Lysosomální enzymopathie: dědičné poruchy metabolismu glykokonjugátů a sfingolipidů

RNDr.Jana Ledvinová CSc.

Ústav dědičných metabolických poruch 1.LF UK

jledvin@cesnet.cz

Živočišná buňka – hlavní membránové organely

Jádro – hlavní genetická výbava (DNA,RNA) **(6% objemu buňky)**

Cytosol – synthesa proteinů, metabolické dráhy **(54%)**

ER (RER) - synthesa proteinů, synthesa většiny lipidů, pro distribuci do řady organel a plasmatické membrány (12%)

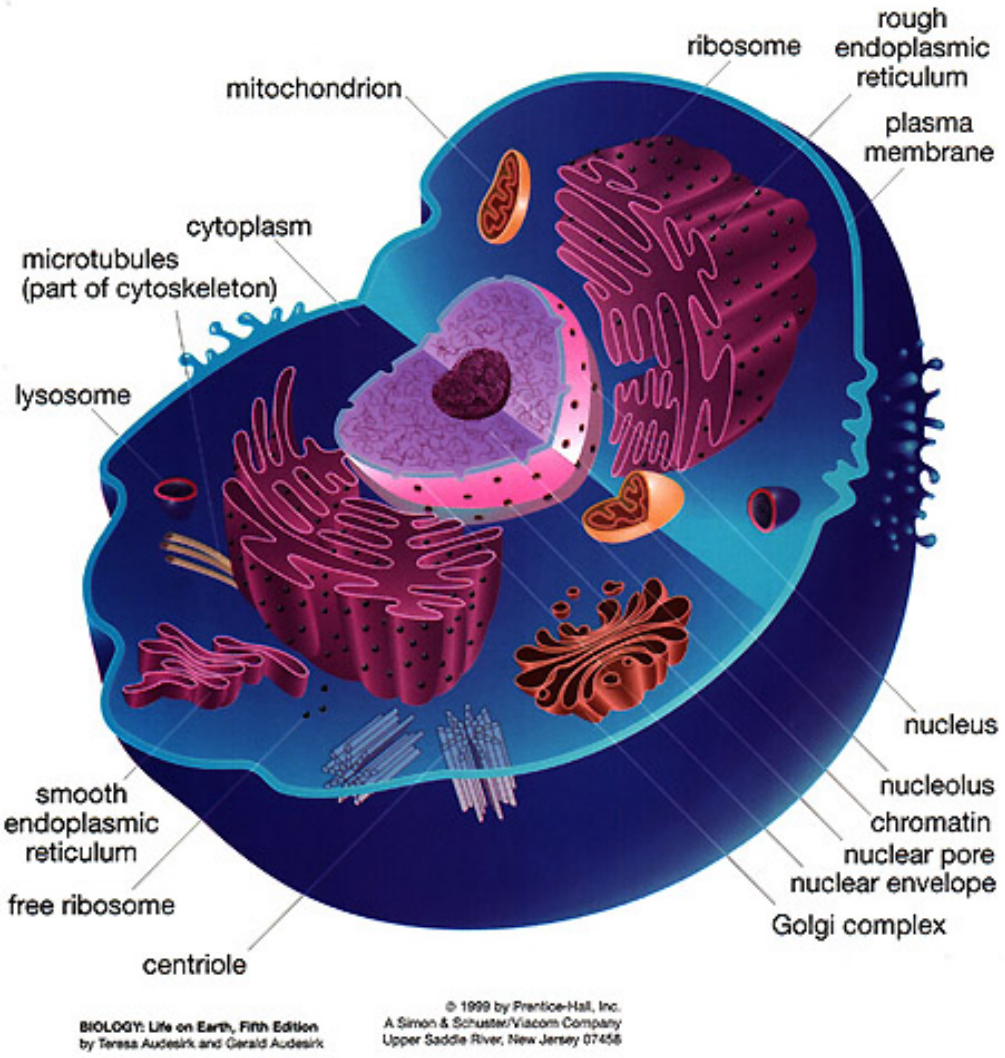
Golgi – úprava, třídění, balení proteinů pro předání jiné organele nebo k sekreci (3%)

Lysosomy – odbourávání látek a další funkce (1%)

Endosomy – třídění endocytovaného materiálu, transport (1%)

Mitochondrie – oxidativní fosforylace (22%)

Peroxisomy – oxidace toxických molekul (1%)



http://innovations.oise.utoronto.ca/science/index.php/Visualizing_and_Building_Cells

Relativní objemy zabírané hlavními membránovými organelami jaterní buňky (hepatocytu)

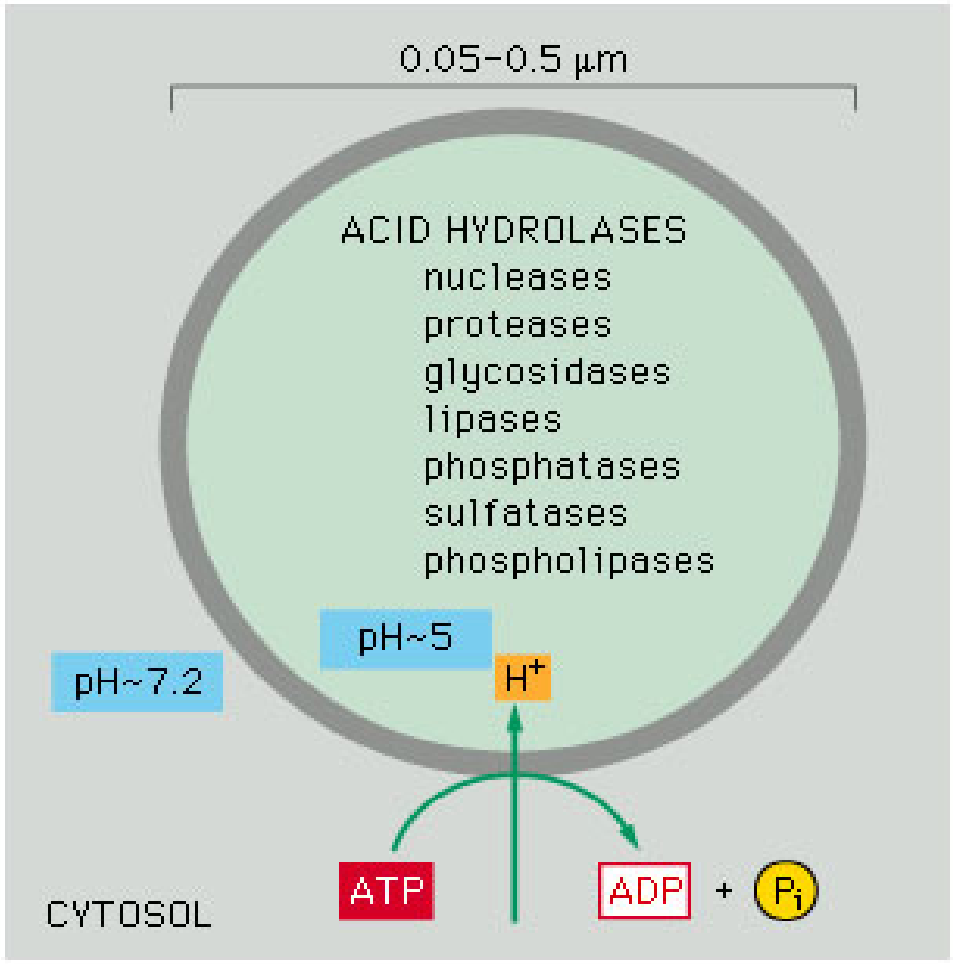
Buněčný oddíl	Procenta z celkového objemu buňky	Přibližný počet v jedné buňce
Cytosol	54	1
Mitochondrie	22	1700
Endoplasmatické retikulum	12	1
Jádro	6	1
Golgiho aparát	3	1
Peroxisomy	1	400
Lyzosomy	1	300
Endosomy	1	200

Správně → lysosom, lyzosom Špatně→lysozom, lyzozom

řecky *lyó = uvolňuji, soma = tělo*

Upraveno podle Molecular Biology of the Cell by Bruce Albertset al.,Garland Publishing, NY 1994

Lysosomy



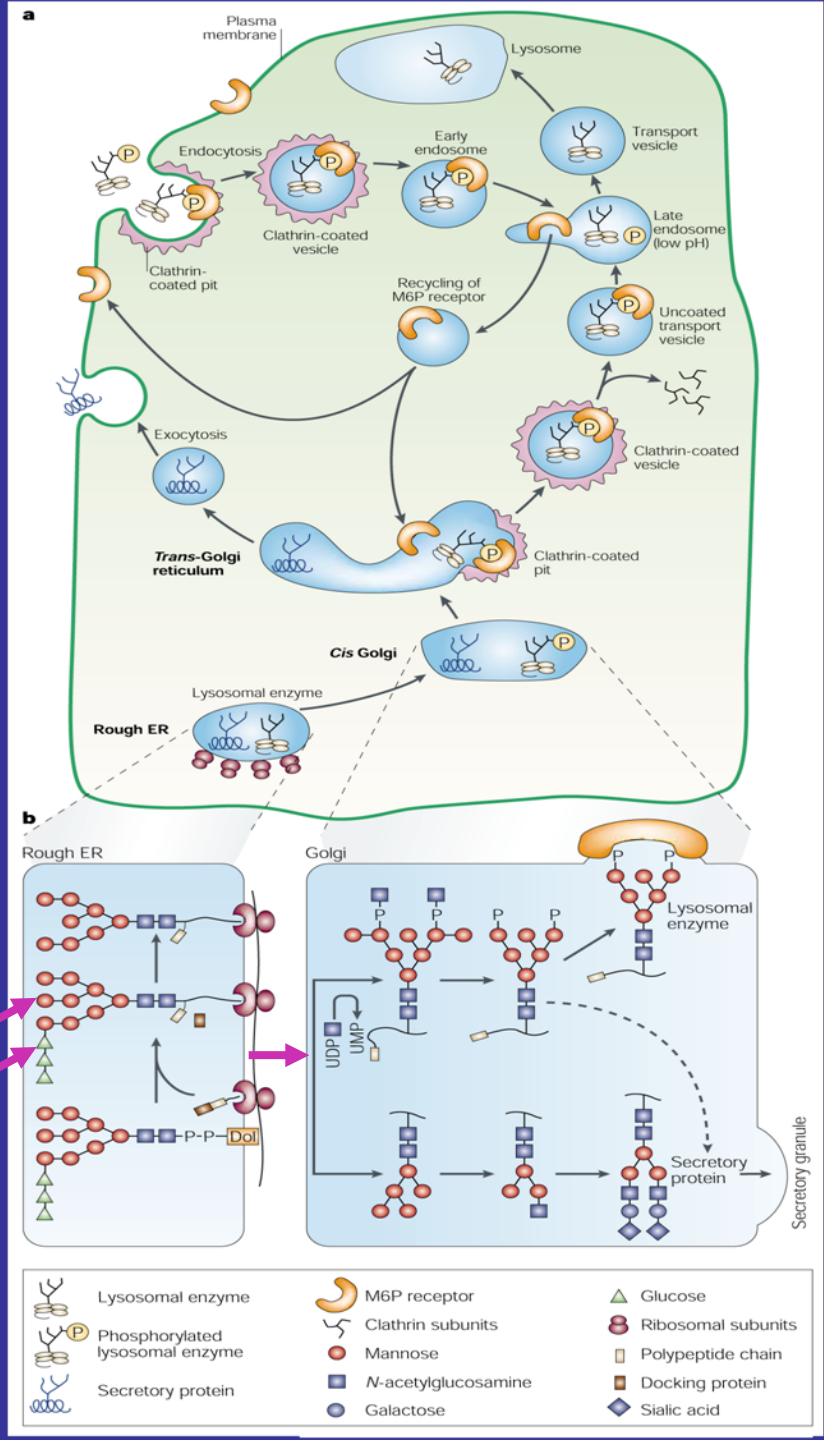
Podle Molecular Biology of the Cell by Bruce Albertset al.,Garland Publishing, NY 1994

- hlavní místo katabolismu přirozeně se vyskytujících makromolekul
- katabolismus proteinů, glykoproteinů, lipidů všech typů, nukleotidů
- monomerní komponenty vycházejí z lysosomů prostřednictvím specifických membránových proteinů a jsou reutilisovány nebo vyloučeny z buňky
- lysosomální enzymy (kyselé hydrolasy) jsou aktivní při kyselém pH, je známo kolem 70 těchto enzymů
- v lumen lysosomu udržuje kyselé pH protonová ATPasa v membráně, která čerpá H^+ do lumen

Kromě katabolických mechanismů mají další důležité funkce (transportní, např. mukolipin, NPC1 protein, sekretorní funkce atd.)

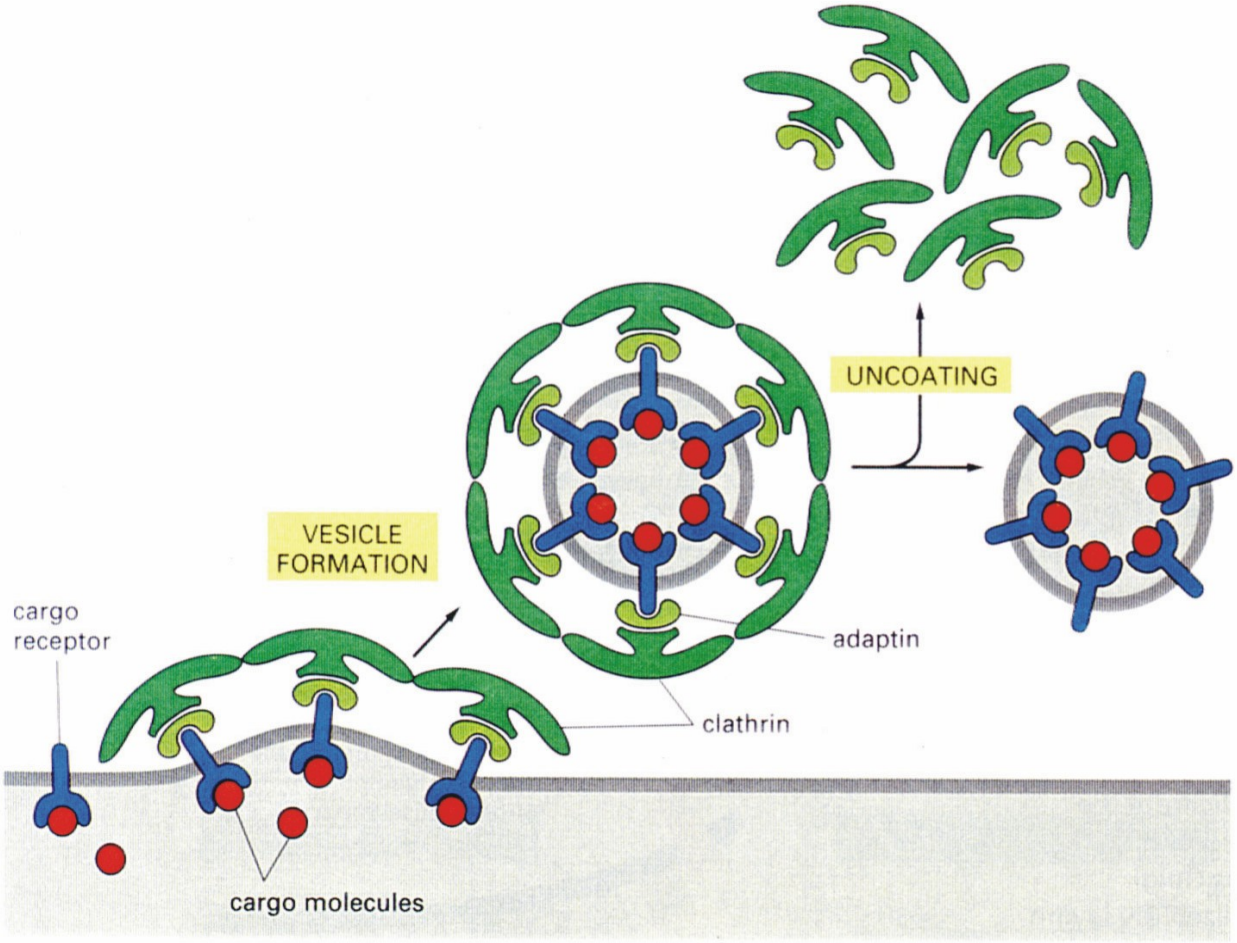
Synthesa a transport lysosomálních enzymů z Golgiho aparátu do lysosomů

