

University of Groningen

## Microvillus Inclusion Disease. Lessons about the apical plasma membrane.

Golachowska, Magdalena Renata

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2011

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Golachowska, M. R. (2011). *Microvillus Inclusion Disease. Lessons about the apical plasma membrane.*  
s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

**STRESZCZENIE  
W JĘZYKU POLSKIM**

---

## Streszczenie

---

Apikalna błona komórkowa nabłonka jelitowego (znana także pod nazwą mikrokosmków jelitowych czy rąbka szczoteczkowego/ wchłaniającego) stanowi selektywną barierę ochronną przed środowiskiem zewnętrznym oraz odpowiada za proces wchłaniania składników odżywczych.

Niezdolność komórek nabłonka jelit (enterocytów) do prawidłowego wytworzenia mikrokosmków oraz jej wpływ na funkcjonowanie całego organizmu jest szczególnie widoczne u pacjentów z chorobą inkluzji mikrokosmkowych (Microvillus Inclusion Disease, MVID; Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) classification – 251850).

MVID jest bardzo rzadko występującym dziedzicznym schorzeniem, charakteryzującym się poważnymi zaburzeniami wchłaniania. Pierwsze symptomy choroby objawiają się u noworodków w ciągu kilku dni lub tygodni po urodzeniu jako intensywna biegunka wydzielnicza, uniemożliwiająca absorpcję jakichkolwiek składników odżywczych z jelita i prowadząca w krótkim czasie do odwodnienia i śmierci. Do tej pory przyczyna biegunki, jak i leki mogące ją powstrzymać pozostają nieznane. Leczenie objawowe polega na całkowitym wstrzymaniu podawania pokarmów doustnie. Pacjenci odżywiani są wyłącznie dożylnie (total parenteral nutrition, TPN), a jedyną skuteczną procedurą rokującą większe szanse na przeżycie jest przeszczep jelita (cienkiego i grubego, często w połączeniu z przeszczepem wątroby).

Na poziomie komórkowym choroba charakteryzuje się atrofią mikrokosmków oraz obecnością licznych pęcherzyków lizosomalnych i inkluzji przypominających wyglądem mikrokosmki obecnych w cytoplazmie górnej części komórek wchłaniających nabłonka jelitowego. Liczne białka i lipidy, będące typowo rezydentami błony apikalnej (np. enzymy, kanały jonowe, itp), są nieobecne w błonie, natomiast akumulują się w cytoplazmie, przez co nie mogą uczestniczyć w procesie wchłaniania. Poza wyraźnymi defektami w strukturze i funkcji części apikalnej, pozostała powierzchnia komórki, a także połączenia międzykomórkowe i układ komórek w monowarstwie nabłonka, nie wykazują żadnych odchyłeń od normy.

Ze względu na szczególne defekty dotyczące jedynie apikalnej części komórek nabłonka jelitowego, choroba MVID oferuje wyjątkową okazję do studiowania genetycznych i molekularnych mechanizmów leżących u podstaw tworzenia oraz rozwoju apikalnej błony komórkowej.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było wyjaśnienie genetycznego podłoża choroby inkluzji mikrokosmkowych (MVID) oraz uzyskanie wglądu w patogenezę choroby, co pozwoli na lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie i rozwój apikalnej błony komórek nabłonkowych.

Genomowe DNA od dziewięciu pacjentów zdiagnozowanych z MVID zostało przebadane pod kątem specyficznych mutacji, a na biopsjach jelitowych trzech spośród nich przeprowadzono testy immunohistochemiczne.

U wszystkich 9 pacjentów zidentyfikowano w sumie 8 nowych mutacji w genie kodującym miozynę Vb (**Rozdział 2**). Miozyna Vb jest typowo obecna w każdym nabłonku organizmu, gdzie jako białkowy motor uczestniczy w procesach związanych z transportem wtórnym pęcherzyków endosomalnych wzdłuż filamentów aktynowych.

Co ważne, mutacje w genie kodującym miozynę Vb korelowały z zaburzonym poziomem ekspresji genu MYO5B oraz z nieprawidłową lokalizacją komórkową białka miozyny Vb.

Ponadto zaobserwowano nieprawidłową lokalizację pęcherzyków endosomalnych zawierających białka Rab11 i FIP5, oddziałujących z miozyną Vb, co świadczy o anomaliach w funkcjonowaniu procesów, za które odpowiedzialna jest miozyna Vb.

Otrzymane dane wskazują, iż apikalny system pęcherzyków transportowych, odpowiedzialnych za recykling białek mikrokosmkowych, z miozyną Vb jako kluczowym jego regulatorem, jest niezbędny do wytworzenia struktury i zapewnienia prawidłowego funkcjonowania błony mikrokosmkowej nabłonka jelita ludzkiego. Zaburzenia tego procesu mogą stanowić część patogenezę choroby inkluzji mikrokosmkowych.

