnat* gene in mice.**

(A) Strategy for producing the targeted disruption of the *Hgsnat* gene. The gene trap vector used by TIGM contains a splice acceptor site (SA) upstream of a  $\beta$ -galactosidase/neomycin phosphotransferase (*Geo*) fusion gene followed by polyadenylation sequence (pA), *PGK* and *BTK* genes and splice donor site (SD) inserted into intron 7 of the *Hgsnat* gene as confirmed by genomic sequencing. Hence, the downstream exons 8–13 in the gene trap transcript were replaced by the *Geo* sequence. Exons in the mouse *Hgsnat* gene are shown as black numbered boxes and *Geo-PGK-BTK* cassette, as white boxes. Primers (E7-R, Geo-R, and E10-F) were used to measure the expression of the WT *Hgsnat* and of the targeted *Hgsnat-Geo* alleles by RT-qPCR.

(B) RT-qPCR shows that expression of the *Hgsnat* mRNA in brain and liver tissues of mice homozygous for the *Hgsnat-Geo* allele is reduced to 0.6 and 1.6% of that in the tissues of their WT siblings. Total RNA was extracted from tissues of 4 MO WT and *Hgsnat-Geo* mice and analyzed for *Hgsnat* expression by RT-qPCR. The values were normalized for the level of control *RPL32* mRNA. Data are expressed as means ( $\pm$ S.D.) of experiments performed with 6 mice for each genotype.

(C) Deficient *Hgsnat* activity in tissues of mice homozygous for *Hgsnat-Geo* allele. *Hgsnat* activity was measured with fluorogenic substrate, Muf- $\beta$ -D-glucosaminide in the tissues of 4 MO WT, *Hgsnat-Geo*<sup>+/-</sup> and *Hgsnat-Geo* mice or in cultured skin fibroblasts of WT and *Hgsnat-Geo* mice. Data are expressed as means ( $\pm$ S.D.) of independent experiments performed with tissues of 6 mice for each genotype or with 3 different cell cultures.

(D) Lysosomal hydrolases are increased in tissues of *Hgsnat-Geo* mice. Acidic  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase and total  $\beta$ -hexosaminidase activity were measured in the tissues of 1, 4 and 6 MO *Hgsnat-Geo* mice and their WT siblings. Data are expressed as means ( $\pm$ S.D.) of experiments performed with 3 mice for each genotype.

### **Figure 2. *Hgsnat-Geo* mice have shorter life span and show signs of hyperactivity between the ages of 6 and 8 months and learning impairment at the age of 10 months.**

(A) Kaplan-Meier plot showing survival of *Hgsnat-Geo* mice (n=50) and their WT counterparts (n=70). By the age of 70 weeks the vast majority of *Hgsnat-Geo* mice died or had to be euthanized on the veterinarian request due to urinary retention.

(B) Six and 8 MO *Hgsnat-Geo* female mice show signs of hyperactivity and reduced anxiety compared to WT mice as detected by OFT performed 1 h into their light cycle. Increased activity (total distance traveled) was detected starting from ~5 months of age, with significant hyperactivity at 8 months. Reduced anxiety (increased center activity) was detected starting from ~3 months, with significant difference with WT at 6 and 8 months. At 6 and 8 months

*Hgsnat-Geo* mice also spent significantly less time immobile as compared to WT mice. P value was calculated by two-way-ANOVA (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). From 6 (2, 4 and 6 MO) to 10 (8 and 10 MO) mice were studied per age/per genotype.

(C) *Hgsnat-Geo* mice showed impaired performance in the spatial memory-based Morris Water Maze test at 10 months. All mice showed similar average latencies on days 1-3 of visible platform testing. Whereas 8 MO *Hgsnat-Geo* mice had latencies in the hidden platform testing similar to those of their WT counterparts (days 4-8), 10 MO mutant mice were significantly impaired in this spatial learning test. During the removed-platform probe trial on day 9, *Hgsnat-Geo* mice displayed reduced time in the target quadrant as compared to their WT siblings. Numbers of passes over the previous location of the hidden platform were also reduced. Swim speed was comparable among all groups. Six mice were studied for each group.

**Figure 3. Pathological changes in CNS of *Hgsnat-Geo* mice**

(A) Progressive loss of neurons in somatosensory cortex. NeuN-positive neurons were counted in two adjacent similar 1.92 mm<sup>2</sup> fields on 3 sagittal sections (1.44, 1.68 and 1.92 mm from bregma) of S1 somatosensory cortex of each mouse; 4 (2 male, 2 female) mice were studied for each age and each genotype. Two-way repeated measurements ANOVA was used to test differences between the mouse groups: significant differences between the mean values in Bonferroni post-test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ) are shown.

(B) Increased numbers of GFAP-positive astrocytes are detected in the somatosensory cortex of 4 and 10 MO *Hgsnat-Geo* mice.

(C) Presence in cortical gray matter of microglial cells with vacuolized cytoplasm and foam cell-like appearance. Microglial cells showing storage are either dispersed or adjacent to neurons (shown in details in the insert). Somatosensory cortex of 12 MO *Hgsnat-Geo* mouse, layer V; H&E stain. Bar represents 100  $\mu\text{m}$ , bar in the insert, 30  $\mu\text{m}$ .

(D) Accumulation of PAS positive granular material is detectable in perikarya of multiple neurons. Microglia show presence of storage and foam-like appearance. Somatosensory cortex of 12 MO *Hgsnat-Geo* mouse, layer V. Bar represents 50  $\mu\text{m}$ , bar in the insert, 30  $\mu\text{m}$ .

(E) A massive accumulation of granular autofluorescent material of ceroid type is widely present in cortical neurons. Insert shows a detailed view of a neuron with lysosomal ceroid deposits in the perikaryon. Somatosensory cortex of 12 MO *Hgsnat-Geo* mouse, layer V. Bar represents 100  $\mu\text{m}$ , bar in the insert, 30  $\mu\text{m}$ .

(F) Cathepsin D immunostaining indicates presence of lysosomal storage in microglia and neurons. Dispersed, perineuronal or perivascular microglia is strongly positive for Cathepsin D. Lysosomal system in neurons is irregularly activated and shows a coarsely granular appearance. Neuronal perikarya are not markedly distended in contrast to microglia. Insert shows enlarged view of both cell types. Somatosensory cortex of 12 MO *Hgsnat-Geo* mouse, layer V. Bar represents 100  $\mu\text{m}$ , bar in the insert, 30  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4. Ultrastructural pathology in the brain of *Hgsnat-Geo* mice.**

(A) Storage pattern in microglia detected at 5 months. Massive accumulation of vacuoles with single limiting membranes and a sparse fine content in the cytoplasm of a cortical microglial cell is compatible with lysosomal GAG storage. Lysosomes containing storage materials are

marked by arrowheads. The microglial cell (nucleus is marked by an asterisk) is in a close proximity to a cortical brain neuron. Bar represents 2  $\mu\text{m}$ .

(B) Lysosomal system in a cortical neuron at 12 months is overloaded by material of a variable electron density (marked by arrowheads). Nucleus of the neuron with storage is marked by an asterisk. Vascular endothelial cells in a capillary lumen (marked by double asterisks) are free of storage. Bar represents 2  $\mu\text{m}$ .

(C) High magnification micrograph of a cortical neuron at 12 months demonstrates a storage compartment (marked by arrows) containing ceroid-like granular and/or lamellar material packed with a variable density. Insert shows a detailed view of storage deposits. Bar represents 1  $\mu\text{m}$ .

(D) Pleiomorphic mitochondria in the cytoplasm of a neuron at 5 months with some of them swollen (marked by asterisks) or with reduced and disorganized cristae (marked by an arrowhead). Vacuoles with variably rich content are present in the cytoplasm (marked by arrows). Some of these vacuoles have double-layered limiting membranes (details are shown in the insert) reminiscent of autophagic origin (see also Fig. 6A). Bar represents 1  $\mu\text{m}$ .

(E) Storage of densely packed fibrillary material (marked by arrows) strongly resembling rectilinear or fingerprint-like ceroid deposits in neuronal lysosomes at advanced stages of the disease. Brain cortex of 16 MO *Hgsnat-Geo* mouse. Bar represents 1  $\mu\text{m}$ .

**Figure 5. Accumulation of primary and secondary storage materials in tissues of *Hgsnat-Geo* mice**

A) Total GAG were measured in the whole brain tissues of *HGSNAT-Geo* mice,  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase-deficient (MPS IIIB) mice and their corresponding WT controls as well as in liver tissues of *HGSNAT-Geo* and WT mice. The data show means ( $\pm$ S.D.) of individual measurements performed with 5-15 mice for each age and genotype.

B) Intralysosomal accumulation of heparan sulfate is detected in the microglial cells but not in cortical neurons of *HGSNAT-Geo* mice. Forty  $\mu\text{m}$ -thick sagittal brain sections of 4 MO WT and *HGSNAT-Geo* mice were stained with anti-HS and anti-LAMP-1 antibodies and either antibody against neuronal marker NeuN or microglial marker, isolectin B4 (ILB4). Somatosensory cortex of WT mouse does not show co-localization of HS (red) and LAMP-1 (blue) staining while that of *HGSNAT-Geo* mouse contains multiple cells with lysosomal accumulation of HS marked by arrowheads. These cells are negative for neuronal marker, NeuN, but positive for the marker of activated microglia, ILB4.

C) Levels of  $\text{G}_{\text{M}3}$  and  $\text{G}_{\text{M}2}$  gangliosides are increased in the total brain extracts of 4 MO *HGSNAT-Geo* mice as compared to their WT siblings. Total lipids from brain tissue homogenates were extracted with chloroform/methanol 1:1 mixture and analyzed by tandem mass spectroscopy.

D) Accumulation of gangliosides in cortical neurons of *HGSNAT-Geo* mice. Forty  $\mu\text{m}$ -thick sagittal brain sections of 8 MO WT and *HGSNAT-Geo* mice were stained with anti- $\text{G}_{\text{M}2}$  antibodies and either microglial marker, isolectin B4 or antibodies against neuronal marker NeuN,  $\text{G}_{\text{M}3}$  ganglioside, LAMP-1 and mitochondrial marker, cytochrome c oxidase subunit 4 (Cox4). Slides were studied on a Zeiss LSM510 inverted confocal microscope.