- lysosomální enzymy = glykoproteiny
- synthesa a kotranslační glykosylace na ribosomech drsného ER (glykosylovaný dolicholfosfátový meziprodukt, *viz b*)
- transfer do *cis*- Golgi, připojení M6P značky = „adresa“ do lysosomů, slouží k odlišení od jiných proteinů
- rozpoznání a vazba na MPR v *trans*-Golgi, vznik váčků („pučení“)
- cílení a přenos pomocí transportních klathrinových váčků, fuze s endosomy/ lysosomy



Zdroj: Desnick R.J.,Nature,3(2002)954

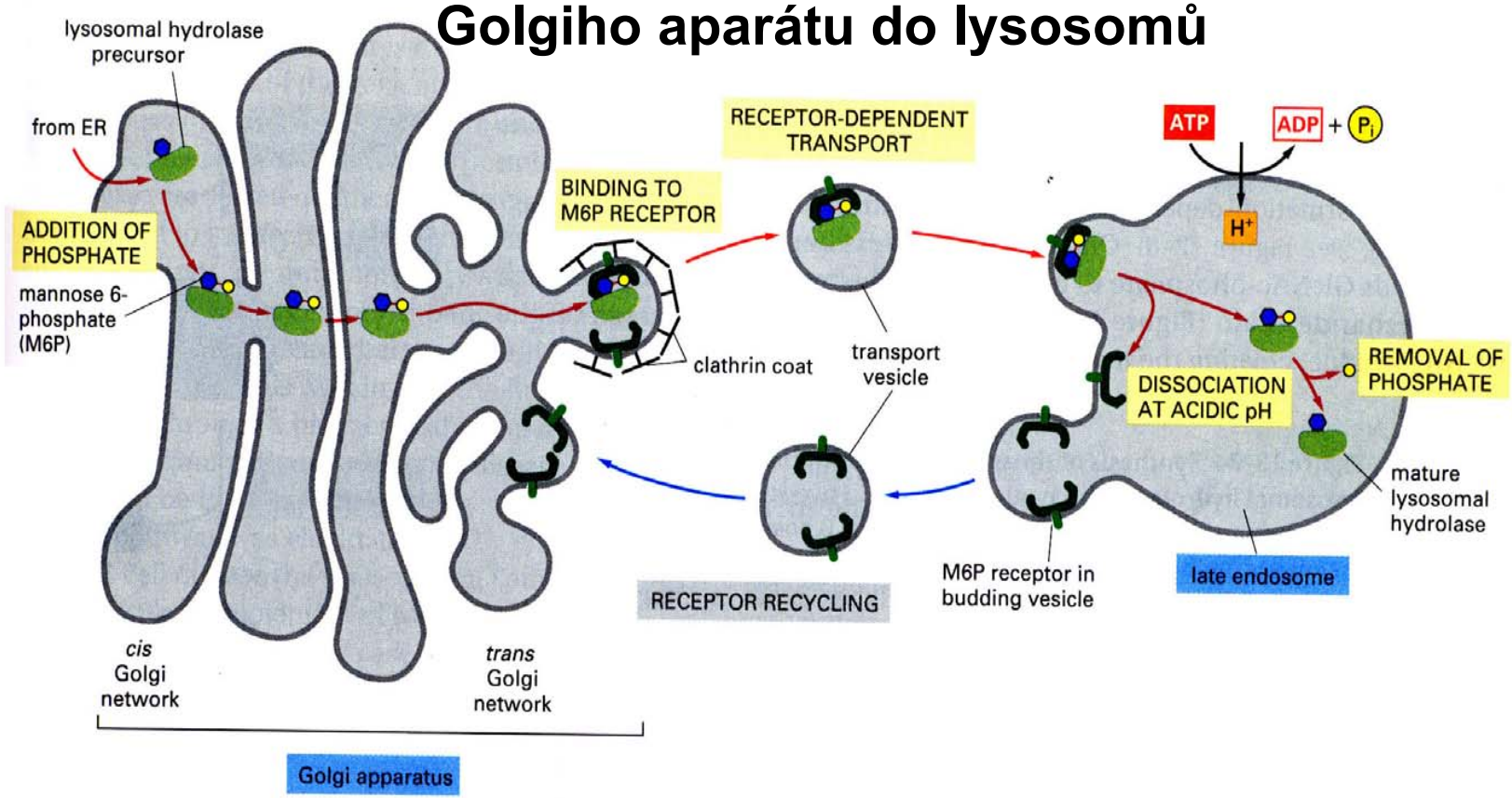
Selektivní transport zprostředkovaný klathrinovými váčky (clathrin-coated vesicles)



Receptory s navázanými molekulami jsou rozpoznávány a vázány adaptiny, které váží také klathrin k cytosolovému povrchu rostoucího váčku, který je od membrány odpojen za účasti malého GTP-vázajícího proteinu dynaminu. Po vytvoření váčku je plášť odstraněn a váček pak fúzuje s cílovou organelou. Na povrchu jsou značky, které rozpoznávají komplementární receptory na cílových membránách (transmembránové proteiny vSNARE,tSNARE)

Podle Molecular Biology of the Cell by Bruce Albertset al.,Garland Publishing, NY 1994

Transport lysosomálních enzymů z Golgiho aparátu do lysosomů



1) UDP(
phosph
2) N-Ac
(phosp

• v *cis*-Golgi je ve dvou stupních připojen M6P marker (adresa do lysosomů): přenosem N-acetylglukosaminyl-1-fosfátu fosfotranferasou z UDP-N-acetylglukosaminu na C-6 mannosy a poté je N-acetylglukosamin odštěpen GlcNAc 1-fosfodiester-N-acetylglukosamidasou (fosfodiesterasou)

• fosforylované enzymy se váží na M6P receptor v *trans*-Golgi, z kterého „pučí“ váčky obalené klathrinem, který je odstraněn před fůzí (transformaci) s „kyselou“ organelou (endosom/lysosom)

Podlee Molecular Biology of the Cell by Bruce Albertset al.,Garland Publishing, NY 1994

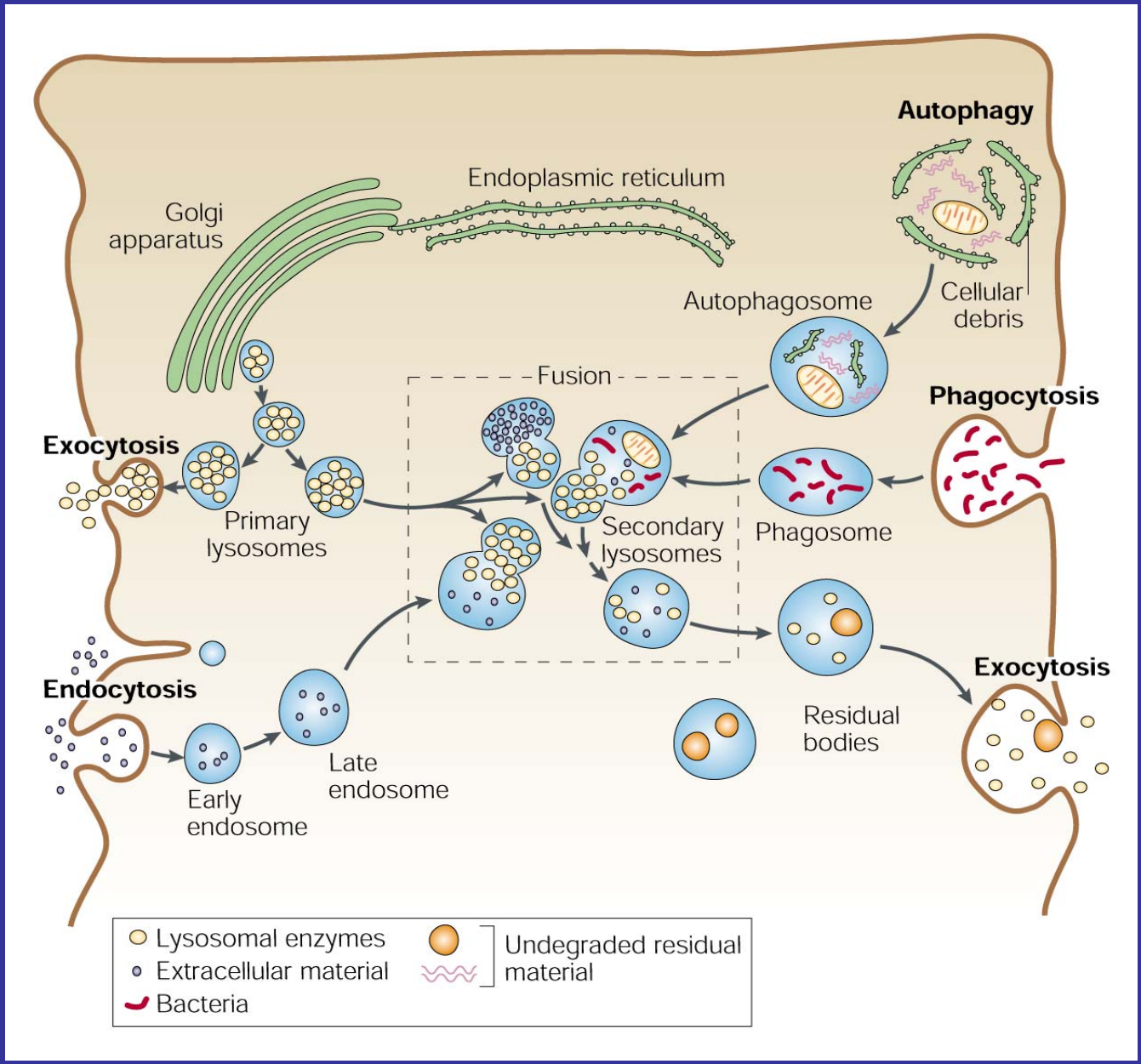
Dráhy endosomálního - lysosomálního systému

1. do lysosomů

a) z extracelulárního prostoru do buňky:
- pinocytosa
- fagocytosa
- endocytosa

b) autofagocytosa

2. z buňky ven:
- exocytosa



Zdroj: Desnick R.J.,Nature,3(2002)954

Jednotlivé kroky endocytické dráhy

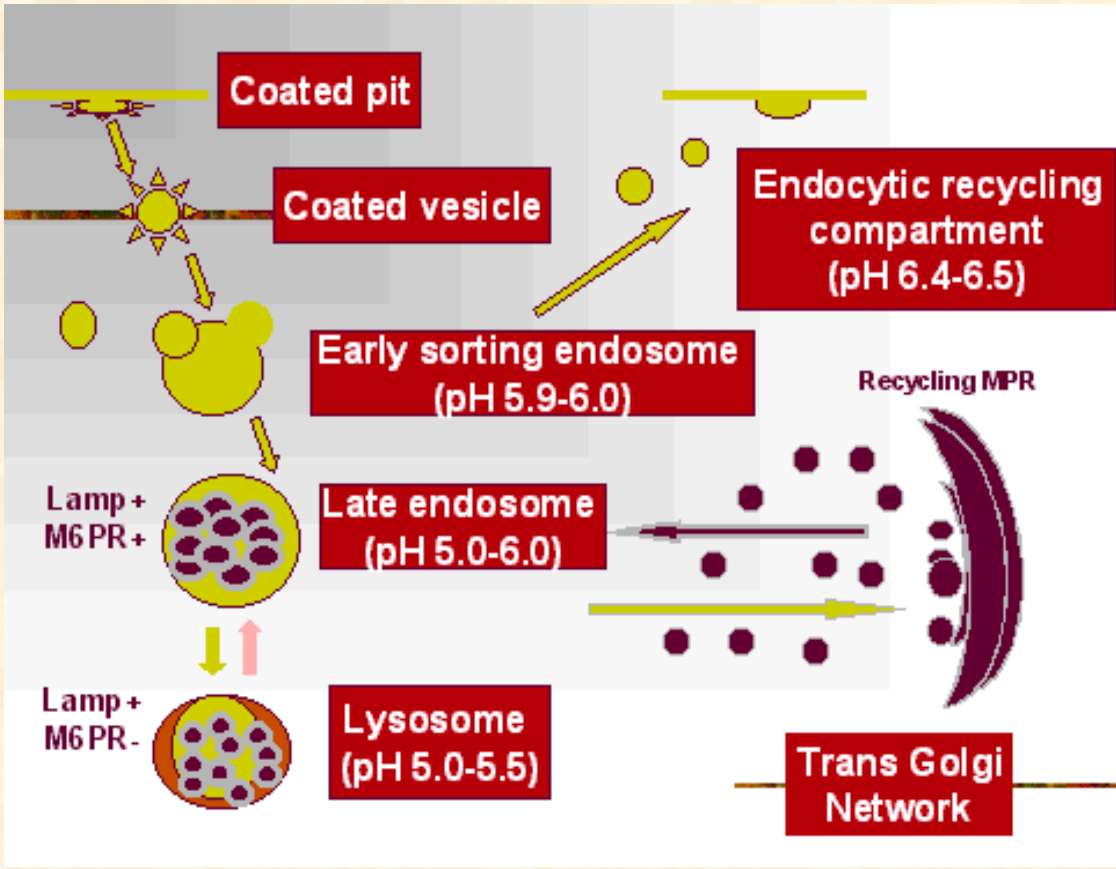
pH

markery (příklady)

časný endosom — **EEA-1, rab5-GDP**

pozdní endosom — **LBPA, rab7-GDP, MPR+**

lysosom — **LAMP+, MPR-, acid hydrolases**



Poruchy lysosomálního systému

- geneticky podmíněné defekty v důsledku poruchy funkce enzymového nebo nekatalytického proteinu zajišťujícího funkčnost lysosomálního systému
- důsledek – stagnace hydrolytických pochodů a vznik substrátových deposit v lysosomech, porucha jejich funkcí
- závažné (většinou fatální) zdravotní následky
- je známo více než 40 různých lysosomálních nemocí
- přenos je autosomálně recesivní, ve dvou případech gonosomálně recesivní (Fabryho choroba a MPS II - Hunter)
- incidence v ČR je 1 : 8 500, ve světě všeobecně 1: 7-8000
- kausální léčba dodaným rekombinantním enzymem možná jen u několika nemocí (Fabryho a Gaucherova choroba, Pompeho nemoc, MPS I ve vybraných případech BMT (MPS I)
- prevence spočívá v prenatální diagnostice v postižených rodinách