## Streszczenie

---

U dwóch pacjentów, włączonych w powyższe badania, zaobserwowano ponadto zaburzenia funkcji nerek - zespół Fanconiego (**Rozdział 3**). Zespół Fanconiego jest skorelowany z wadami apikalnej błony komórek nabłonka kanalików wstępujących (proksymalnych) nerek. Zbadano czy mutacje w MYO5B u tych pacjentów wywołują zaburzenia w strukturze błony apikalnej nabłonka nerek, podobne jak w przypadku jelit. Diagnostyka immunohistochemiczna oraz analiza obrazów z mikroskopu elektronowego biopsji pobranych z nerek, a także z różnych części układu trawiennego (dwunastnica, jelito cienkie, jelito czcze oraz okrężnica) wykazała iż zaburzenia w strukturze błony apikalnej były obecne jedynie w nabłonku przewodu pokarmowego (we wszystkich jego częściach). W nabłonku nerkowym pacjentów nie zaobserwowano poważniejszych zmian strukturalnych, ani zaburzeń w lokalizacji apikalnych endosomalnych pęcherzyków transportowych.

Wynioskowano, że mutacje w miozynie Vb wywołują odmienny wpływ na strukturę jak i funkcjonowanie błony apikalnej komórek nabłonka jelitowego i nerkowego. Zaburzenia w strukturze i funkcji obserwowane wyłącznie w nabłonku jelitowym sugerują istnienie czynnika specyficznego jedynie dla tego organu (przypuszczalnie czynnika środowiskowego). Identyfikacja tego czynnika może otworzyć nowe możliwości dla rozwoju alternatywnych strategii terapeutycznych tej wyniszczającej choroby.

Jednym z czynników środowiskowych wspólnych dla choroby inkluzji mikroosmkowych (MVID) oraz innych patologii (np. nowotwory) gdzie występują podobne zaburzenia w strukturze błony apikalnej oraz obecność inkluzji mikroosmkowych, jest zakwaszenie zewnątrzkomórkowe. Niskie pH jest także czynnikiem występującym w przewodzie pokarmowym. Atrofia mikroosmków oraz brak odpowiednich białek transportujących jony (np,  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $HCO_3^-$ ) w błonie apikalnej nabłonka np. dwunastnicy uniemożliwia proces neutralizacji treści kwasowych narażając komórki na przedłużoną ekspozycję na niskie pH.

Celem kolejnych badań było stwierdzenie, czy obniżenie pH środowiska zewnętrznego może przyczynić się do powstania inkluzji mikrokosmkowych (**Rozdział 4**). Korzystając z techniki obrazowania żywych komórek, zaobserwowano iż zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowe zakwaszenie powoduje rozciąganie, a także pobieranie do wewnątrz dużej części błony apikalnej, podczas gdy błona basolateralna oraz połączenia międzykomórkowe pozostały nienaruszone. Wchłonięte fragmenty błony apikalnej (w formie pęcherzyków błonowych), fuzjowały ze sobą tworząc większe struktury przypominające wakuole (VAC, Vacuolar Apical Compartment) czy inkluzje.

Ponadto zaobserwowano, iż związki ingerujące w strukturę i dynamikę filamentów aktynowych (np. jasplakinolide) wywołują efekty podobne do wewnątrzkomórkowej kwasicy. Proces tworzenia wakuoli z apikalnej błony komórkowej był zależny także od aktywności kinazy Rho i miozyny II.

Dane te wskazują, że zakwaszenie komórki wywołuje (zależne od kinazy Rho i miozyny II) selektywne pobieranie fragmentów apikalnej błony komórkowej oraz tworzenie wewnątrzkomórkowych wakuoli, zawierających białka błony apikalnej.

Następnie zbadano wpływ wewnątrzkomórkowej kwasicy na strukturę i funkcję aparatu Golgiego, organelum, które odgrywa bardzo ważną rolę w rozwoju i utrzymywaniu funkcji apikalnej błony komórkowej (**Rozdział 5**). Zakwaszenie środowiska zewnętrznego, jak i bezpośrednie zakwaszenie cytosolu spolaryzowanych komórek hepatomy ludzkiej (HepG2) powoduje odwracalne, zależne od temperatury puchnięcie i fragmentację cystern aparatu Golgiego, których zakres był tym większy im niższe było pH i dłuższy czas inkubacji. Zakwaszenie nie zahamowało jednak biogenezy błon aparatu Golgiego, który, choć rozdrobniony, został utworzony bo wypłukaniu zastosowanej uprzednio Brefeldyny A (inhibitor transportu białek z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego i aktywator transportu wstecznego, który prowadzi do zaniku aparatu Golgiego w komórce).

## Streszczenie

---

Co ciekawe, nie zaobserwowano wewnątrzkomórkowego gromadzenia apikalnych białek błonowych. Nowo zsyntezowane białka błonowe prawidłowo przechodziły etapy modyfikacji w aparacie Golgiego, pomimo jego defragmentacji. Ponadto synteza i metabolizm analogu ceramidów i spolaryzowany transport jego metabolitów do błony apikalnej zachodziły w sposób prawidłowy. Dane te sugerują, że pomimo zaburzonej struktury i lokalizacji w komórce, aparat Golgiego funkcjonuje prawidłowo. Jest zatem mało prawdopodobne, aby za internalizację błony komórkowej, czy wewnątrzkomórkową akumulację białek błonowych, wywołanych zakwaszeniem środowiska była odpowiedzialna utrata skomplikowanej struktury apartu Golgiego.

Podsumowując, w pracy tej wyjaśniono genetyczne przyczyny choroby inkluzji mikrokosmkowych (MVID), jej patogenezę związaną z zaburzeniem apikalnego transportu białek mikrokosmkowych, oraz przedstawiono ewentualne czynniki środowiskowe (niskie pH) mogące być przyczyną tworzenia inkluzji mikrokosmkowych.