**Figure 6. Brain tissues of *Hgsnat-Geo* mice show impaired autophagy and blocked lysosomal proteolysis.**

**A)** Increased levels of LC3-II were detected in the brain tissues of *Hgsnat-Geo* (**H-G**) mice at the age of 6 and 10 months but not at the age of 4 months by the Western blot. Total mouse brains were homogenized in 250 mM sucrose buffer and after removal of nuclei by proteins were solubilized with 1% Triton X-100. Protein extracts were analyzed by Western blotting using antibodies specific for mouse LC3 and  $\beta$ -tubulin as a loading control. Panel shows representative data of 3 independent experiments. Inset graph shows ratios (means and S.D.) of signal intensities for LC3-II and LC3-I estimated with ImageQuant software. \*  $p < 0.05$  in paired two-tailed t-test.

**B)** LC3 staining was present in the cytoplasm of MEC neurons of 10 MO but not of 4 MO *Hgsnat-Geo* mice.

**C)** Signs of impaired lysosomal proteolysis and ER stress in the neurons of *Hgsnat-Geo* mice. SCMAS-positive aggregates, O-GlcNAc-modified proteins and increased staining for ubiquitin were detected in MEC neurons of 10 MO *Hgsnat-Geo* mice. The scale bars in the low power images are 100  $\mu\text{m}$ . The scale bars in the inserts are 30  $\mu\text{m}$ .

**Figure 7. Partial impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation system in the brains of *Hgsnat-Geo* mice**

**(A)** Activity of succinate: CoQ reductase (SQR, complex II) and cytochrome c oxidase (COX, complex IV) in isolated brain mitochondria of *Hgsnat-Geo* mice are reduced as compared with age-matching WT controls. Total content of coenzyme Q10 in brain homogenate of *Hgsnat-Geo* mice is reduced as compared with WT controls. The data show means ( $\pm$ S.D.) of individual measurements. Three mice were analyzed for each age and each genotype. \*  $p < 0.05$  in unpaired two-tailed t-test.

**(B)** Correlation between the age and activities of succinate: CoQ reductase (SQR), succinate: cytochrome c reductase (SCCR), citrate synthase (CS), and total coenzyme Q10 content in the brain tissues of *Hgsnat-Geo* and WT mice was analyzed by the linear regression method. For all parameters in the tissues of *Hgsnat-Geo* but not of WT mice the slopes of linear regression lines showed a significant deviation from zero ( $p < 0.05$ ).

**Figure 8. Brain inflammation in *Hgsnat-Geo* mice.**

**A)** Total brain tissues of *Hgsnat-Geo* mice show progressively increased expression of inflammation markers, MIP1 $\alpha$  (CCL3) and TNF $\alpha$  similar to those in MPS IIIA, but lower than those in MPS IIIB mouse models. Total RNA was isolated from whole mouse brain, reverse-transcribed to cDNA and quantification of cytokines was performed by RT-qPCR. The data show ratios of the cytokine levels in *Hgsnat-Geo* mice and those in WT controls (both normalized for the content of *RPL32* mRNA). Data show mean values ( $\pm$ SD). Three mice were analyzed for each age, sex and genotype. Two-way repeated measurements ANOVA was used to test differences between the mouse groups: significant differences between the mean values in Bonferroni post-test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ ) are shown.

**B)** Increased number of activated microglial cells in brain cortex of *Hgsnat-Geo*  $\mu\text{m}$ -thick sagittal brain sections of WT and *HGSNAT-Geo* mice were stained with HPR-conjugated microglial marker isolectin B4/DAB and counter-stained with haematoxylin. The total number of microglial cells was counted for 3 adjacent sections of somatosensory cortex. Data



show mean values ( $\pm$ SD). Two mice were analyzed for each age, sex and genotype. \*\*  $p < 0.001$  in unpaired two-tailed t-test.

**Figure 9. Proposed mechanism underlying brain disease in *Hgsnat-Geo* mice.**

The disease starts with accumulation of HS and HS-derived oligosaccharides in microglial cells (1). Through their release by exocytosis of lysosomes and action on TLR receptors of microglia cells these materials induce general inflammation reactions in the brain (2), including the release of multifunctional cytokines such as TNF $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  (3). The cytokines together with ROS cause mitochondrial damage (4) eventually leading to autophagy block (5), and secondary storage of gangliosides and missfolded proteins (6) triggering neuronal death in critical areas.

**Supporting materials:**

**Figure S1.** No bone deformation was detected by X-ray analysis of *Hgsnat-Geo* mice. Image shows representative radiographs of 2 MO male *Hgsnat-Geo* (A) and WT (B) mice taken with Faxitron MX2 instrument. Four mice were analyzed for each genotype.

**Figure S2.** No significant difference was observed in accelerating Rotarod performance between 8 MO WT and mice.

Mice were placed on a rubber-covered rod (3.5 cm in diameter) rotating at 4 rpm. Mice were left for 3 min for adaptation and then the rotation speed was gradually increased from 4 to 40 rpm over the course of 5 min and the latency to fall (in seconds) recorded. The results are shown as means ( $\pm$ SD) of 9 tests performed during 3 consecutive days (3 tests per day). Four mice were studied for each sex and genotype.

**Figure S3.** Representative dissection of 12 MO *Hgsnat-Geo* mouse showing signs of urinary retention and a loss of abdominal fat. Both features are not detectable in the age-matching WT mouse.

**Figure S4.** Profound lysosomal storage in liver of *Hgsnat-Geo* mice was detected at the optical (A-D) and ultrastructural (E-H) levels.

(A) Survey of liver parenchyma of 12 MO *Hgsnat-Geo* mice showing microvacuolization in hepatocytes mainly in the intermediate zone and increased cellularity in liver sinusoids. Insert shows a detailed view of microvacuolization in the cytoplasm of hepatocytes and a Kupffer cell showing transformation into a foam cell. H&E stain. Bar represents 200  $\mu$ m, bar in the insert, 30  $\mu$ m.

(B) Immunostaining for CathD reveals expanded lysosomal system in hepatocytes and in Kupffer cells in the liver of 12 MO *Hgsnat-Geo* mice, indicative of lysosomal storage. Bar represents 50  $\mu$ m.

(C, D) Storage within the population of Kupffer cells and their early activation were detected in *Hgsnat-GeoHgsnat-Geo* mice (C) as compared to age matching WT mice (D). Individual Kupffer cells display a storage phenotype with rounded vacuolated cytoplasm (C, insert). Kupffer cells in WT mice are always slim, stellate or needle-shaped (D, insert). Bars represent 200  $\mu$ m, bars in inserts, 30  $\mu$ m.

(E) Intensive lysosomal storage of soluble substances in the cytoplasm of a hepatocyte contrasting with rarely detectable storage vacuoles in a Kupffer cell in the sinusoid of 5 MO *Hgsnat-Geo* mice.

(F) Higher magnification of hepatocyte cytoplasm with accumulation of vacuoles surrounded by a single limiting membrane, either electronlucent or with a sparse fine content. Structures resembling autophagic vacuoles (marked by arrows) were occasionally detected.

(G, H) Ultrastructural pattern characteristic for lysosomal storage of GAG was clearly detectable at 12 months in Kupffer cells (G) and in perisinusoidal Ito cells also containing droplets of neutral lipids in their cytoplasm (H). Bars represent 1  $\mu$ m.

**Figure S5.** Widespread lysosomal storage in epithelial and mesenchymal cells in *Hgsnat-Geo* mice detected by CathD immunostaining (A-H) or electron microscopy (I-L).

Lysosomal storage was massive in splenic sinus endothelium (A) and less pronounced in bronchial respiratory epithelium (C), as well as in distal tubules, collecting ducts and glomeruli of renal cortex (E) of 12 MO *Hgsnat-Geo* mice. Tissues of age-matching WT animals (B, D) do not show these features. (G) A thin wall of distended urinary bladder of a 12 MO *Hgsnat-Geo* mouse with a sparse presence in lamina and muscularis propria and adventitia of cells with storage materials. (H) Urinary bladder of age-matching WT animal has normal wall thickness and structure. Details of cells containing storage materials and their control counterparts are shown in inserts.

Electronlucent vacuoles surrounded by single membranes indicative of lysosomal storage of soluble material were detected in splenic sinus endothelium (I), skin vascular endothelial cells (J), perivascular pericytes (K) and fibroblasts (L) of 12 MO *Hgsnat-Geo* mice.

Bars in A, B and Insert C represent 30  $\mu$ m, bars in C-F and Insert G, 100 $\mu$ m, bars in G and H, 200  $\mu$ m. Bars in I and L represent 1  $\mu$ m, bars in J and K, 2  $\mu$ m.

**Figure S6.** Purkinje cell loss accentuated in the anterior cerebellar lobe of *Hgsnat-Geo* mouse at the age of 12 months.

(A-D) Calbindin immunostaining in the cerebellar cortex. Staining for Purkinje cells is almost absent in lobules I-III (A) when compared to remaining calbindin staining in lobules IX and X (B). Higher magnification of cerebellar cortex shows an exceptional presence of weakly positive Purkinje cells (marked by arrowheads) in the lobule III (C) and a substantially preserved Purkinje cell layer in the lobule X (D). Bars in A and B represent 200  $\mu$ m, bars in C and D, 100  $\mu$ m. (E-F) Details of the Purkinje cell layer, H&E staining. Purkinje cells are largely absent in the lobule III (E) in comparison to almost contiguous monolayer of Purkinje cells in the lobule X (F). Degenerating neurons with a shrunken condensed cytoplasm and nuclei are marked by arrowheads. Bars represent 50  $\mu$ m.

**Figure S7.** Activated microglial cells featuring storage were detected in somatosensory cortex of 4 MO and 10 MO *Hgsnat-Geo* mice by staining with antibodies against CD68. The scale bars in the low power images are 100  $\mu$ m. The scale bars in the inserts are 30  $\mu$ m.

**Figure S8.** Progressive accumulation of GM<sub>2</sub> ganglioside was detected in the hippocampus and cerebellum of *Hgsnat-Geo* mice. Bars represent 20  $\mu$ m (cerebellum) and 5  $\mu$ m (hippocampus).