Poruchy lysosomálního systému

OMIM™ - Online Mendelian Inheritance in Man™

Původní členění - podle povahy ukládaného metabolitu
Racionálnější - podle defektů specifických proteinů postihujících katalytickou nebo nekatalytickou lysosomální funkci:

A. Poruchy postihující degradační funkce lysosomálně-endosomálního systému spojené s hromaděním neodbouraných metabolitů

I. Lysosomální enzymopatie způsobené poruchou katalytické funkce v důsledku

1. mutace v genu enzymového proteinu **(lipidosy, glykoproteinosy, mukopolysacharidosy …)**
2. mutace v genu enzymového aktivátoru
3. **poruchy** postranslační modifikace enzymového proteinu **(ML II, PSD)**
4. **poruchy funkce** protektivních proteinů **(galaktosialidosa)**

II. Poruchy lysosomálních proteinů s nekatalytickou funkcí

mutace proteinových transporterů **v lysosomální membráně (ML IV, Salla disease)**
mutace dalších, funkčně málo definovaných proteinů lysosomů **(NPC1, NPC2, NCL, LAMP 2, cystinosa)**

B. Poruchy sekretorického lysosomálního systému (LRO)

Hlavní skupiny poruch podle typu sloučenin jejichž degradace nebo funkce je postižena : LSD (lysosomal storage diseases)

- Poruchy degradace glykoproteinů (glykoproteinosy)
- Poruchy degradace glykosaminoglykanů (mukopolysacharidosy)
- Poruchy degradace sfingolipidů následkem defektů enzymových proteinů (sfingolipidosy)
- Poruchy funkce proteinových aktivátorů sfingolipidových hydrolas
- Poruchy transportních proteinů (a mechanismů)
- Poruchy funkce protektivních proteinů

Jednotlivé skupiny se mohou prolínat (GM1 gangliosidosa)
Většinou se tato onemocnění vyskytují vzácně, některá jsou však častější u některých etnických skupin
např.Tay-Sachsova choroba, Gaucherova choroba (Aškenazim Židé), aspartylglykosaminourie u finské populace
z ostatních pak Niemann-Pickova choroba typu C a některé typy ze skupiny neuronálních ceroidlipofuscinos
(NCL2 a NCL6).

poruchy lysosomálních hydrolas
primární poruchy enzymového proteinu

degradace lipidů, glykoprot., proteinů

1. ceramidasa (N-Acyl-sfingoid=Cer)
2. β-glukosylceramidasa (GlcCer)
3. β-galaktosylceramidasa (GalCer)
4. arylsulfatasa A (SGalCer)
5. NAc-β-glukosaminidasa A (GM2)
6. NAc-β-glukosaminidasa B (GM2,GP)
7. β-galaktosidasa (GM1, OLS, GP)
8. α-galaktosidasa A (Gb3Cer)
9. sfingomyelinasa (P-cholin-cer)
10. kyselá lipasa (CE, TAG)
11. α-neuraminidasa (GP, gangliosidy)
12. α-N-acetylgalaktosaminidasa (GP, krev. sk.A: αGalNAc- [Fucα]- βgal-;)
13. kyselá α-1,4-glukosidasa (glykogen)
14. α-Mannosidasa (GP)
15. β-Mannosidasa (GP)
16. α-Fukosidasa (GP)
17. aspartylglukosaminidasa (GP)
18. tripeptidylpeptidasa I – TPP (prot.)
19. proteinpalmitoyl thioesterasa-PPT

degradace glykosaminoglykanů (GAG)

20. α-L-iduronidasa (DS, HS)
21. iduronosulfat sulfatasa (DS,HS)
22. heparan N-sulfatasa (HS)
23. NAc-α-D-glukosaminidasa (HS)
24. CoA:α-glukosaminid NAc-transf. (HS)
25. glNAc- 6-sulfat sulfatasa (HS)
26. GalNAc-6-sulfat sulfatasa (KS,C6S)
27. β-galaktosidasa (KS)
28. GalNAc-4-sulfatsulfatasa (DS)
29. β-glukuronidasa (DS,HS,C4S,C6S)
30. hyaluronidasa (kys. hyaluronová)

30 intralysosomálních enzymů
29 hydrolas+1 transferasa
30 proteinů = 30 genů
30 poruch

LSD způsobené defektem nehydrolytického proteinu: (n =7)

- ***enzymových aktivátorů (n=4)***

  deficit prosaposinu

  deficit SAP B

  deficit SAP C

  deficit aktivatoru hexosaminidasy

- ***posttranslační modifikace lysosomálních enzymů*** (n =*2)*

  polysulfatásový deficit

  ML II (mukolipidosa II – I cell disease)

- ***z destabilisace enzymového komplexu (n=1)***

  galaktosialidosa (deficit kathepsinu A)

Mukopolysacharidosy - MPS

• dědičné poruchy katabolismu **glykosaminoglykanů (GAG)** v důsledku mutací v genech kódujících 10 různých hydrolas (exoglykosidasy, sulfatasy) a 1 transferasu a jsou příčinou 6 různých onemocnění

• důsledkem je lysosomální hromadění GAG ve všech typech buněk,

• postiženy jsou především buňky mesenchymu, ale i epiteliální a neuronální

• fragmenty GAG jsou vylučovány v moči pacientů

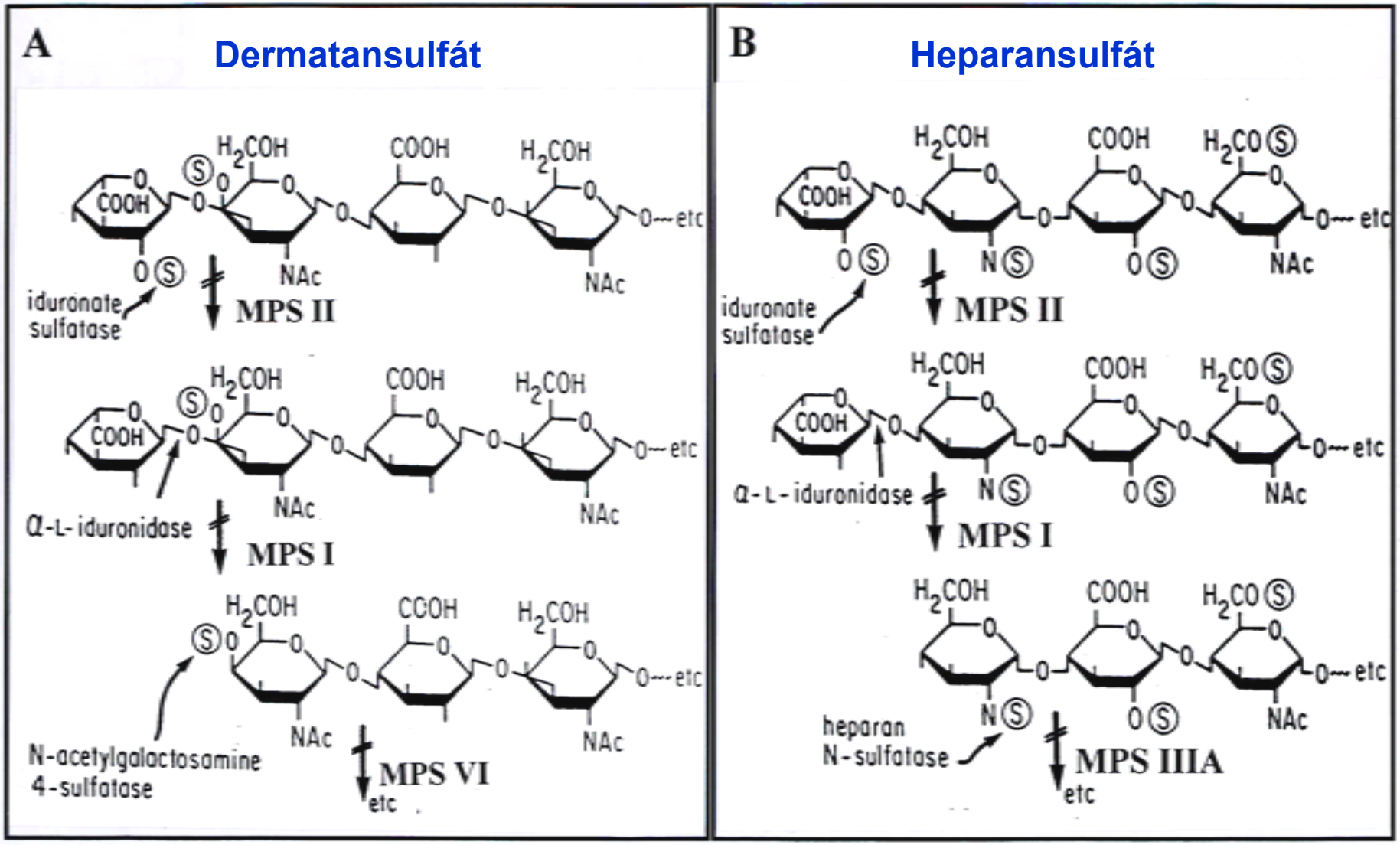
• **GAG jsou nejčetnější polysacharidové struktury kovalentně vázané na protein, s dlouhými strukturami obsahujícími disacharidové jednotky, zajišťují vysokou viskositu a rigiditu**

• **tvoří důležitou integrální součást buněčných membrán, extracelulární matrix i některých intracelulárních struktur**

Důležité GAG

GAG	lokalizace
Hyaluronát	Synoviální tekutina, sklivec, pojivová tkáň
Chondroitin sulfát	Chrupavka, kosti, srdeční chlopně
Heparan sulfát	Bazální membrány, komponenty buněčných povrchů
Heparan	Intracelulární komponenty tukových buněk, výstelka arterií plic, jater, kůže,
Dermatan sulfát	Kůže, cévy, srdeční chlopně
Keratan sulfát	Rohovka, kosti, chrupavky

Postupné odbourávání DS (A) a HS (B) s vyznačením metabolických bloků



MPS: primární defekt a hromaděné GAG

Nemoc	Enzymový deficit	Hromaděné GAG
MPS I (Hurler,Schie)	α-iduronidasa	DS,HS
MPS II (Hunter)	Iduronat-sulfatasa	DS, HS
MPS III A (Sanfillippo A) MPS III B (Sanfillippo B) MPS III C (Sanfillippo C) MPS III D (Sanfillippo D)	Heparan sulfamidasa α–N–acetalglukosaminidasa AcCoA : α–glukosaminid N-acetyltransferasa N-acetylglukosamin-6-sulfat sulfatasa	HS
MPS IV A (Morquio A) MPS IV B (Morquio B)	N-acetylgalaktosamin-6-sulfatasa β – galaktosidasa	KS,CS
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arylsulfatasa B	DS
MPS VII	β-glukuronidasa	HS,DS,CS

Hlavní klinické znaky u MPS

Rozvoj klinických symptomů je postupný, po delším asymptomatickém období :

- kraniofaciální dysmorfie,
- zástava a regres psychomotorického vývoje,
- hepatosplenomegalie,
- kardiomyopatie,
- kostní a kloubní změny s poruchou růstu,
- zákal rohovek (s výjimkou MPS II a III),
- poruchy sluchu.

U MPS III je závažné postižení CNS, somatické příznaky vyjádřeny málo, typická je hyperaktivita až agresivita

Laboratorní diagnostika MPS

Morfologické vyšetření: vakuolizace cytoplasmy všech typů buněk, inkluse v krevních elementech

Biochemická analysa:

- průkaz **zvýšeného vylučování GAG** v moči a elektroforetické **vyhodnocení jejich spektra** (nasměrování enzymové analysy)
- enzymatické **potvrzení diagnosy průkazem deficitu aktivity** v buňkách (leukocyty periferní krve, kultivované kožní fibroblasty)
- **DNA diagnostika** důležitá především pro genetické poradenství v rodině a pro prenatální diagnostiku.
- Nezbytná je pro určení přenašeček u X-vázané dědičnosti MPS II

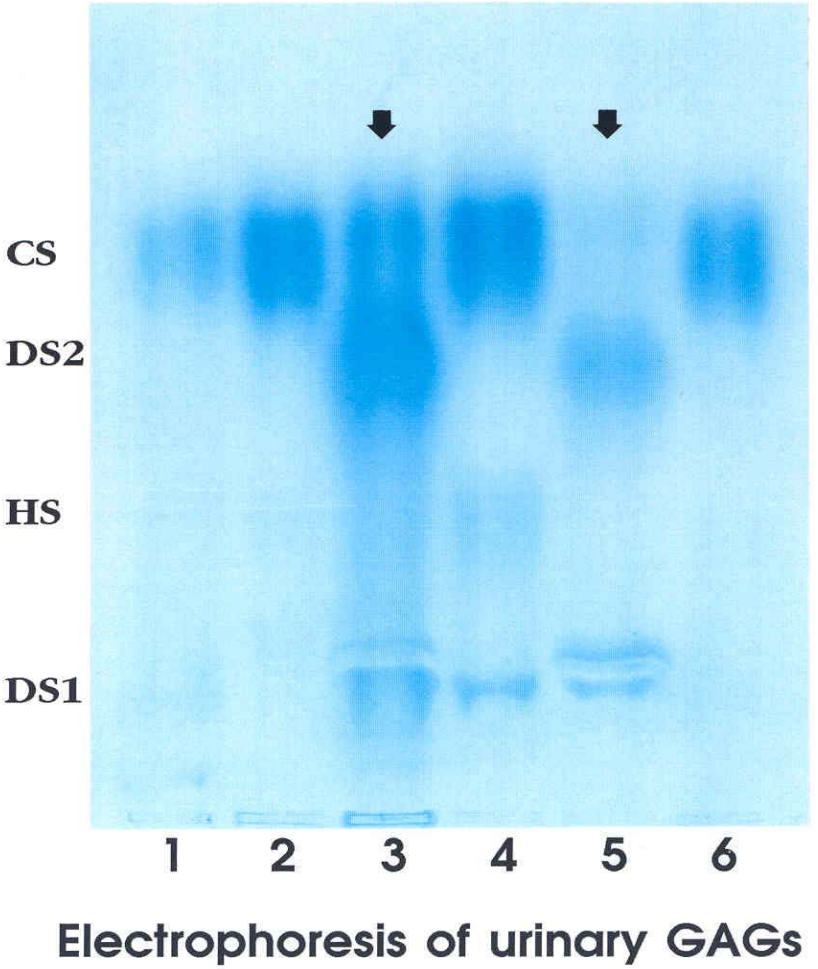
MPS I – Hurlerova choroba

Deficit aktivity alfa-iduronidasy

***<u>ELFO glykosaminoglykanů</u>*:**

Excrece dermatan sulfátu (DS1 a DS2 and heparan sulfátu (HS) v moči pacientů (viz šipky)

(CS=keratan sulfát)