**Figure S9.** Increase of LC3-II in liver tissues of *Hgsnat-Geo* mice suggestive of impaired autophagy.

**Figure S10.** Accumulation of brain protein markers of neurodegeneration associated with dementia: lysozyme, beta amyloid (A-beta), and Ptau kinase Gsk3 $\beta$  in MEC and

phosphorylated tau (PHF-tau Thr181) in dentate gyrus of 10 MO *Hgsnat-Geo* mice. The scale bars in the low power images are 100  $\mu$ m. The scale bars in the inserts are 30  $\mu$ m.

**Supplemental video 1.** Video recording of 8 MO male *Hgsnat-Geo* mouse showing loss of coordination.

**Supplemental video 2.** Video recordings of 8 MO female WT (a) and *Hgsnat-Geo* (b) mice in the open field test. *Hgsnat-Geo* mouse shows signs of hyperactivity and reduced anxiety compared to WT mouse.

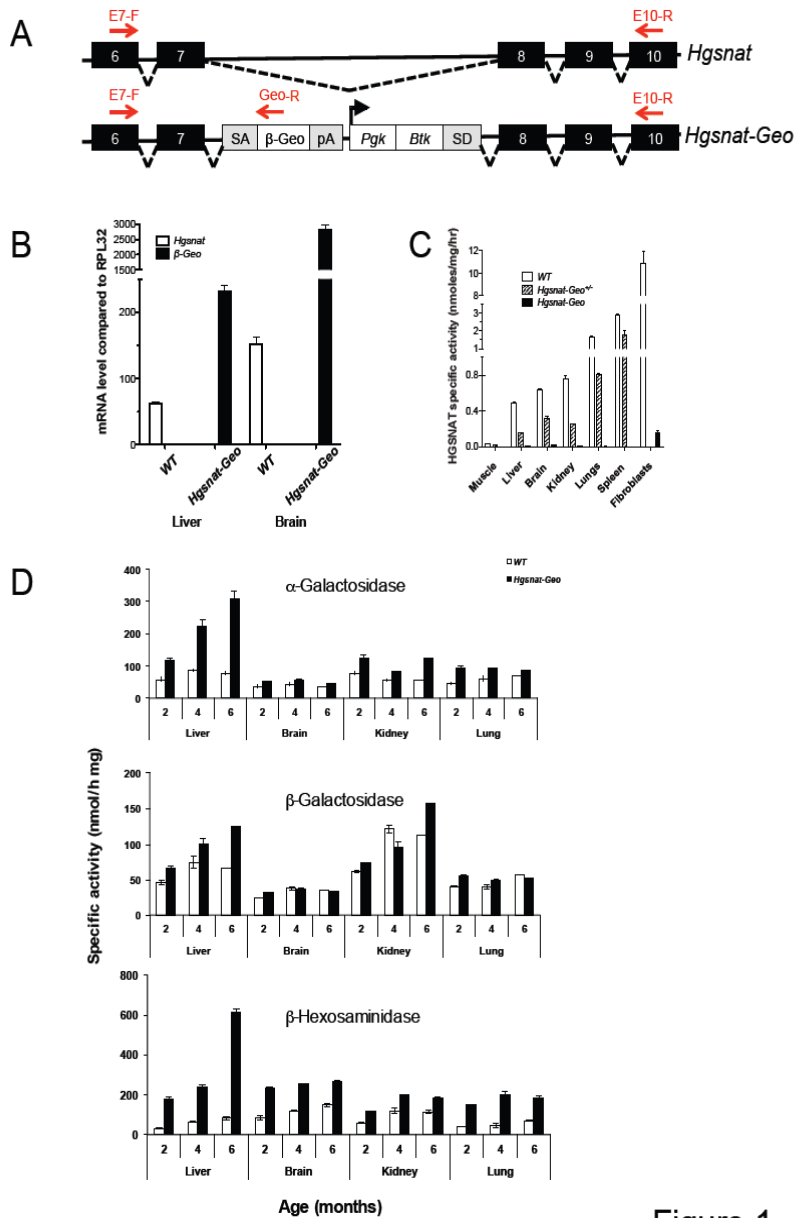
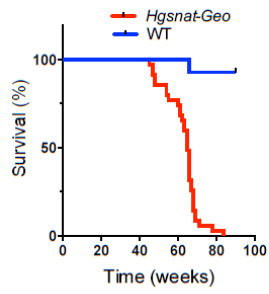
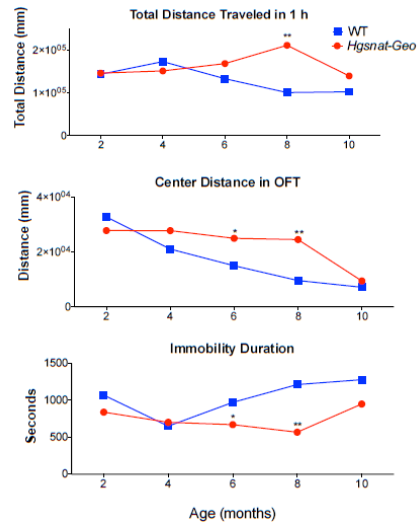


Figure 1

A



B



C

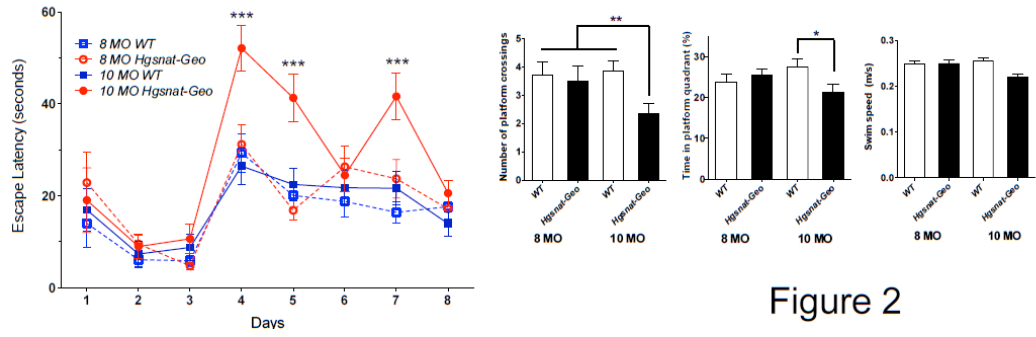


Figure 2

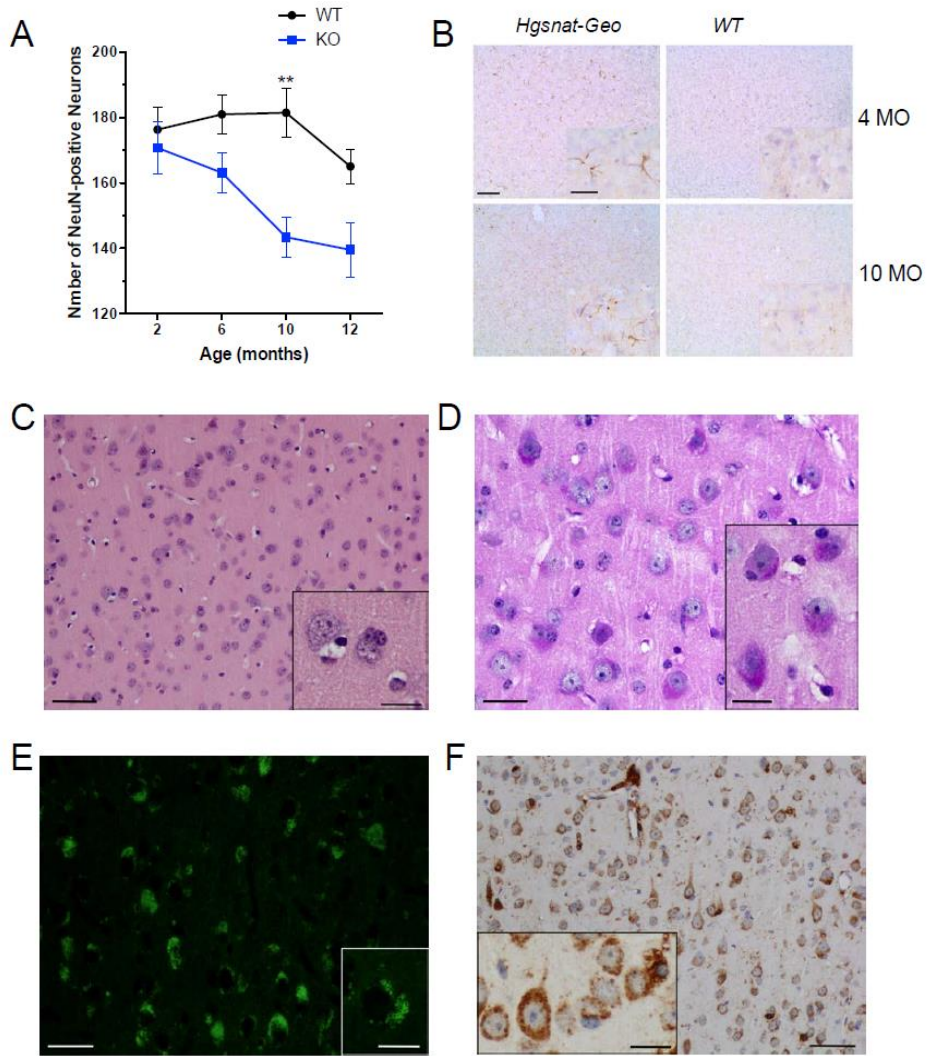
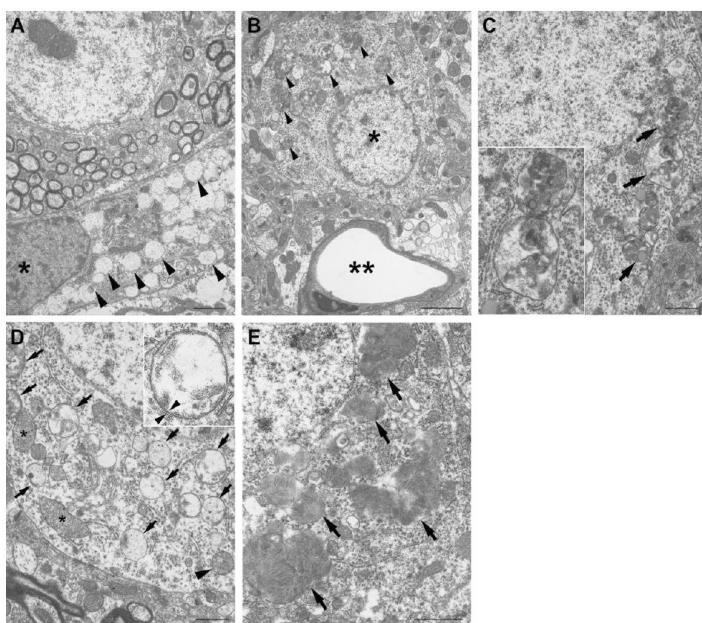
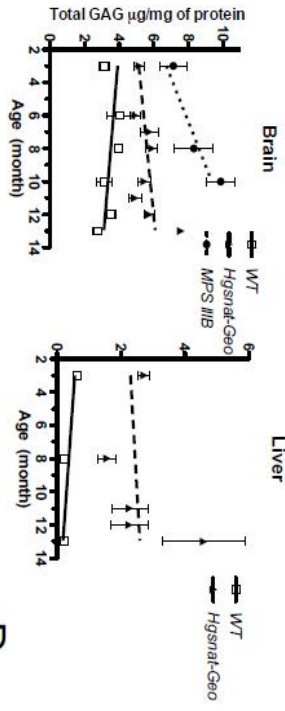


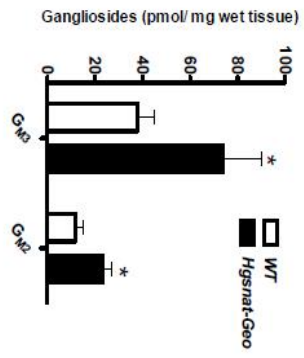
Figure 3



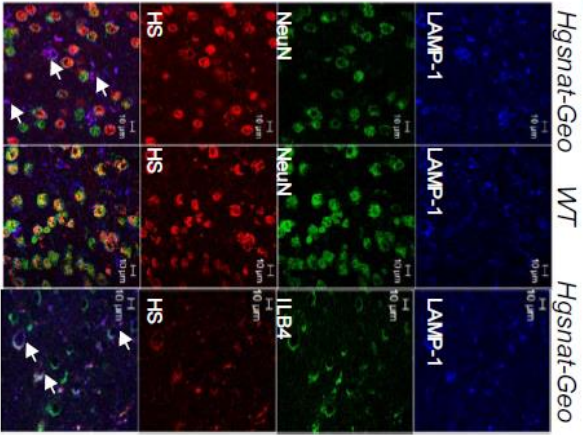
A



C



B



D

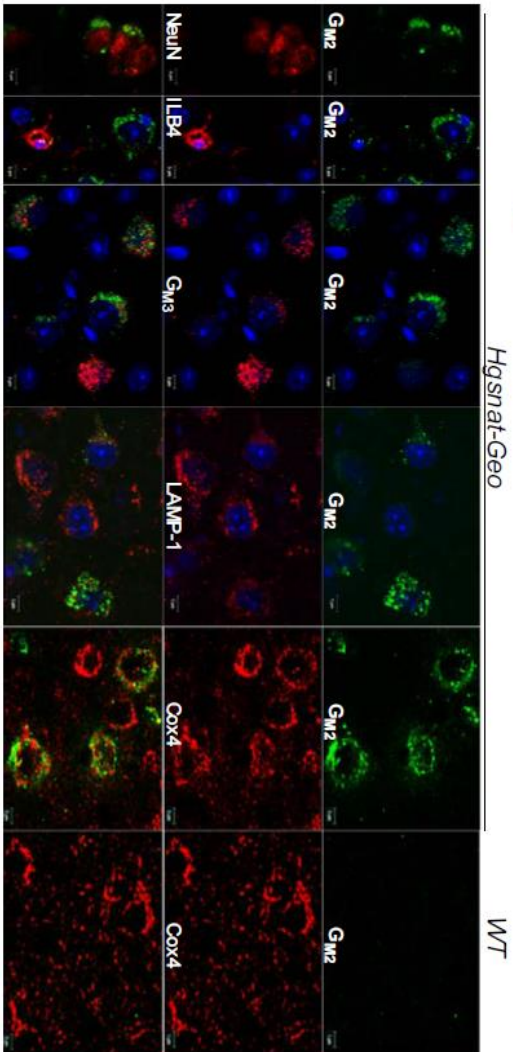
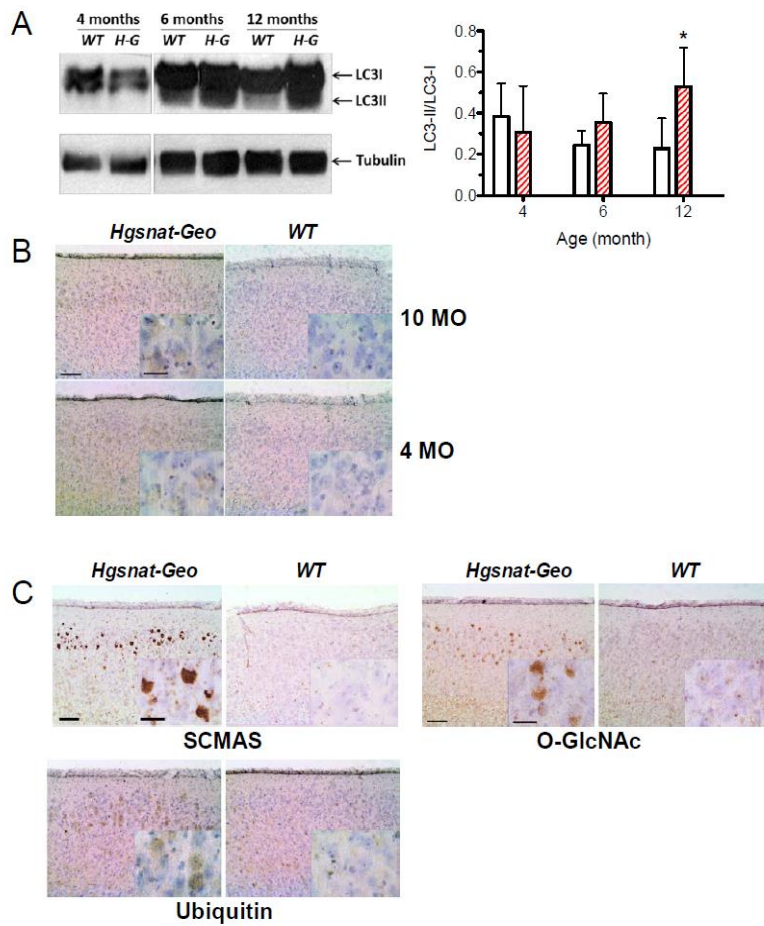
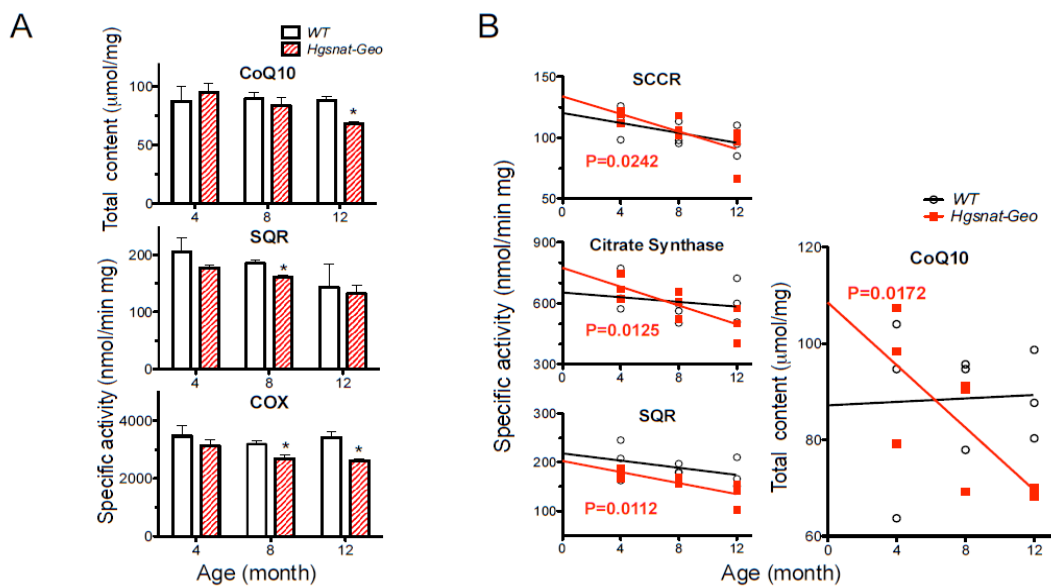