Vzorky 1, 2 a 6 jsou kontroly, 3 a 5 pacient s MPS 1

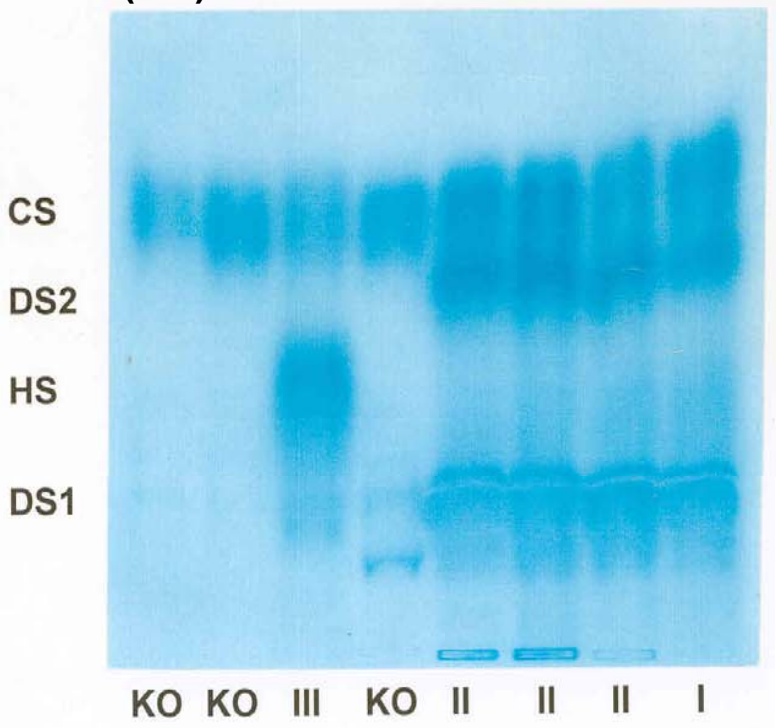
ELFO glykosaminoglykanů u pacientů s MPS II (vzorky II), srovnání s MPS I (I) a MPS III (III)

MPS II: Hunterova choroba

Deficit aktivity alfa-iduronosulfat sulfatasy

Dědičnost je vázaná na X-chromosom

Exkrece dermatan sulfátu (DS1 a 2) a heparan sulfátu (HS) v moči



KO=kontrola
CS=chondroitin sulfát

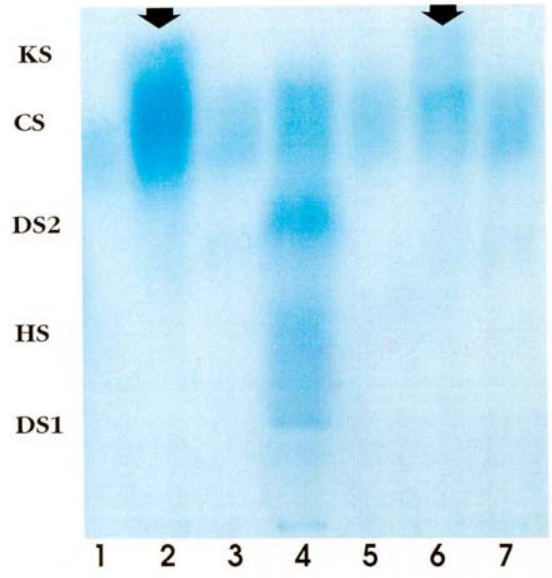
MPS IVA: Deficit aktivity N-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatázy

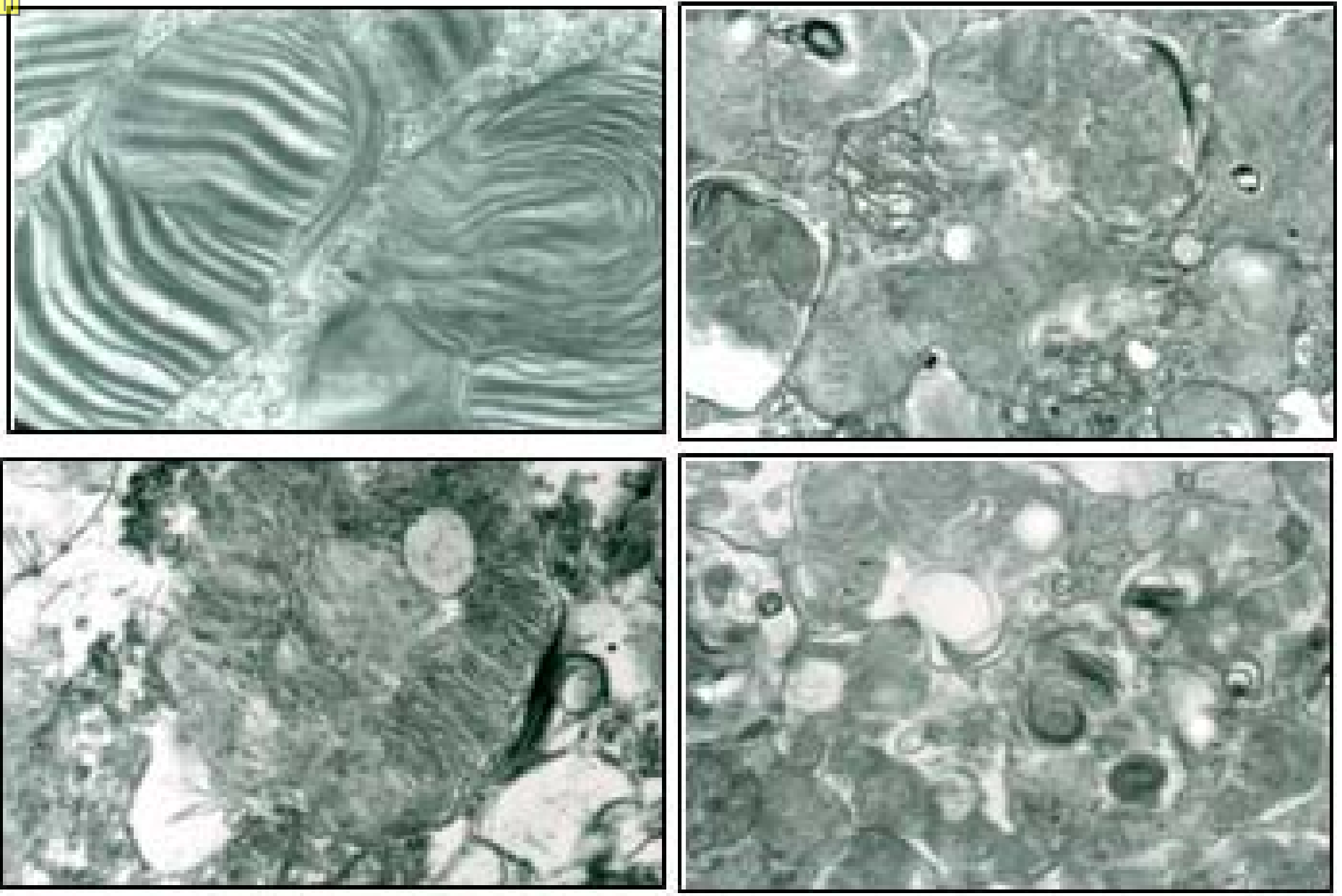
***<u>ELFO glykosaminoglykanů</u>*:**

Příklad exkrece keratan sulfátu (KS) a chondroitin-6-sulfátu (CS) v moči pacientů (vzorky 2 a 6,viz šipky)

Vzorky 1,3 a 5 jsou kontroly

DS1,2=dermatan sulfát ve dvou frakcích, HS=heparansulfát)





neurolysosomes in MPS I-III (mixture of lipid and non-lipid components)

Glykoproteinosy

• glykoproteiny jsou hojně zastoupeny na buněčných membránách, na povrchu buňky i uvnitř

• mají důležité funkce – strukturální, signalisační, rozpoznávací aj.

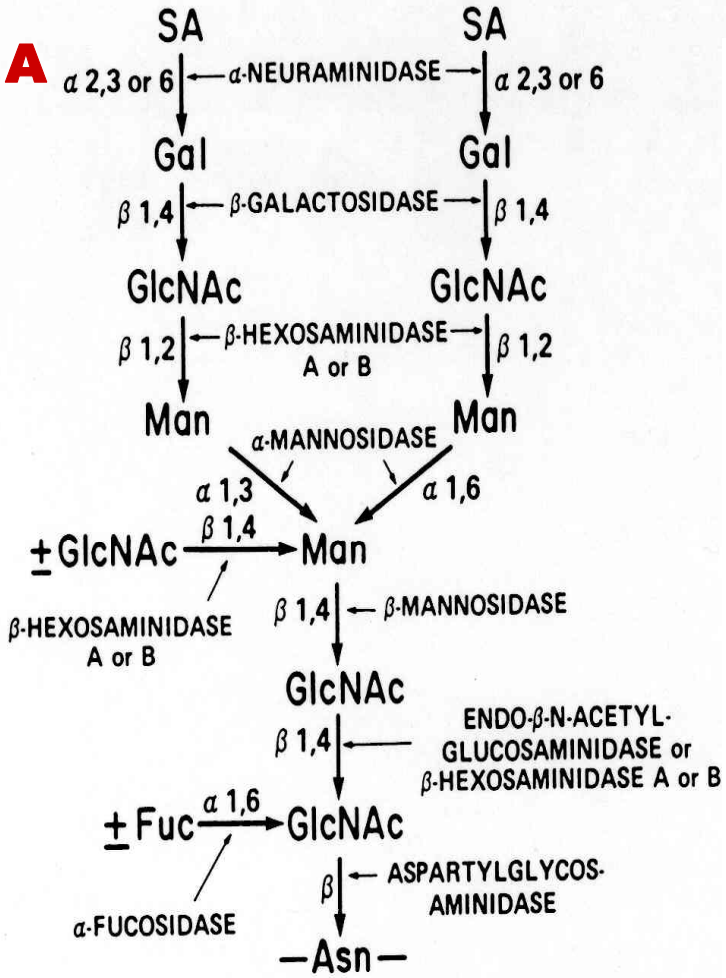
• jejich oligosacharidové struktury jsou postupně odbourávány v lysosomech skupinou exoglykosidas

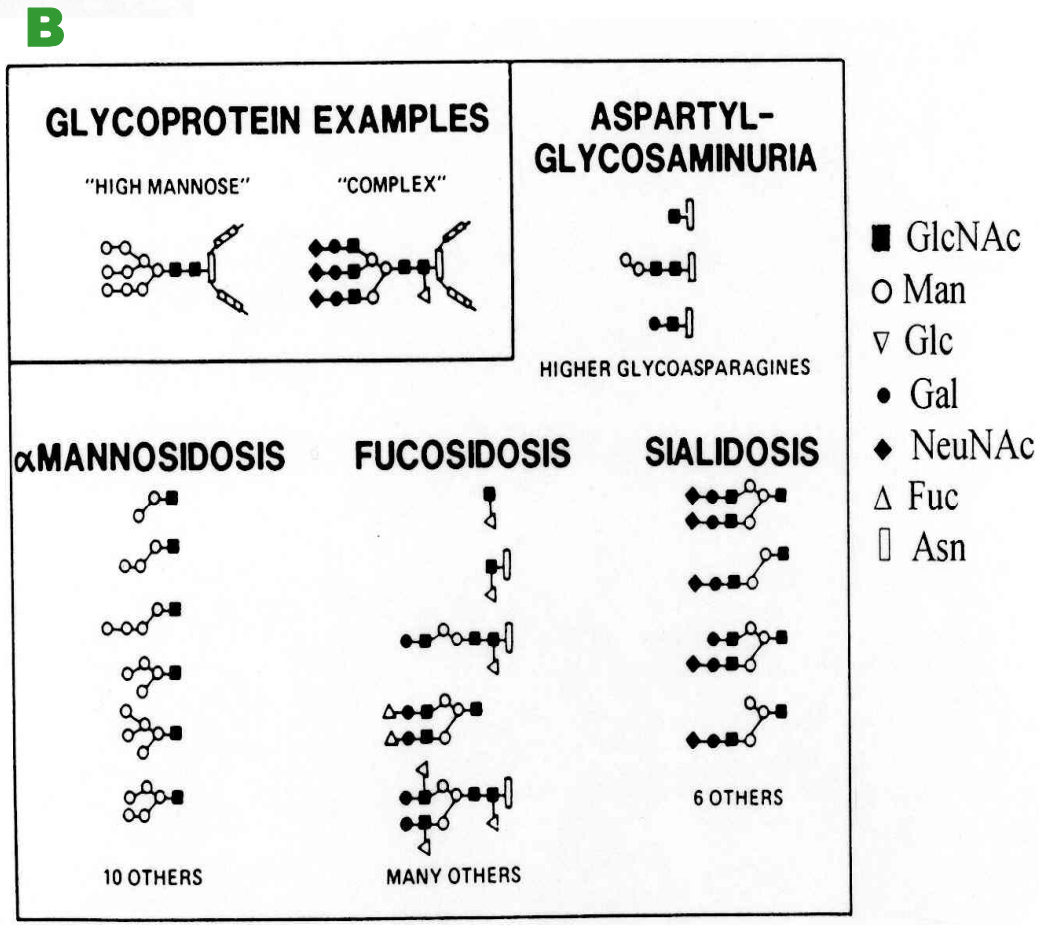
• poruchy degradace vedou k hromadění neodbouraného substrátu v lysosomech a k závažnému metabolickému onemocnění

• hromadí se **nedegradované glykopeptidy, modifikované oligosacharidy a někdy také glykolipidy**

• spektrum částečně degradovaných a modifikovaných oligosacharidových struktury v moči je důležitým diagnostickým ukazatelem.