Figure 5



**Figure 6**



**Figure 7**

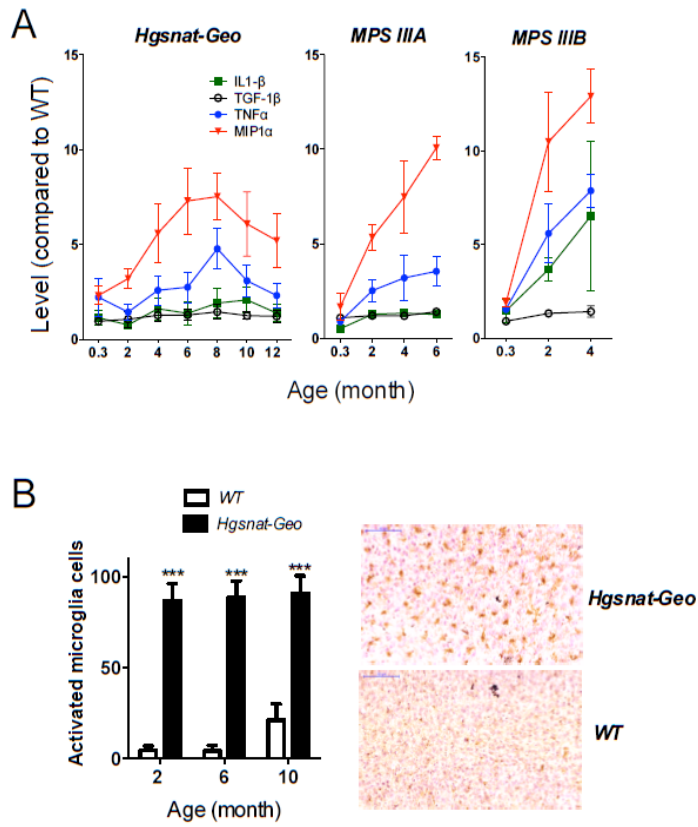


Figure 8

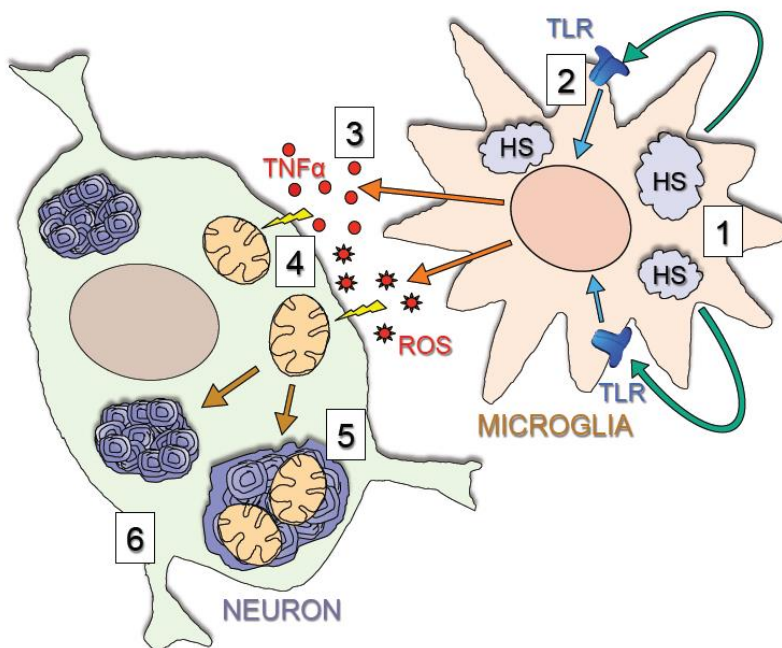


Figure 9



## 9.6 Richtrová et al., Gene. – podáno

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

Eva Richtrová<sup>1</sup>, Lenka Mrázová<sup>1</sup>, Ondřej Lukšan<sup>2</sup>, Larisa Stolnaya<sup>1</sup>, Jakub Minks<sup>1</sup>, Lenka Dvořáková<sup>1</sup>, Milan Jirsa<sup>2</sup>, Martin Hřebíček<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine and University Hospital, Prague

<sup>2</sup>Laboratory of Experimental Hepatology, Institute of Clinical and Experimental Medicine, Prague

#### **Corresponding author**

Martin Hřebíček, Institute of Inherited Metabolic Disorders, Charles University, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine and University Hospital, Ke Karlovu 2, Prague 120 08, Czech Republic, [mhreb@lf1.cuni.cz](mailto:mhreb@lf1.cuni.cz), Tel.: +420224967208, Fax: +420224967212

#### **Abstract**

The deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (N-acetyltransferase), the lysosomal membrane enzyme involved in the catabolism of heparan sulfate, leads in humans to a lysosomal storage disorder, Sanfilippo disease type IIIC (mucopolysaccharidosis type IIIC, MPS IIIC). In this report we present a characterization of the promoter region of the gene encoding the N-acetyltransferase, *HGSNAT*, which is located in the pericentromeric region of chromosome 8. Two potential in-frame initiation codons have been identified previously (Hrebicek, Mrazova et al. 2006). Using 5'-RACE, we found two main transcription start sites (TSS) in the GC rich 5' region upstream of exon 1 of *HGSNAT* in position -1 and -15 from the downstream ATG (1<sup>st</sup>ATG).. Transcripts initiating from both main TSSs thus contain only the 1<sup>st</sup>ATG. The 1054 bp promoter fragment containing the sequence upstream of the 1<sup>st</sup>ATG (-20/-1073) drove the expression of the luciferase reporter in HepG2 cells. Multiple predicted Sp-1 binding sites were found in the region (-101/+50). Targeted mutagenesis of two of the Sp1 sites resulted in a drop of reporter activity, showing the importance of the sites for upregulating the promoter. The binding of Sp1 to the region was confirmed by chromatin immunoprecipitation (ChIP). Bisulfite sequencing showed that the CpG island in the region was unmethylated. TATA-less *HGSNAT* promoter with its

unmethylated CpG island, and multiple Sp1 sites has thus the structure of a housekeeping promoter, which corresponds well with the housekeeping character of N-acetyltransferase's function. We have sequenced the *HGSNAT* promoter region in 23 MPS IIIC patients and found no variations, except for a common polymorphism rs453300 and an unknown variation g.4875G>A. The expression of the reporter driven by promoter fragments carrying these variations was similar to the expression from the reference fragment.

**Keywords:**

MPS IIIC, *HGSNAT*, promoter, Sp-1, TATA-less, housekeeping gene

**Introduction**

The *HGSNAT* gene encodes glucosaminide N-acetyltransferase (N-acetyltransferase), the enzyme deficient in patients with mucopolysaccharidosis III C (MPS IIIC)(Klein, van de Kamp et al. 1981). MPS III C is a lysosomal storage disorder and one of the four subtypes of Sanfilippo syndrome caused by four different heritable deficiencies of enzymes involved in lysosomal catabolism of glycosaminoglycan heparan sulfate. Unlike enzymes deficient in other MPS III subtypes, N-acetyltransferase is not a hydrolase. It resides in the lysosomal membrane and catalyzes the transfer of acetyl moiety from cytosolic acetyl-coenzyme across the membrane into lysosomal lumen and its subsequent reaction with glucosaminide moiety of heparan-sulfate-derived oligosaccharides (Bame and Rome 1986; Bame and Rome 1986). This synthetic step, unusual within the lysosome, is necessary for subsequent hydrolysis of N-acetylglucosamine moiety by N-acetylglucosaminidase.

Patients with MPS IIIC have clinical symptoms very similar from other forms of MPS III, while the overall course of the disease may be more protracted in MPS IIIC. The majority of patients develop severe cerebral symptoms with psycho-motor regression in the childhood, later followed by increased spasticity, seizures, and death in late adolescence or early adulthood. The patients have usually only mild visceromegaly. In a small subset of MPS IIIC patients, who develop the first symptoms in adulthood, neurodegenerative symptoms dominate the clinical picture (Ruijter, Valstar et al. 2008).

The majority of genes encoding lysosomal proteins have TATA-less promoters with unmethylated CpG islands, which are traditionally considered to be associated more often with

constitutive rather than regulated gene expression. Recently, it was shown that transcription of most lysosomal genes is coordinated under the control of transcription factor EB (TFEB); its translocation from cytoplasm to the nucleus results in increased expression of lysosomal proteins (Sardiello, Palmieri et al. 2009). TFEB overexpression leads to an increased lysosomal biogenesis and it plays an important role in the regulation of autophagy. Serine-phosphorylation of TFEB by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism regulates its activity. The whole regulatory pathway thus orchestrates activation of both autophagy and the lysosomal system (Settembre, Di Malta et al. 2011).

The gene encoding N-acetyltransferase, *HGSNAT*, is located in the pericentromeric region of chromosome 8 and has 18 exons (Hrebicek, Mrazova et al. 2006). It encodes a polypeptide with 11 predicted transmembrane domains that has multiple vertebrate orthologs and shares similarity with a conserved family of bacterial proteins COG4299 (uncharacterized protein family conserved in bacteria) (Entrez Gene GeneID 138050). All 145 members of this family with the exception of *HGSNAT* are bacterial membrane proteins; there is no other eukaryotic member but *HGSNAT*.

In this study we show that the 1054 bp fragment upstream of the first exon drives expression of a reporter gene. We have also identified regions within the promoter that contain potential enhancers of transcription by deletion analysis. We have shown that two Sp1 binding sites in the -101/-20 region (from the 1<sup>st</sup> ATG) are required for the full promoter's activity. We also show that there are multiple transcription sites and an unmethylated CpG island encompassing transcription start sites. We have also examined the sequence of the promoter and coding region in 23 *HGSNAT*- deficient patients from different populations and in controls, but we did not find any variations that change reporter activity.

## **Methods**

### *Patients*

The sequence of *HGSNAT* promoter and coding regions was analyzed in 23 MPS IIIC patients from Czech Republic (5), Belorussia (1), Turkey (4), United Kingdom (2), USA (3), Germany (6), and Greece (2). The samples were received for diagnostic purposes and patients were enrolled for the study on the basis of written informed consent. The study was approved by the local ethics committee.

### *Generation of reporter gene constructs*

PCR products containing the sequence of predicted *HGSNAT* promoter were amplified using primers with KpnI and XhoI restriction enzyme sites (forward and reverse primers, respectively). The length of the promoter regions is depicted in Fig.1. If not stated otherwise, all sequences in the promoter are numbered from the 1<sup>st</sup> ATG. Primer sequences were derived from genomic sequence of chromosome 8 (GenBank accession no. NG\_009552.1). Oligonucleotide primers and annealing temperatures are listed in Table 1. The fragments were gel-purified and directly cloned in the TA cloning vector pCR<sup>®</sup>4 or pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> (Life Technologies, Foster City, CA, USA). These constructs were verified by sequencing using ABIprism<sup>®</sup> A3100 automated sequencer. Clones containing the inserts were double digested with KpnI and XhoI (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), the released inserts were cloned in both sense and antisense orientations into pGL4.16 (luc2CP/Hygro) vector (Promega, Madison, WI, USA) in the polylinker site situated upstream of the firefly luciferase reporter gene, generating pGL4 -20/-1305, pGL4 -101/-1305, pGL4 +50/-1305 and -20/-2905 constructs, respectively. The pGL4 -61/-1305 construct was created by site-directed mutagenesis using QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The sequences of all constructs were verified by sequencing.

### *Generation of serial deletions in HGSNAT promoter and mutagenesis*

Serial deletions and mutations in the *HGSNAT* promoter-containing construct pGL4 -20/-1305 were created by site-directed mutagenesis using QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies). Primers listed in Table 2 were used to generate mutant constructs with different 5' end deletions (pGL4 -20/-1073, pGL4 -20/-716, pGL4 -20/-347 and pGL4 -20/-186) and mutations (rs453300, g.4875G>A, mut CTG, mut Sp1 A-D) according to the instructions of the manufacturer. All deletions and mutations were confirmed by DNA sequencing.