Postupné odbourávaní komplexních oligosacharidů (A) a příklady oligosacharidových struktur v moči u některých glykoproteinos (B)





Glykoproteinosy

Nemoc / Příčina	**Hromadění glykoproteinů**	**Hromadění glykolipidů**
α-mannosidosa / enzym	hlavní	ne
β–mannosidosa / enzym	hlavní	ne
α–fukosidosa / enzym	hlavní	přítomny
Sialidosa / enzym	hlavní	přítomny
aspartylglukosaminourie / enzym	hlavní	ne
GM1- gangliosidosa / enzym	přítomny	hlavní
Galaktosialidosa/ protekt.protein	hlavní	minimální
Schindlerova choroba/ enzym	hlavní	minimální
GM2-ganglios.(Sandhoff)/enzym	přítomny	hlavní
Mukolipidosa II(III) /postranslační modifikace → transport enzymů	všeobecný defekt	Všeobecný defekt

Glykoproteinosy

Klinické znaky:

- zapadají dobře do obrazu lysosomálních „střádavých“ (storage) nemocí včetně značné variability fenotypu
- zhoršující se průběh, opožďění ve vývoji, postižení CNS, křeče, poruchy sluchu, u některých kožní nálezy aj.
- mohou být přítomny některé rysy mukopolysacharidos (hrubé obličejové rysy, dysostosis multiplex, event. oční nálezy)

Laboratorní diagnostika glykoproteinos

Morfologické vyšetření: vakuolizace cytoplasmy všech typů buněk, inkluse v krevních elementech

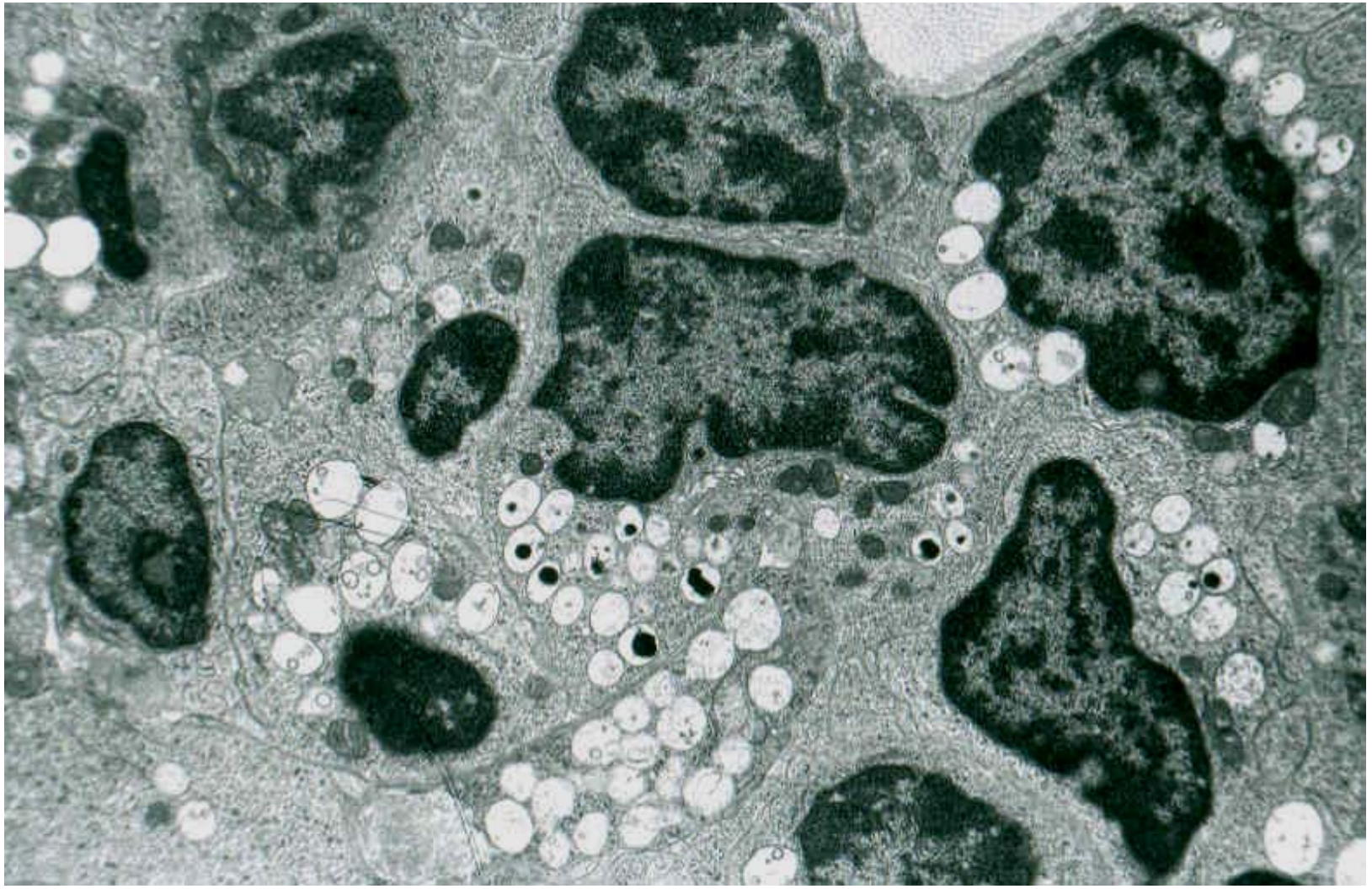
Biochemická analysa:

- **Oligosacharidy v moči:**
  HPTLC detekce orcinol (oligosacharidy obecně)
  resorcinol pro sialyloligosacharidy
  Mírnější formy nemocí s pozdějším nástupem nemusí být zachyceny

- ***Enzymatické potvrzení diagnosy průkazem deficitu aktivity příslušné glykohydrolasy***
  leukocyty periferní krve, kultivované kožních fibroblasty (postnatální dg.), choriové klky a kultivované amniové buňky (prenatální dg.)

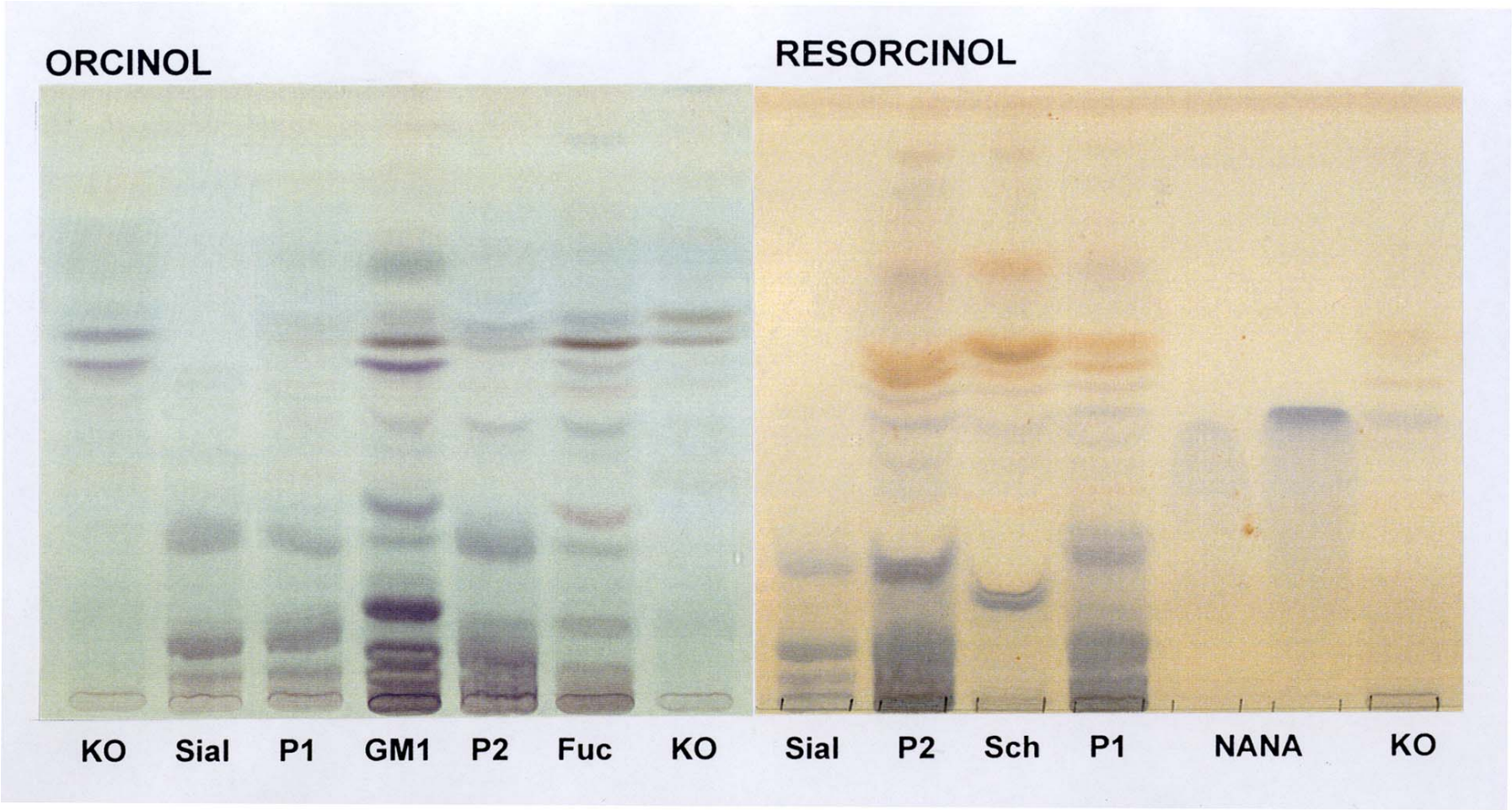
- **DNA analysa:** potvrzení výskytu mutace v genu příslušné hydrolasy, důležité pro genetické poradenství - prenatální dg.

α-mannosidosis



Survey of lymphatic tonsillar tissue

Glykoproteinosy – HPTLC oligosacharidů v moči



Glykogenosy – Pompeho choroba

- porucha degradace glykogenu
- deficit lysosomální α- glukosidasy
- klinické znaky: myopathie, kardiomyopathie, CNS nepostižen,

  infantilní, juvenilní, adultní formy nemoci
- diagnosa: enzymová analysa v leukocytech, průkaz deficitu aktivity (pouze u infantilní formy do 1roku věku)

v kultivovaných kožních fibroblastech (u pozdějších forem)

v CVS, amniových buňkách

- **existuje enzymová terapie**

Lipidosy (Sfingolipidosy)

příčinou jsou poruchy katabolismu sfingolipidů v důsledku mutací v genech specifických **sfingolipidových hydrolas nebo jejich proteinových aktivátorů**

následkem je lysosomální **hromadění** nedegradovaných sfingolipidů, které může být tkáňově specifické

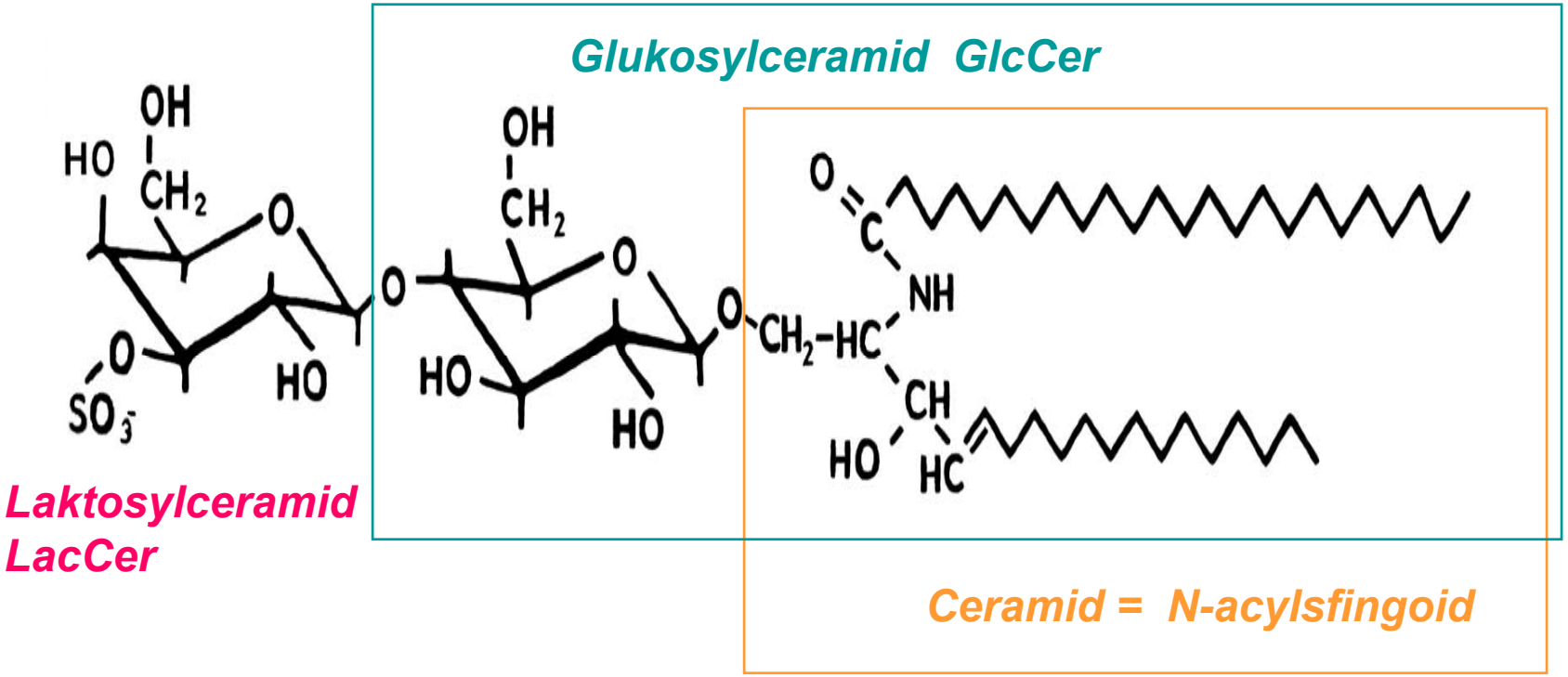
důsledkem jsou **těžká onemocnění**, která se až na výjimky vyskytují v různých klinických variantách: infantilní, juvenilní a dospělé (protrahované) formě

klinické projevy jsou u jednotlivých chorob velmi různé, často je postižen CNS, různé viscerální orgány, mohou být patrné kožní, oční změny, typický je regres vývoje, psychomotorická retadace u dětí a rychlý progres nemoci končící smrtí

kausální **léčba rekombinantním enzymem** existuje u Fabryho a Gaucherovy choroby, připravuje se léčba u NPB.

Co jsou sfingolipidy? Ceramid a jeho deriváty.

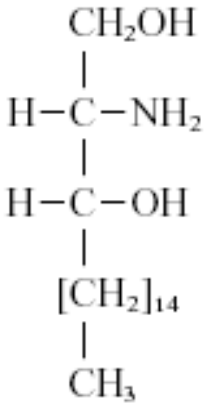
Jsou to komplexní molekuly obsahující lipofilní ceramidovou část a hydrofilní cukernou (nebo fosfocholinovou) část



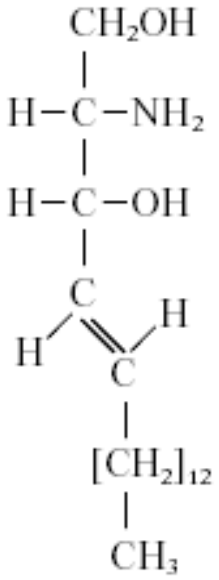
1870-1873 Johann Ludwig Wilhelm Tchudichum: objev sphingosinu, cerebrosidu and sfingomyelinu v mozku – sloučeniny „enigmatic as Egyptian Sphinx“

SFINGOLIPIDY: lipidy obsahující sfingoidní base (sfingoidy, dříve „sfingosinové“ base nebo „ sfingosiny“)

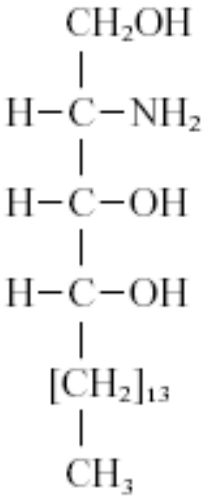
SFINGOIDY, SFINGOIDNÍ BASE (long chain bases, LCB): víceuhlíkaté alifatické aminoalkoholy, skupinové názvy pro sfinganin (D-erythro-2-amino-1,3-oktadekandiol) a jeho homology, stereoisomery, hydroxy- a nenasycené deriváty



I
sphinganine



II
(*E*)-sphing-4-enine
(sphingosine)



III
(*R*)-4-hydroxy-
sphinganine
(phytosphingosine)