### *Cell culture, transfection and reporter gene analysis*

HepG2 (human hepatoblastoma) cells cultured in Opti-MEM<sup>®</sup> (Agilent Technologies) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum. The cells were grown in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A total of 5 x 10<sup>4</sup> HepG2 cells per well were seeded into a 24-well culture plate one day prior to transfection. 500 ng of each construct was transfected into HepG2 cells

using the Tfx<sup>TM</sup> – 20 and FuGene<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Promega). The empty pGL4 vector was transfected simultaneously. The pRL-TK vector (Promega) harboring the *Renilla* luciferase gene was co-transfected as an internal control to normalize the transfection efficiency. Each construct was transfected in triplicate and each transfection experiment was repeated independently at least three times. After 48 hours, cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and lysed with 100 µl passive lysis buffer (Promega). The luciferase reporter gene activity was assayed using the Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega). The intensity of chemiluminescence in the supernatant was measured using a luminometer (Berthold, Technologies, Bad Wildbad, Germany).

#### *Bisulfite sequencing*

The methylation status of the CpG island overlapping the *HGSNAT* promoter was studied using bisulfite sequencing. Genomic DNA isolated from three control individuals was modified by bisulfite and served as a template for amplification. PCR primers designed to anneal to the modified DNA are listed in Table 2. PCR products were gel-purified and sequenced.

#### *Identification of the transcription initiation sites*

Transcription initiation sites of the gene were identified by 5'RACE technique that amplifies products only from capped mRNAs. 5'RACE was carried out using GeneRacer<sup>TM</sup> Kit and FirstChoice<sup>®</sup> RLM-RACE Kit (Life Technologies). FirstChoice<sup>®</sup> Human Placenta Total RNA (Life Technologies) was used as a template. The RT-PCR was performed with 5'RACE universal primer and gene-specific reverse primer 5'-ccagaacctgaaacaagcagtgataaca-3', located in junction of exon 2 and exon 3. Obtained cDNA fragments were gel purified (Promega) and directly sequenced or subsequently cloned into TA cloning vector pCR<sup>®</sup>4 - TOPO<sup>®</sup> (Life Technologies). For sequencing was used ABIprism<sup>®</sup> A3100 automated sequencer.

#### *Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay*

HepG2 (human hepatoblastoma) cells were transfected by pN3-Sp1 (a kind gift from Prof. Guntram Suske, University of Marburg, Germany). ChIP assay was performed using ChIP Kit (Abcam, Cambridge, UK) according to the instructions of the manufacturer. Briefly, collected cells were fixed with 1% formaldehyde for 10 min. at RT and washed with ice-cold PBS.

Cells were resuspended in a lysis buffer and sonicated on E210 Focused-ultrasonicator (Covaris, Woburn, MA, USA) to shear DNA. Chromatin was incubated with anti-Sp1 antibody (Abcam) overnight at 4°C as well as Histone H3 antibody supplied in kit and used as positive control. The immunocomplex was collected by protein A/G agarose beads, washed and eluted. Purified DNA was subjected to PCR amplification with primers specific to the *HGSNAT* promoter containing putative binding sites for Sp1 (Tab. 2). As a positive ChIP control, amplification with primers flanking a part of the *SLC22A18* promoter was used (Ali, Bajaj et al. 2009) (Tab. 2).

#### *Bioinformatics - Identification of putative transcription factor binding sites*

In order to identify the putative transcription factor binding sites in *HGSNAT* promoter were used TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), MatInspector program (<http://www.genomatix.de/index.html>) and Alibaba2 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html#alibaba2>). For additional searches was used matrix-scan program from RSAT -tools (Turatsinze, Thomas-Chollier et al. 2008) (<http://rsat.ulb.ac.be>). FIMO tool from the MEME suite (Bailey, Boden et al. 2009) was also used for searches and determination of p-values.

Search for *HGSNAT* transcripts and ESTs and other database searches were performed using GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and USCS Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>).

## **Results**

#### *Luciferase reporter assay*

All constructs carrying upstream ATG or downstream ATG produced significantly higher levels of reporter activity than the negative control (pGL4 vector). The construct pGL4 -20/-1305 exhibited markedly higher activity of luciferase than the construct pGL4 -101/-1305. The luciferase activity from the construct pGL4 -20/-2905 was at the similar level as pGL4 -20/-1305 and the activity from the other constructs pGL4 +50/-1305 and -61/-1305 was lower than from pGL4 -20/-1305 (Fig. 1). These results show that the region between nucleotides -20 and -1305 is important for the expression of *HGSNAT* gene.

The constructs pGL4 -20/-1305 cloned in the antisense orientation exhibited higher luciferase activity than the negative control, the pGL4 vector. However, the construct containing a larger

portion of 5' sequence cloned in the anti-sense orientation, the pGL4 -20/-2905, produced luciferase activity comparable to the negative control (pGL4 vector) (Fig. 1).

To map regions regulating the activity of the promoter we generated mutant constructs with serial 5' end deletions. The deletion construct pGL4 -20/-1073 displayed levels of luciferase activity comparable to the construct containing the whole predicted *HGSNAT* promoter (pGL4 -20/-1305). Significant drop in reporter activity was observed in constructs pGL4 -20/-716, pGL4 -20/-347 and pGL4 -20/-186; this suggests that in the region from -716 to -1073 is located a positive regulator of transcription (Fig. 2).

#### *5'RACE and bisulfite sequencing*

5'RACE identified two transcription initiation sites in the promoter region, corresponding to the positions -1, -15 bp upstream of the 1<sup>st</sup>ATG. The CpG island encompassing these transcription initiation sites was found to be unmethylated.

#### *Analysis of transcription factor binding sites*

Bioinformatic evaluation of the -20/-1305 sequence revealed consensus binding sites for a number transcription factors. Database search revealed no consensus TATA or CAAT box sequence. Highest scoring (p-value < 10<sup>-6</sup>) matches included multiple Sp-1, AP-1, and AP-2 binding sites, and single CREB, NRSF, and EGR sites. We have also found two potential lower-scoring (p-value > 10<sup>-5</sup>) CLEAR motifs 737 and 867 upstream of the 1<sup>st</sup>ATG. There are six putative binding sites for Sp1 transcription factor in the core promoter (Fig. 3). We wanted to determine the influence of these sites on the promoter activity. As no increase in reporter activity was observed when the region -20 to +50 was included the reporter construct, we have concluded that predicted Sp1-E and Sp1-F sites (Fig. 3) located in the region do not have a major effect on the promoter activity, and excluded them from further analysis. The other predicted Sp1 binding sites were mutated and the reporter activity was measured. Mutation of Sp1-A and Sp1-D sites resulted in reduction of the reporter activity when compared to the pGL4 -20/-1305 (Fig. 4A), showing that these sites are important for the regulation of *HGSNAT* promoter.

We also confirmed presence of binding Sp1 in the -20/-101 region by chromatin immunoprecipitation with anti-Sp1 antibody (Fig. 5). Total INPUTDNA was used as a positive control for PCR amplification. As an additional positive control was used anti-

Histone H3 antibody. PCR product of expected size (258 bp) was present in the INPUT, ChIP with anti-Sp1 antibody, and anti-Histone H3 antibody lanes. The negative control, ChIP without anti-Sp1, showed no amplification. Amplification of the 180 bp PCR product from the promoter region of the *SLC22A18* gene served as a Sp1 positive control (Fig. 5). The presence of confirmed Sp1 binding sites in the *SLC22A18* promoter was reported by Ali et al. (2009) (Ali, Bajaj et al. 2009).

#### *Analysis of the promoter region in MPSIIIC patients*

We have also analyzed the sequence of the *HGSNAT* promoter in 23 *HGSNAT*- deficient patients from different populations and in controls. We have found a common polymorphism rs4523300 in three patients and a variation g.4875G>A in one patient. We have measured luciferase activity of constructs pGL4 -20/-1305 with polymorphism rs4523300 and the g.4875G>A, but the reporter activity was comparable to that of the wild-type sequence (Fig. 4B).

#### **Discussion**

*HGSNAT* sequences in databases (GenBank accession no. NG\_009552.1) and a number of ESTs (not shown) contain two ATGs at the 5' end of the transcript, both of which can be potentially used as initiation codons. We have employed 5' RACE to identify the 5' of the transcript and identified two transcription initiation sites. Both sites were downstream of the upstream ATG, suggesting that the transcripts carrying only the downstream ATG (1<sup>st</sup> ATG) are predominant. Previously (Hrebicek, Mrazova et al. 2006), we were able to amplify RT-PCR products with primers annealing to the sequence upstream of this region, suggesting that there are multiple weaker transcription initiation sites. These results were not confirmed by 5'RACE. The irregular upstream transcripts may be promoter upstream transcripts (PROMPTs), which initiate in the 5' prime flanking promoter region by the action RNA polymerase III in areas with open chromatin structure (Preker, Nielsen et al. 2008). In conclusion, the -1, -15 bp sites are the major transcription initiation sites and only a minority, if any, of *HGSNAT* transcripts initiate further upstream.

The sequence in the region -101 to -20 is apparently important for achieving the full transcriptional activity; the reporter activity from the pGL4 -20/-1305 was significantly higher than that from pGL4 -101/-1305, which did not contain this critical region. We did not



observe an increase of luciferase activity from pGL4 +50/-1305, pGL4 -61/-1305 and pGL4 -20/-2905. As the last construct, which contains additional 1.6 kb of the 5' sequence, did not lead to a measurable increase in reporter activity, it is unlikely that there are any regulatory elements in the region (-1305/-2905).

Analysis of promoter deletion constructs identified a region enhancing the promoter's activity at -1073/-716. The 1054 bp region between -20 and -1073 contains key regulatory elements for transcription of *HGSNAT* gene.

Interestingly, the promoter sequence was in vitro able to drive transcription bidirectionally, as the promoter constructs in the opposite orientation (pGL4 -20/-1305 and pGL4 +50/-1305) achieved moderate levels of luciferase activity. As there is no gene in opposite orientation immediately upstream of the *HGSNAT* gene, the *HGSNAT* promoter cannot be bidirectional. In the last decade it was shown that bidirectional initiation of transcription is common in eukaryotic promoters (Beck and Warren 1988). RNA polymerase II initiates transcription bidirectionally, RNA transcripts initiated from the sense strand elongate while the short transcripts initiated from the antisense strand are not elongated and are degraded by exosomes. Most promoters appear to display orientation preference (Wei, Pelechano et al. 2011). The factors governing the choice of the direction of transcription remains poorly understood (Orekhova and Rubtsov 2013). It could be governed by the nucleotide composition around the promoter region, chromatin modification or 3D structure of transcription. The recent studies including luciferase assays showed that non-coding transcripts occur close to the protein-coding genes and share the same promoter (Wei, Pelechano et al. 2011).