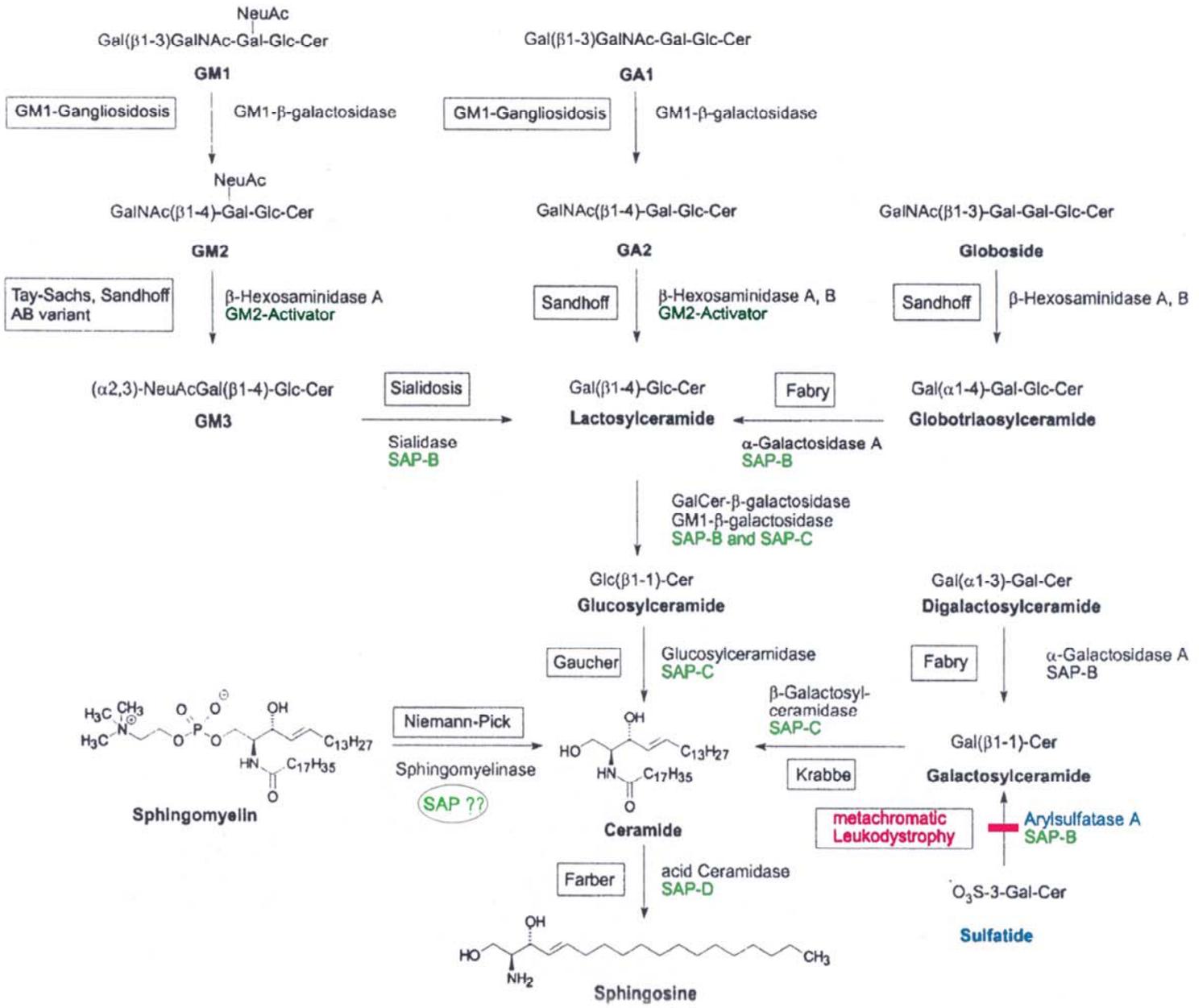
GLYKOSFINGOLIPIDY (GSL): glykokonjugáty obsahující jednu nebo více monosacharidových jednotek vázaných glykosidickou vazbou na hydrofobní, lipidní část (na O-1 sfingoidu nebo ceramidu /N-acylsfingoid/)

SACHARIDOVÁ ČÁST: obsahuje různý počet monosacharidových jednotek (základ 1-4 jednotek), u živočichů především D-glukosu,D-galaktosu, L-fukosu, D-N-acetylgalaktosamin a D-N-acetylglukosamin (neutrální GSL), které mohou být sulfatovány nebo sialovány (kyselé GSL).
Rozdělují se proto skupinově na neutrální (mono-, di-, tri-, tetra- …. glykosylceramidy) a kyselé (gangliosidy a sulfatidy)

FUNKCE SFINGOLIPIDŮ:

- ***jsou významnými komponentami eukaryotní plasmatické membrány, jsou přítomny i ve vnitrobuněčných membránách***
- ***mají důležité funkcestrukturní a integrační, ale také signalisační, receptorové, při vzájemném rozpoznávání buněk aj.***

Schema degradace sfingolipidů



Upraveno podle Kolter,Sandhoff, Annu.Rev.Cell Dev.Biol.2005, 21:81-103

Defekty sfingolipidových hydrolas (a kyselé lipasy) podmíněné primární poruchou enzymového proteinu

enzymy štěpící převážně lipidy (lipidosy n=10)	*substrát*
• ceramidasa (Farber)	ceramid
• sfingomyelinasa (Niemann-Pick typ A/B)	sfingomyelin
• glukosylceramid β-glukosidasa (Gaucher)	glukosylceramid
• galaktosylceramid β-galaktosidasa (Krabbe)	galaktosylceramid
• arylsulfatasa A (MLD, sulfatidosa,)	sulfatid
• α-galaktosidasa A(Fabry)	Gb_3Cer, Ga_2Cer, krevní.sk.B
• GM1-β-galaktosidasa (GM1 gangliosidosa)	GM1 gangliosid, GP
• β-hexosaminidasa (GM2 gangliosidosa)	
defekt řetězce podjednotky A (Tay-Sachs)	GM2 gangliosid
defekt řetězce podjednotky B (Sandhoff)	" a některé GP
• kyselá lipasa (Wolmanova nemoc, CESD) = *lipidosa*	estery cholesterolu

Poruchy sfingolipidových hydrolas

GM1 gangliosidosa : β– galaktosidasa

Substráty GM1 gangliosid, asialoderivát, laktosylceramid, oligosacharidy

Hromadění GM1v neuronech, oligosacharidy v viscerálních orgánech, exkrece v moči

Postižení CNS, regres vývoje

Diagnostika: oligosacharidy v moči, potvrzení průkazem deficitu aktivity v leukocytech,fibroblastech, CVS, amniocytech

GM2 gangliosidosa : β-hexosaminidasa

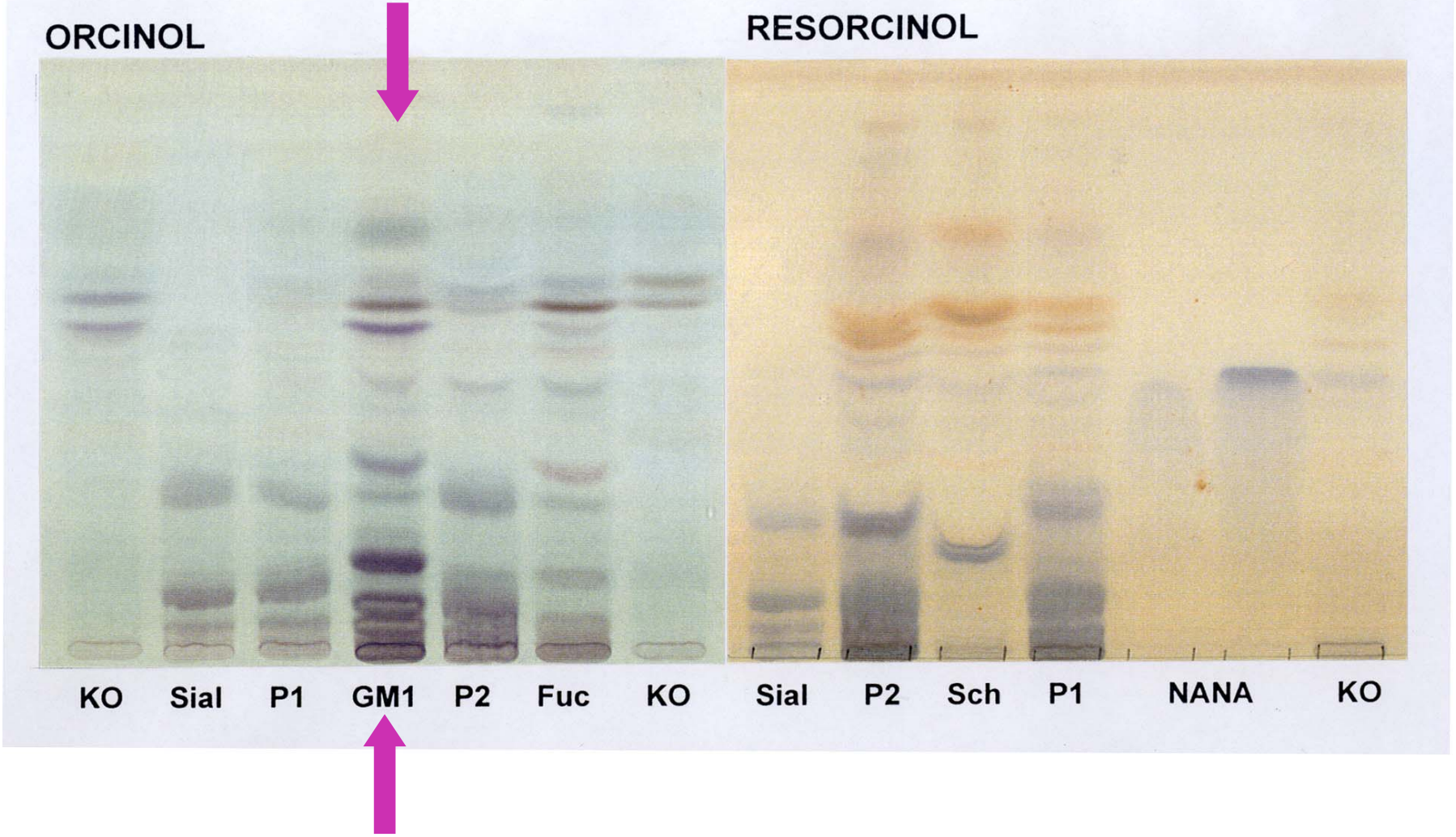
Substrát GM2 gangliosid, hromadění v CNS, PNS

Tay-Sachsova choroba – defekt α –podjednotky enzymu (kódována 15q22>q25)
Sandhofova choroba – defekt obou podjednotek – α, β (β kódována 5q13)

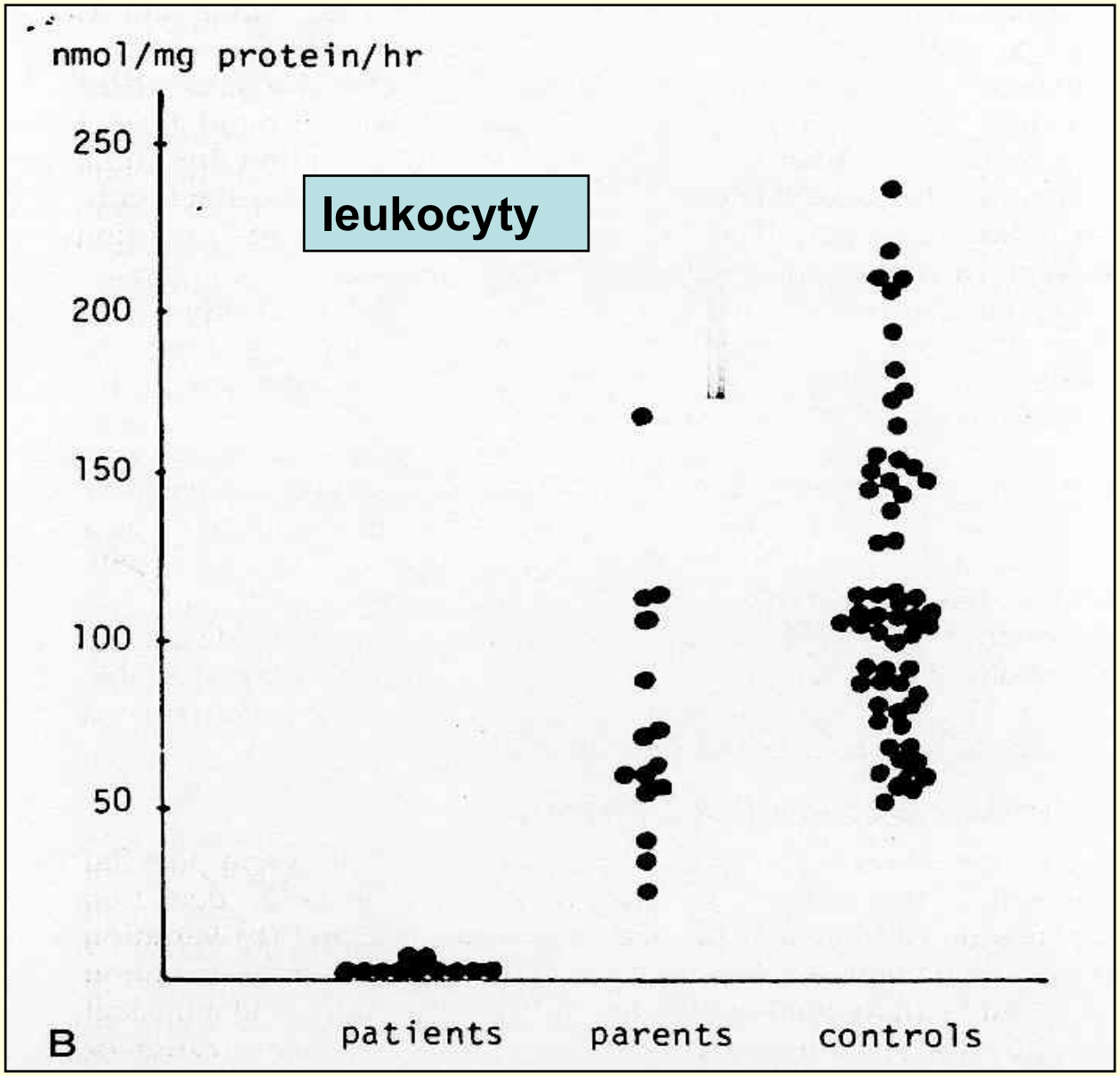
Defekt GM2 aktivátoru

Progresivní psychomotorická retardace, může být třešňová skvrna na očním pozadí

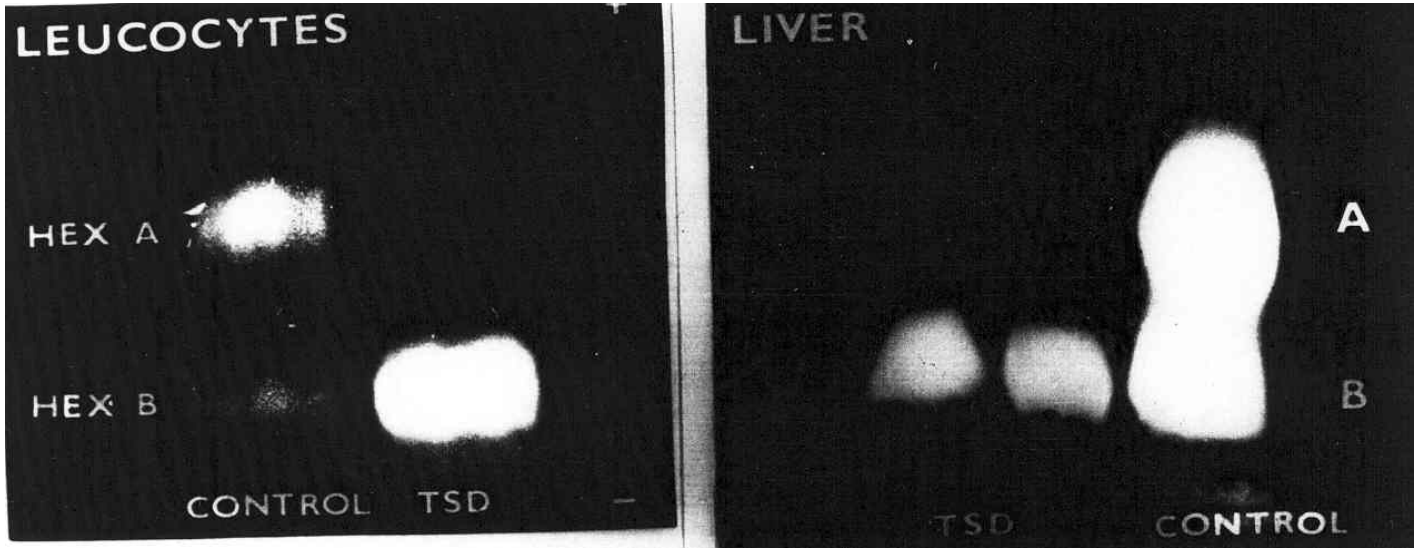
GM1 gangliosidosa – HPTLC oligosacharidů v moči



Aktivity β-galaktosidasy u pacientů s GM1 gangliosidosou



ELFO hexosaminidas: Tay-Sachsova choroba

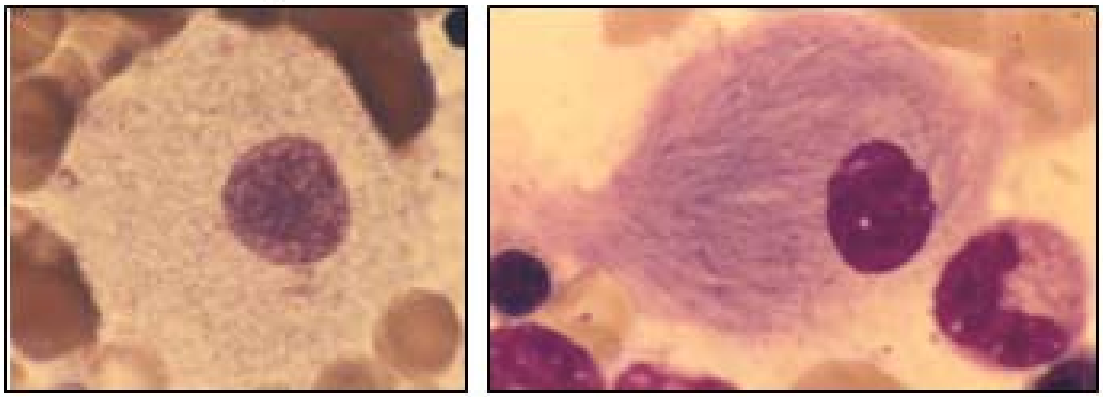


Gaucherova nemoc: deficit aktivity β-glukocerebrosidasy

(syst.název D-glucosyl-N-acylsphingosine glucohydrolase , EC 3.2.1.45)

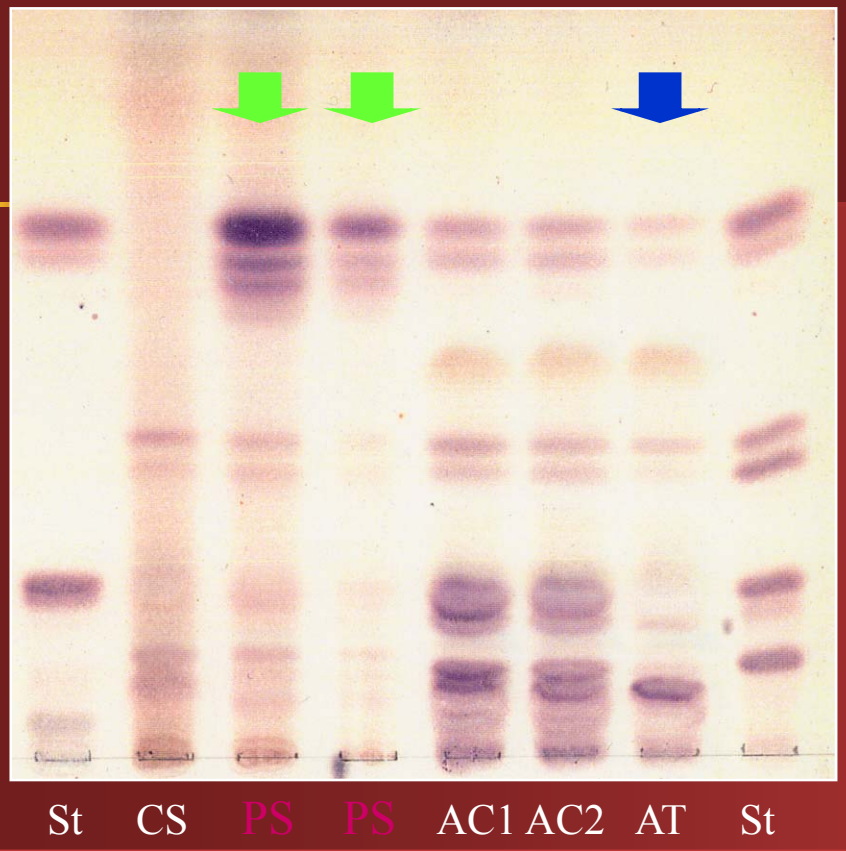
- **gen (*GBA)* na chromosomu 1 (q21), 11 exonů, 7 kb; množství mutací, některé prevalentní (Aškenazim Židé, švédská Norrbottnian populace)**
- **substrát glukosylceramid a jeho lysoderivát (glukosylsfingosin)**
- **hromadění v buňkách makrofágového původu, Gaucherovy buňky, slezina, játra, plíce**
- **klinické znaky: trombocytopenie, anemie, hepatosplenomegalie, postižení kostí, neurodegenerace, tři klinické varianty: chronický viscerální-typ 1, akutní neuronopathický-typ 2, chronický neuronopathický-typ 3**
- **Incidence 1:7000-10000, častý výskyt u Aškenazim Židů**
- **Diagnostika: aktivita enzymu v leukocytech, fibroblastech, CVS, amniocytech**
- **Terapie : enzymová modifikovaným placentárním (aglucerasa) nebo rekombinantním (ceredasa) enzymem**
  inhibitory biosynthesy glykolipidů
- **β-glukocerebrosidasa není přenášena M6P cestou, ale prostřednictvím mannose-dependent Ca^{2+} independent receptorů (do sinusoidů jater a sleziny),**
- **prakticky žádný enzym se nedostává do Gaucherových buněk (makrofágů zejména BM), tato cesta je nevyjasněna**

Příklad Gaucherovy buňky



cytologic variants of lysosomal storage

Gaucher disease



Detection: orcinol

CS= control spleen, PS = susp.GD patient spleen (two concentrations of one sample),
St= Standards of glycolipids

AC1,2 = control cultured amniotic fluid cells, AT = amniotic cell tested (prenatal diagnosis of PSAPD, see Fig.2)

Blue arrow indicates cultured amniotic fluid cells analyzed for glycolipid content in the next pregnancy in the family with PSAPD (see Fig.2). No storage was found.

Fig.3. Glucosylceramide (GlcCer) storage in the spleen of unrecognized case of Gaucher disease (green arrows). The result was of crucial importance for prenatal dg. in the next pregnancy.

Original dg. :hydrops fetalis, stillbirth

Fabryho choroba: deficit α-galaktosidasy A,

(přenos vázaný na X-chromosom)

- **Substráty globotriaosylceramid, digalaktosylceramid (galabiosylceramid), glykolipidy krevní skupiny B**
- **Hromadění v myokardu, ledvinách, lymfatických uzlinách, plicích, fibroblastech aj., exkrece v moči**
- **Klinické znaky: onemocnění srdce a ledvin, zákal rohovky, angiokeratomy, akroparesthesie,**
- **Incidence 1: 40 000, v ČR patří k nejčastějším sfingolipidosám spolu s Gaucherovou nemocí (diagnostikováno kolem 100 pacientů, mužů 45)**
- **Nemoc má pouze adultní formu (jako jediná z lysosomálních enzymopathií)**
- **Existuje cílená enzymotherapie rekombinantní α-galaktosidasou**
- **Diagnostika: stanovení aktivity v leukocytech, fibroblastech, CVS,amniocytech**

Je zavedena DNA diagnostika – velmi účinná při vyhledávání přenašeček v rodinách

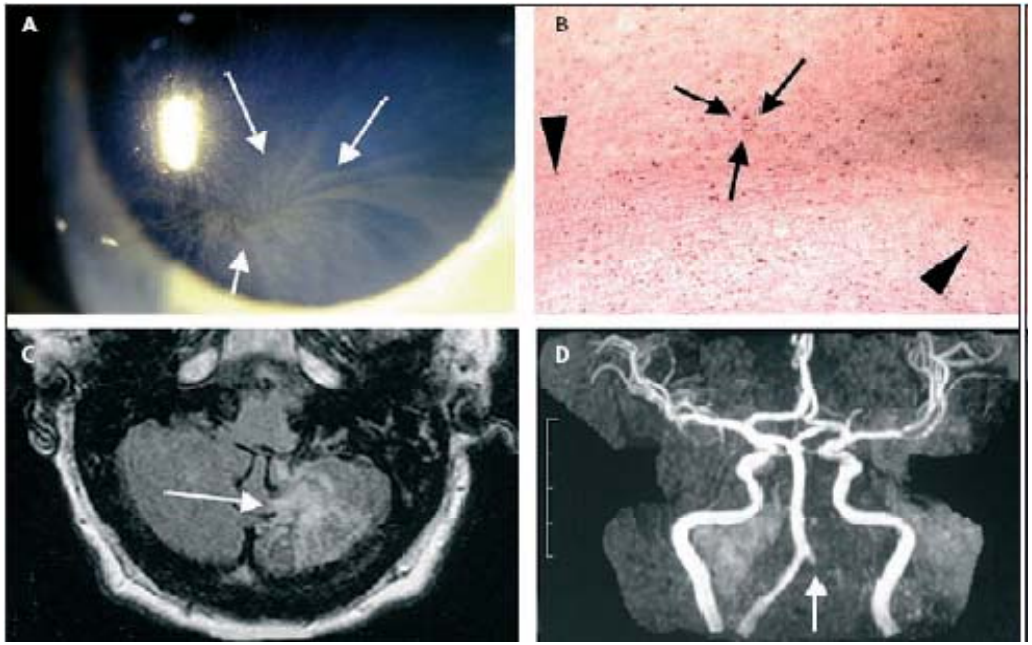
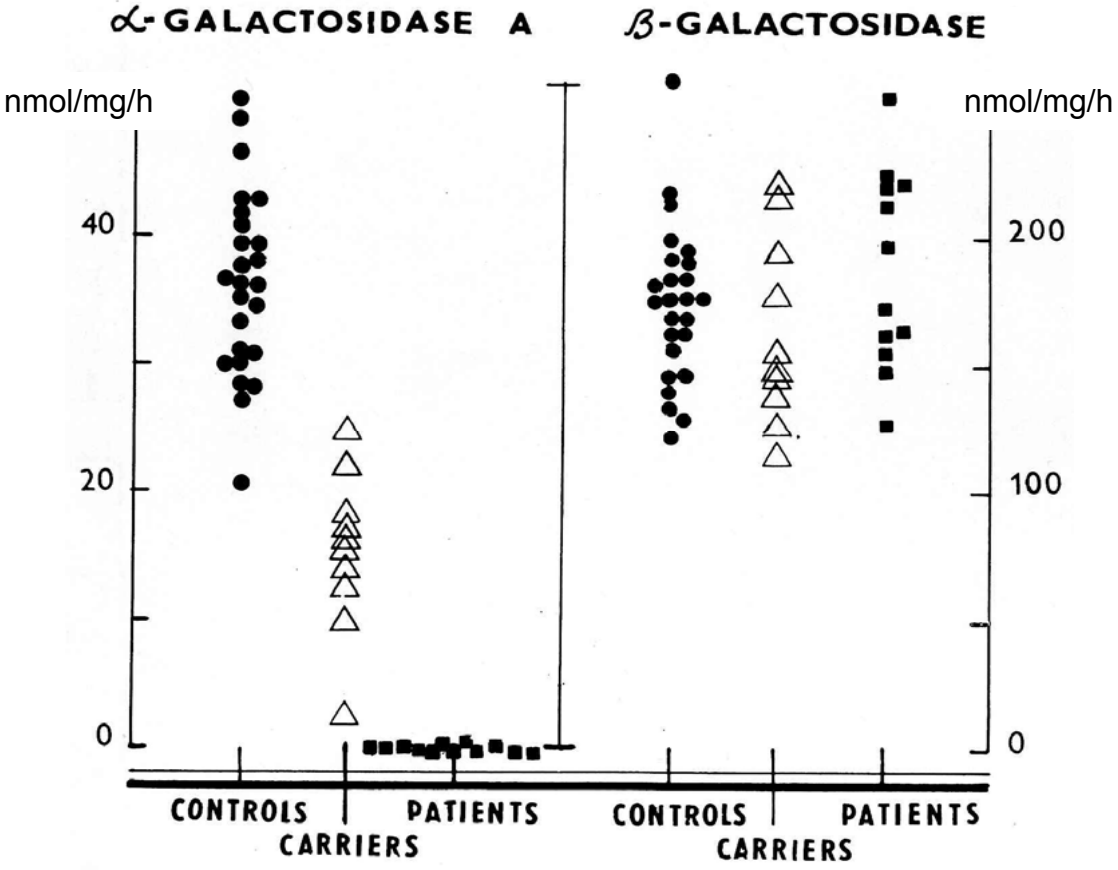


Figure: Hallmarks and complications of Fabry's disease

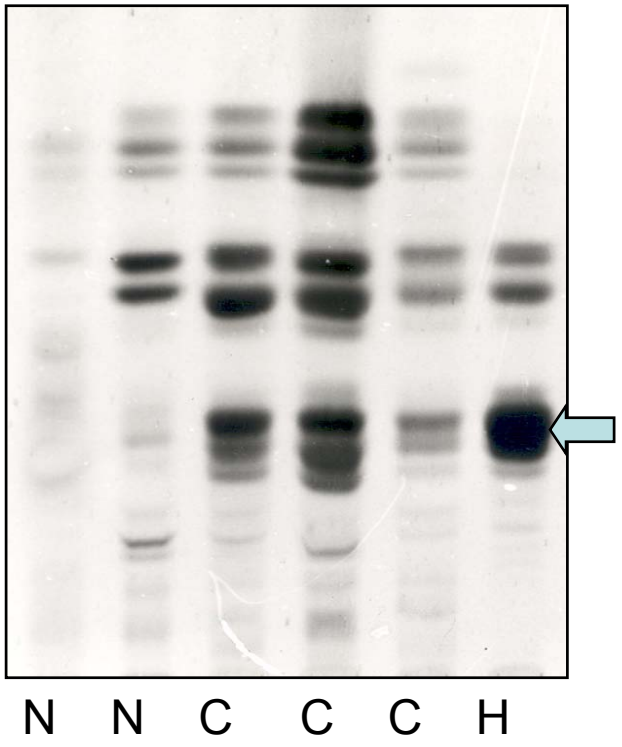
Fabry's disease is phenotypically heterogeneous and organ damage can be isolated or extensive. Diagnostic suspicion arises by revealing more specific findings, such as cornea verticillata (A, whorl-shaped cream-coloured corneal clouding, arrows) or angiokeratoma (B, multiple, small, black-red single [arrowheads] or clustered papula with minimal hyperkeratosis [arrows]). Goal is to prevent late-stage complications, such as stroke. Left cerebellar hemisphere stroke (C, fluid-attenuated inversion recovery MRI, arrow) was caused by occlusion of left vertebral artery (D, MRI angiogram, arrow) in 47-year-old man with Fabry's disease.