A dramatic decrease of activity at the level of pGL4 basic was observed from pGL4 -20/-2905 in the antisense orientation. It is probably caused by the enlargement of distance between the important promoter elements and the reporter gene. This suggests that the observed transcriptional activity in the opposite direction may be indeed due to the bidirectional initiation by the mechanisms described above.

The transcription initiation sites are flanked by an unmethylated CpG island. The promoter conforms to the blueprint of promoters of housekeeping genes (Zhu, He et al. 2008), as it does not contain a TATA-box, has multiple Sp-1 sites, and an unmethylated CpG island. Sp1 is a ubiquitous transcription factor and plays an important role in the regulation of TATA-less

promoters of many housekeeping genes (Brandeis, Frank et al. 1994); indeed, a point mutation affecting an Sp1 site of the TATA-less cystinosin (CNTS) gene promoter was shown to be causative (Cherqui, Kalatzis et al. 2001).

We have found two potential elements compatible with CLEAR consensus sequence in *HGSNAT* promoter, which had higher p-values ( $2.7 - 3.5 \times 10^{-4}$ ), indicating that the motive may occur by chance in a similar background sequence approximately every 2.7 -3.7 kb. While CLEAR motifs (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation), which bind transcriptional factor TFEB (Sardiello, Palmieri et al. 2009), are enriched in promoters of lysosomal genes and apparently are responsible for coordinated transcriptional behavior of these genes, they are usually found within the region 300 bp upstream and 100 bp downstream of transcription start site (TSS) (Palmieri, Impey et al. 2011). This makes the motives found 737 and 867 bp upstream of the 1<sup>st</sup>ATG in the *HGSNAT* promoter less likely to be true TFEB binding sites, although more distal CLEAR motifs were also found in promoters upregulated by TFEB.

Presence of two functionally important Sp-1 sites (Sp1-A and Sp1-D) in the region spanning from -101 to -20 was confirmed by the luciferase assay. Targeted mutations in these sites lead to a decrease of promoter activity. Mutations in the other two sites (Sp1-B and Sp1-D) lead to an increase of reporter activity. While the mutations introduced into Sp1 sites could potentially create a novel binding site for a transcription factor, no such sites were found bioinformatically. Sp1 can also function as a repressor (Zaid, Hodny et al. 2001), which is a possible explanation for the observed increase in the reporter activity. The binding of Sp1 to the region (-101 to -20) was verified by ChIP assay.

We did not find any variations modifying the promoter activity in the promoter regions of 23 *HGSNAT* deficient patients. While mutations changing the protein sequence, frameshifts and premature stops are much more frequent cause of the disease in lysosomal storage disorders, variations in the regulatory region can also be pathogenic (Cherqui, Kalatzis et al. 2001).

In conclusion, we have identified a 1054 bp region upstream of exon 1 of *HGSNAT* that drives the transcription of the gene. There are two major TSS sites, the gross majority of the transcripts contain only the downstream ATG initiation codon. Sp1 binding in *HGSNAT* promoter is critical for transcription initiation. TATA-less, with a GpG island, and multiple Sp1 sites, the *HGSNAT* promoter has all features of a housekeeping gene. While we did not

find any pathogenic or activity -modifying mutations in a small set of patients, they may be encountered in the future.

## Acknowledgments

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 and SVV2014/260022. The project also received institutional support from VZ MŠM ČR 0021620806.

## References

- Ali, A. M., V. Bajaj, et al. (2009). "Characterization of the human SLC22A18 gene promoter and its regulation by the transcription factor Sp1." Gene **429**(1-2): 37-43.
- Bailey, T. L., M. Boden, et al. (2009). "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching." Nucleic Acids Res **37**(Web Server issue): W202-208.
- Bame, K. J. and L. H. Rome (1986). "Acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for an active site histidine residue." J Biol Chem **261**(22): 10127-10132.
- Bame, K. J. and L. H. Rome (1986). "Genetic evidence for transmembrane acetylation by lysosomes." Science **233**(4768): 1087-1089.
- Beck, C. F. and R. A. Warren (1988). "Divergent promoters, a common form of gene organization." Microbiol Rev **52**(3): 318-326.
- Brandeis, M., D. Frank, et al. (1994). "Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation." Nature **371**(6496): 435-438.
- Hrebicek, M., L. Mrazova, et al. (2006). "Mutations in TMEM76\* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome)." Am J Hum Genet **79**(5): 807-819.
- Cherqui, S., V. Kalatzis, et al. (2001). "The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif." J Biol Chem **276**(16): 13314-13321.
- Klein, U., J. J. van de Kamp, et al. (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**(1): 55-59.
- Orekhova, A. S. and P. M. Rubtsov (2013). "Bidirectional promoters in the transcription of mammalian genomes." Biochemistry (Mosc) **78**(4): 335-341.
- Palmieri, M., S. Impey, et al. (2011). "Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways." Hum Mol Genet **20**(19): 3852-3866.
- Preker, P., J. Nielsen, et al. (2008). "RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters." Science **322**(5909): 1851-1854.
- Ruijter, G. J., M. J. Valstar, et al. (2008). "Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands." Mol Genet Metab **93**(2): 104-111.
- Sardiello, M., M. Palmieri, et al. (2009). "A gene network regulating lysosomal biogenesis and function." Science **325**(5939): 473-477.

Settembre, C., C. Di Malta, et al. (2011). "TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis." *Science* **332**(6036): 1429-1433.

Turatsinze, J. V., M. Thomas-Chollier, et al. (2008). "Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules." *Nat Protoc* **3**(10): 1578-1588.

Wei, W., V. Pelechano, et al. (2011). "Functional consequences of bidirectional promoters." *Trends Genet* **27**(7): 267-276.

Zaid, A., Z. Hodny, et al. (2001). "Sp1 acts as a repressor of the human adenine nucleotide translocase-2 (ANT2) promoter." *Eur J Biochem* **268**(21): 5497-5503.

Zhu, J., F. He, et al. (2008). "On the nature of human housekeeping genes." *Trends Genet* **24**(10): 481-484.

Table 1

Promoter region	Orientation	Forward primer	Reverse primer	Tm (°C)
(-20/-1305) <sup>1)</sup>	sense	5'- <u>GGTACC</u> TTCCCGAAACAGTGCCCCCTATC-3'	5'- <u>CTCGAG</u> GCCCTTGCCTGCCCGCTG-3'	67
(-20/-1305) <sup>1)</sup>	antisense	5'- <u>CTCGAG</u> TTCCCGAAACAGTGCCCCCTATC-3'	5'- <u>GGTACC</u> GCCCTTGCCTGCCCGCTG-3'	67
(-101/-1305) <sup>1)</sup>	sense	5'- <u>GGTACC</u> TTCCCGAAACAGTGCCCCCTATC-3'	5'- <u>CTCGAG</u> GTCA CGCCGCTGACTCAC-3'	67
(-101/-1305) <sup>1)</sup>	antisense	5'- <u>CTCGAG</u> TTCCCGAAACAGTGCCCCCTATC-3'	5'- <u>GGTACC</u> GTCA CGCCGCTGACTCAC-3'	67
(-61/-1305) <sup>2)</sup>	sense	5'-GCGGGCGTCCGCGCTCGAGGATATCAA-3'	5'-TTGATATCCTCGAGCGCGGACGCCCGC-3'	63
(+50/-1305) <sup>1)</sup>	sense	5'- <u>GGTACC</u> TTCCCGAAACAGTGCCCCCTATC-3'	5'- <u>CTCGAG</u> ACGGACGCGGCCAGCAGCA-3'	67
(+50/-1305) <sup>1)</sup>	antisense	5'- <u>CTCGAG</u> TTCCCGAAACAGTGCCCCCTATC-3'	5'- <u>GGTACC</u> ACGGACGCGGCCAGCAGCA-3'	67
(-20/-2905) <sup>1)</sup>	sense	5'- <u>GGTACC</u> TGACCCCTGCTGTGTGAACCAACCA-3'	5'- <u>CTCGAG</u> GCCCTTGCCTGCCCGCTG-3'	68
(-20/-2905) <sup>1)</sup>	antisense	5'- <u>CTCGAG</u> TGACCCCTGCTGTGTGAACCAACCA-3'	5'- <u>GGTACC</u> GCCCTTGCCTGCCCGCTG-3'	68

<sup>1)</sup> Underlined sequence is a non-hybridizing overhang

<sup>2)</sup> Promoter region was generated by site-directed mutagenesis

Table 2

Deletions and mutations	Forward primer	Reverse primer	Tm (°C)
(-20/-1073) <sup>1)</sup>	5'- <u>GCCTAACTGGCCGGTAC</u> CTGGGATTTAATCTGTG-3'		60
(-20/-716) <sup>1)</sup>	5'- <u>GCCTAACTGGCCGGTACA</u> TTCAGCTTGTACAA-3'		60
(-20/-347) <sup>1)</sup>	5'- <u>CCTAACTGGCCGGTACA</u> GTTTGGCAGAAATGG-3'		60
(-20/-186) <sup>1)</sup>	5'- <u>TAACTGGCCGGTACTA</u> GCATGGCCCGGC-3'		60
rs.4523300	5'-CCAGCCTTGTGTTTTGAGATTTATCC-3'	5'-GGA TAAATCTCAAAAACAAGGCTGGG-3'	60
g.4875G>A	5'-CTAGCATGGCCCGGCCAGCC-3'	5'-GGATGGCCCGGCCATGCTAG-3'	60
mut CTG	5'-GGCGGCGGCTGAGCGGGGC-3'	5'-GCCCGCTCAGGCCCGCCGC-3'	60
mut Sp1 A	5'-GTGACGGCAGCGGAGATCTATGACGGGCGCGG-3'	5'-CGCGCGCCCGTCA TAGTCTCTCCGCTGCCGTAC-3'	60
mut Sp1 B	5'-CGGAGGGGGCGATGACGATCTCA CGATCTTCCGCGGCGGAGCAGCG-3'	5'-CGTGCTCCCGCGGAAAGATCGTGAGATCGTCA TCGCCCTCCG-3'	60
mut Sp1 C	5'-CGCGCGGGCTCCACATCTGACGACGCGAGG-3'	5'-CCCTGCGCTGCTCAGATGTGACGCCCGCGC-3'	60
mut Sp1 D	5'-CGGAGCAGCGCAGATCTGGTCCGACGGGGCAGG-3'	5'-CCTGCCCGCTGCGACCAAGATCTGGGCTGCTCCG-3'	60
RACE	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACAACCTG-3'	5'-CCAGAACCTGAAACAAGCAGTGATAACA-3'	65
ChIP HGSNAT	5'-GTGACTCAGGCGGCGGTGAC-3'	5'-CGGTAGGAGGTGTGCACTCAC-3'	58
ChIP SLC22A18	5'-GCTCCCGGAACTGGCGATT-3'	5'-CTTTGCA GGGCGGGCTT-3'	60
Meth1_MPSIIIC	5'-ATAGTTAAGAA TGGGTGTGTATA-3'	5'-AA CCA TACTAAA CCCTACCTTAA-3'	60
Meth2_MPSIIIC	5'-TAAGGTAGGGTTAGTATGGTT-3'	5'-ATAAAAAA TATA CACTCACCTC-3'	60
Meth3_MPSIIIC	5'-GAGGTGAGTGTATATTTTTAT-3'	5'-CCTCCTAACTACCAATTTATA-3'	60

<sup>1)</sup> Underlined sequence anneals to pGL4 vector

## Figure legends

### **Fig. 1. The luciferase activity of the *HGSNAT* promoter**

Schematic representation of different long constructs used in transient transfection luciferase assay including promoter regions in antisense orientation. The all fragments of the predicted *HGSNAT* promoter delivered luciferase activities in RLU (relative luciferase unit). The RLU activity of each construct is plotted as fold increases over that of the pGL4 vector. The results are represented as the mean  $\pm$  S. D. The pGL4 vector, which is devoid of any insert upstream to the luciferase gene, was used as a negative control and exhibited no luciferase activity.

### **Fig. 2. 5' deletion analysis of the 5' flanking region of the *HGSNAT* gene**

The RLU (relative luciferase activity) of each deletion construct is plotted as fold increases over that of the pGL4 vector. The results are represented as the mean  $\pm$  S. D. of three separately transfected wells in one experiment. The pGL4 basic vector, which is devoid of any insert upstream to the luciferase gene, was used as a negative control and exhibited no luciferase activity.

### **Fig. 3. The Sp1 binding sites in the upstream region and promoter of the *HGSNAT* gene**

The consensus sequences for six putative Sp1 transcription factor binding sites are underlined. The mutated sequences are in bold letters. The arrows mark 3' end of promoter variants.

### **Fig. 4. The luciferase activity of the mutated *HGSNAT* promoter**

The fragments -20/-1305 with mutations in Sp1 binding sites (A) and mutation g.4875G>A and polymorphism rs4523300 (B) delivered luciferase activities in RLU (relative luciferase unit). The RLU of each deletion construct is plotted as fold increases over that of the pGL4 vector. The results are represented as the mean  $\pm$  S. D of three separately transfected wells in one experiment. The pGL4 basic vector, which is devoid of any insert upstream to the luciferase gene, was used as a negative control and exhibited no luciferase activity.

### **Fig. 5. ChIP analysis for Sp1 binding in *HGSNAT* promoter**

Sheared chromatin from HepG2 cells was used for immunoprecipitation with the anti-Histone H3 antibody as a positive control (1st lane) or anti-Sp1 antibody (2nd lane), no antibody was added as a negative control (3rd lane). The same immunoprecipitated DNA and the INPUT

were used for PCR amplification of part of the promoter region of *HGSNAT* gene and *SLC22A18* gene as a surrogate control (region numbering with accordance of 1st ATG as a +1 bp of sequences NM\_152419.2 and NM\_002555.5, respectively).

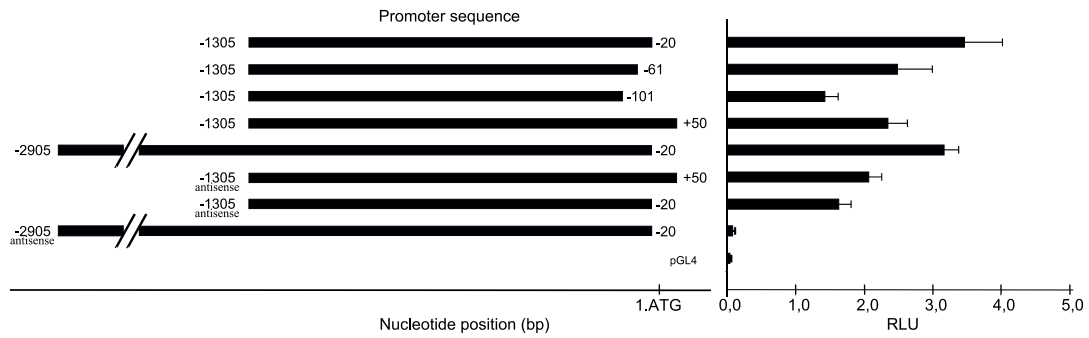


Figure 1

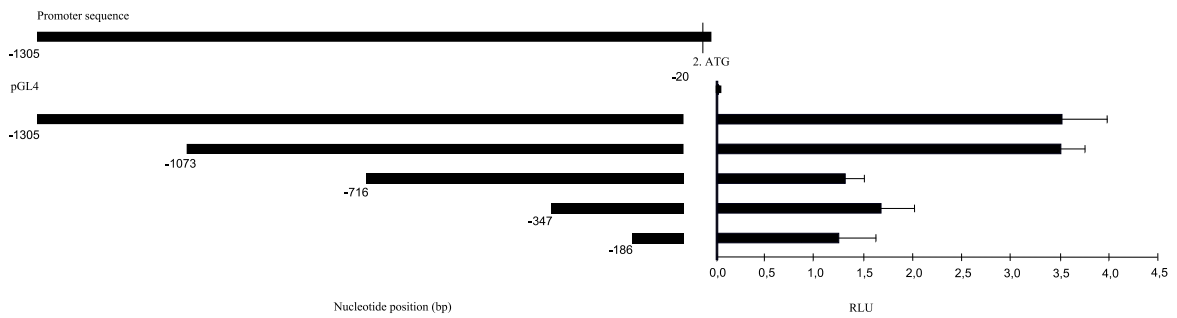


Figure 2

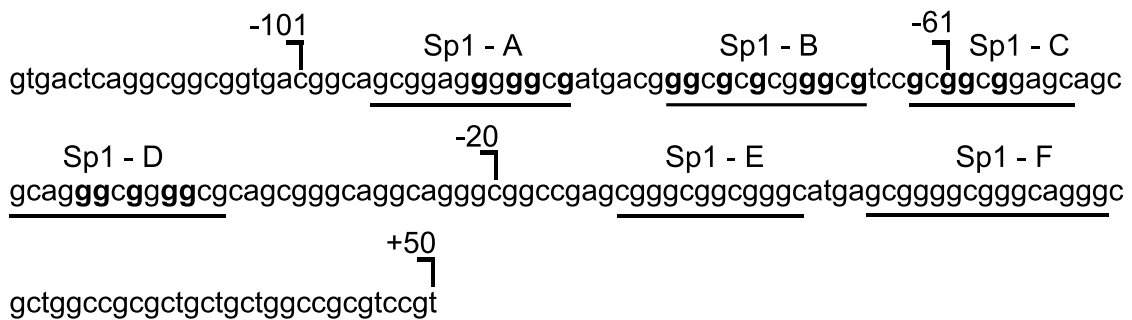


Figure 3

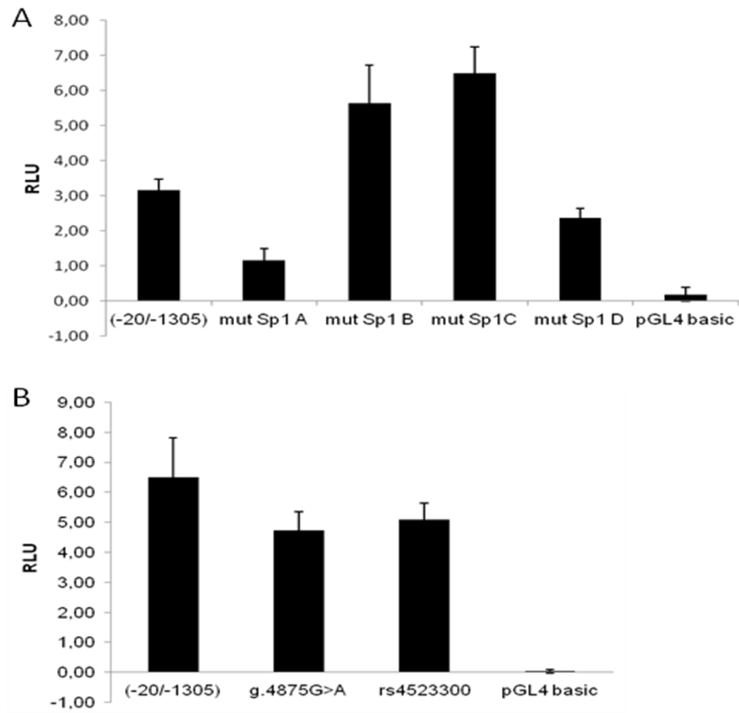


Figure 4

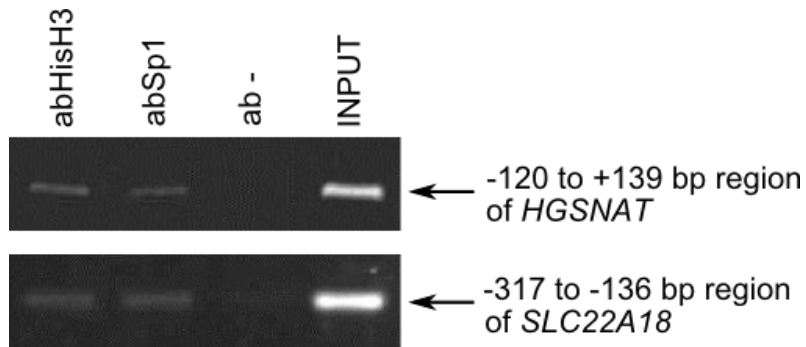


Figure 5