Schiffmann R. www.thelancet.com Vol 366 November 19, 2005

FABRY DISEASE

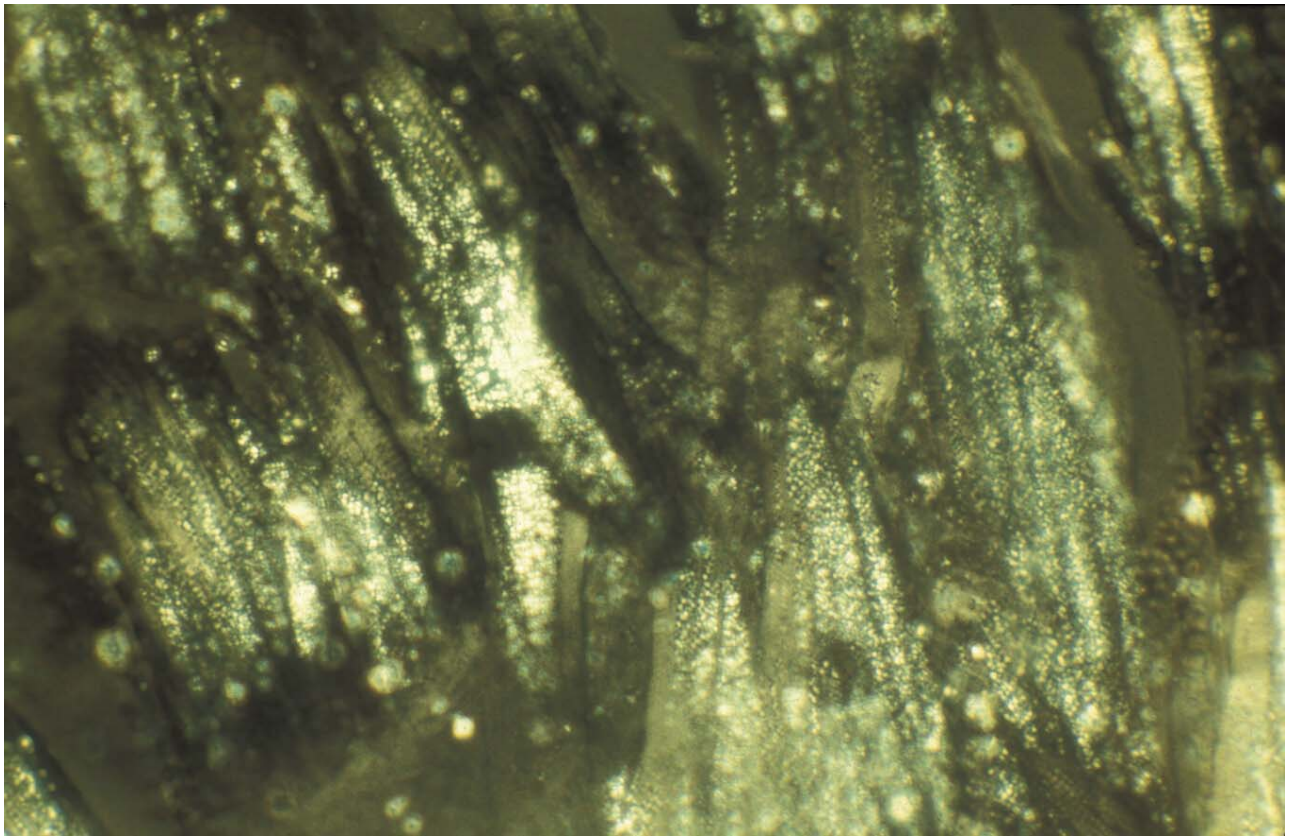


Enzyme activities in leucocytes



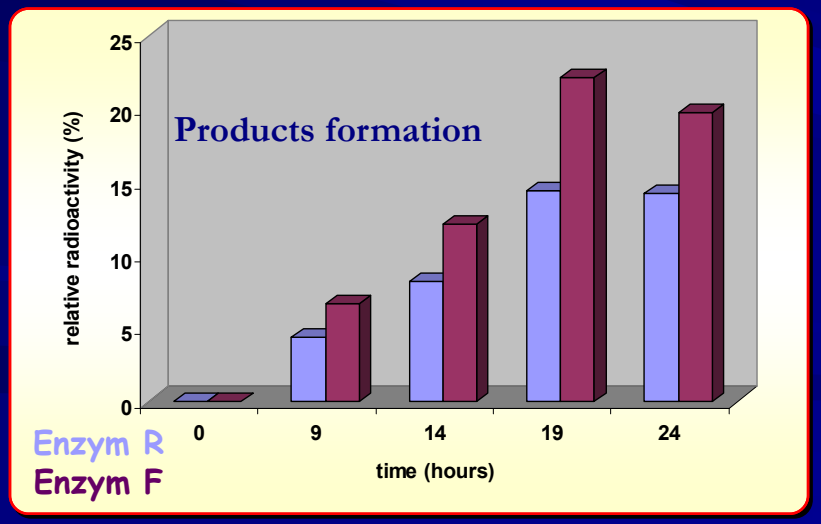
Glycolipids in urine
N= normal C=carrier H=hemizygot

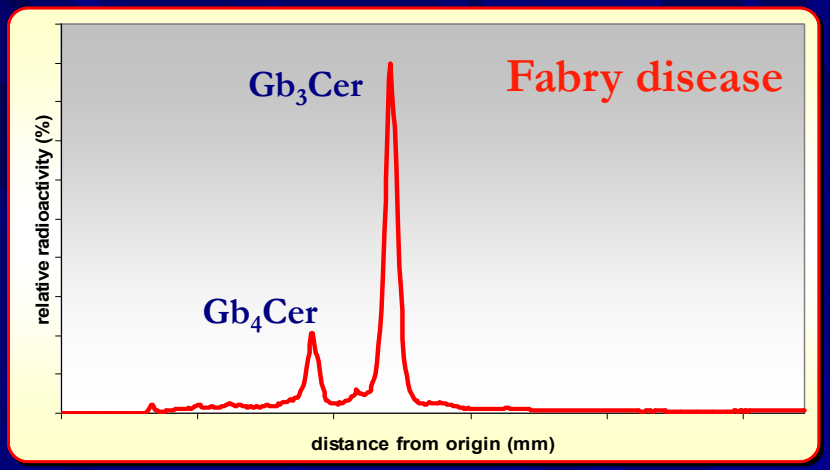
Deposita lipidu (Gb3Cer) dávající v polarizovaném světle fenomen „maltézských křížů“ v lysosomech u Fabryho choroby

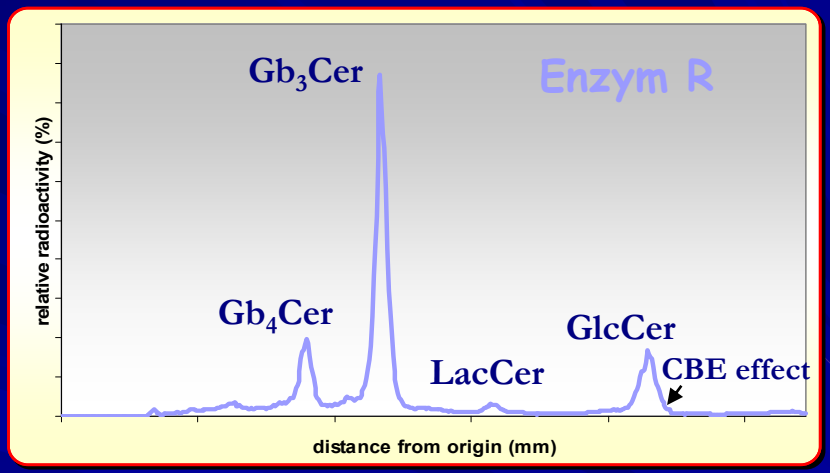


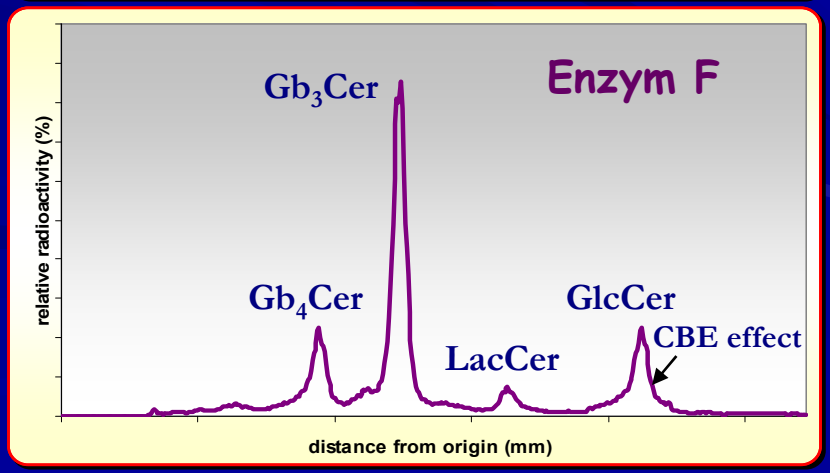
srdeční sval – fixovaná tkáň

Degradace Gb_3Cer ve fibroblastech pacienta s Fabryho chorobou před a po aplikaci rekombinantní α-galaktosidasy A (tvorba degradačních produktů LacCer a GlcCer)









Metachromatická leukodystrofie, sulfatidosa, deficit arylsulfatasy A (ASA)

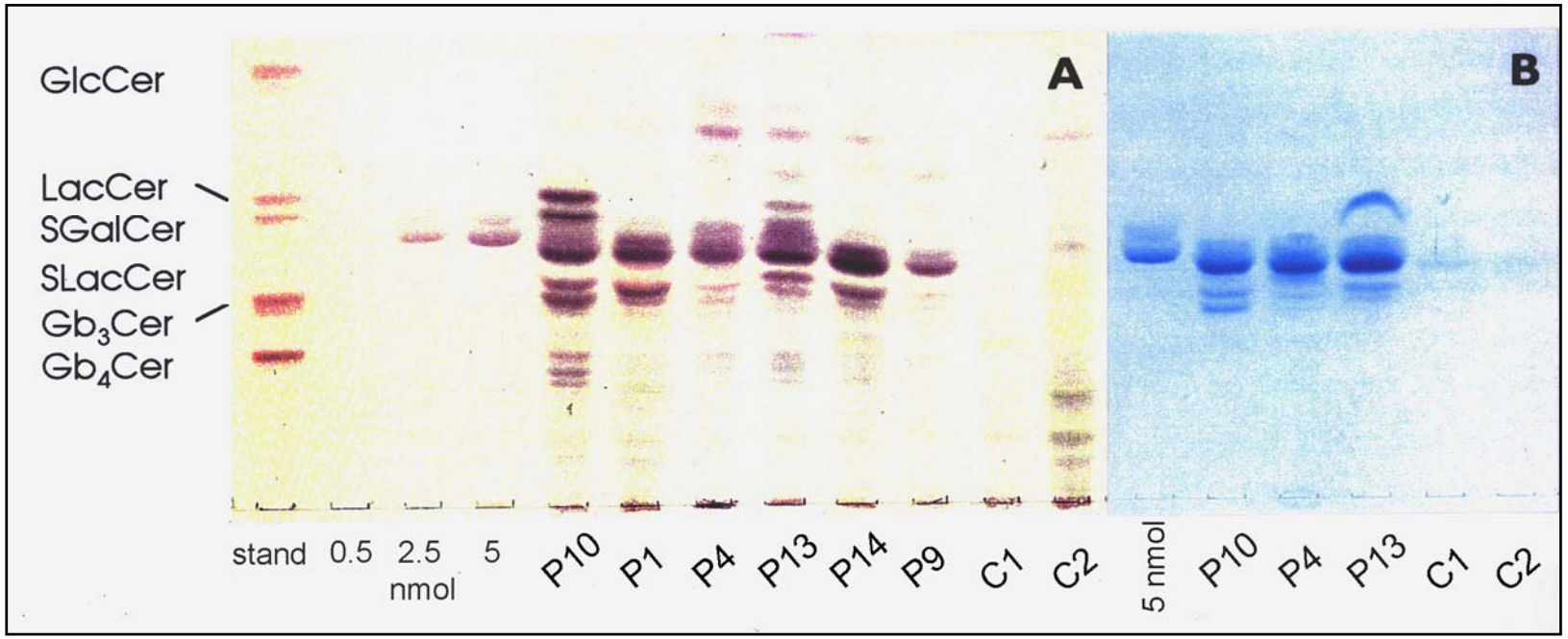
- **Substrát: sulfatid**
- **Hromadí se v mozku (demyelinisace), ledvinách, žlučníku, játrech, exkrece v moči**
- **Klinické znaky: postižení PNS,CNS, tři varianty podle začátku onemocnění**
- **Diagnostika:**

  analysa sulfatidů v moči (rovněž histochemický průkaz metachromasie)

  stanovení aktivity ASA v leukocytech,fibroblastech, CVS, amniocytech

  Je nutné vyloučení pseudodeficitu (DNA analysa, sulfatidy v moči)
- **Cílená terapie neexistuje, pokusy s BMT úspěšné jen u protrahovaných forem,**
- **Prevence je v prenatální diagnostice**
- **DNA analysa je zavedena - velmi účinná také pro zjišťování pseudodeficitní alely**

Sulfatidy v moči u pacientů (P) se sulfatidosou (C1,2=kontroly)



Pseudodeficit ASA

(mutace v genu zachovávající dostatečnou residuální aktivitu enzymu, nedochází ke klinické manifestaci choroby)

Snížená aktivita enzymu u klinicky zdravých jedinců:

- ***in vitro*** **(leuko, fibro, plasma):**
  - **snížená afinita k syntetickému substrátu**

- ***in vivo:***
  - **zvýšená degradace enzymu v buňkách (Tay-Sachs, MPS VII)**
  - **snížená produkce mRNA (MLD)**

2 mutace: Asn350Ser (AAT>AGT)

A→G v poly A signálu (aataac>agtaac)

Zjištění pseudodeficitu má zásadní význam pro prenatální diagnosu !

Niemann-Pickova choroba typ A/B, deficit kyselé sfingomyelinasy

sfingomyelin cholinfosfohydrolasa, EC 3.1.4.12

• substrát **sfingomyelin a jeho lysoderivát**

• hromadění v játrech a slezině, lymfatických uzlinách, také v mozku, ledvinách, plicích …

• sekundárně zvýšení cholesterolu , BMP a některých glykolipidů v tkáních

• klinické znaky: hepatosplenomegalie, neurodegenetirativní onemocnění

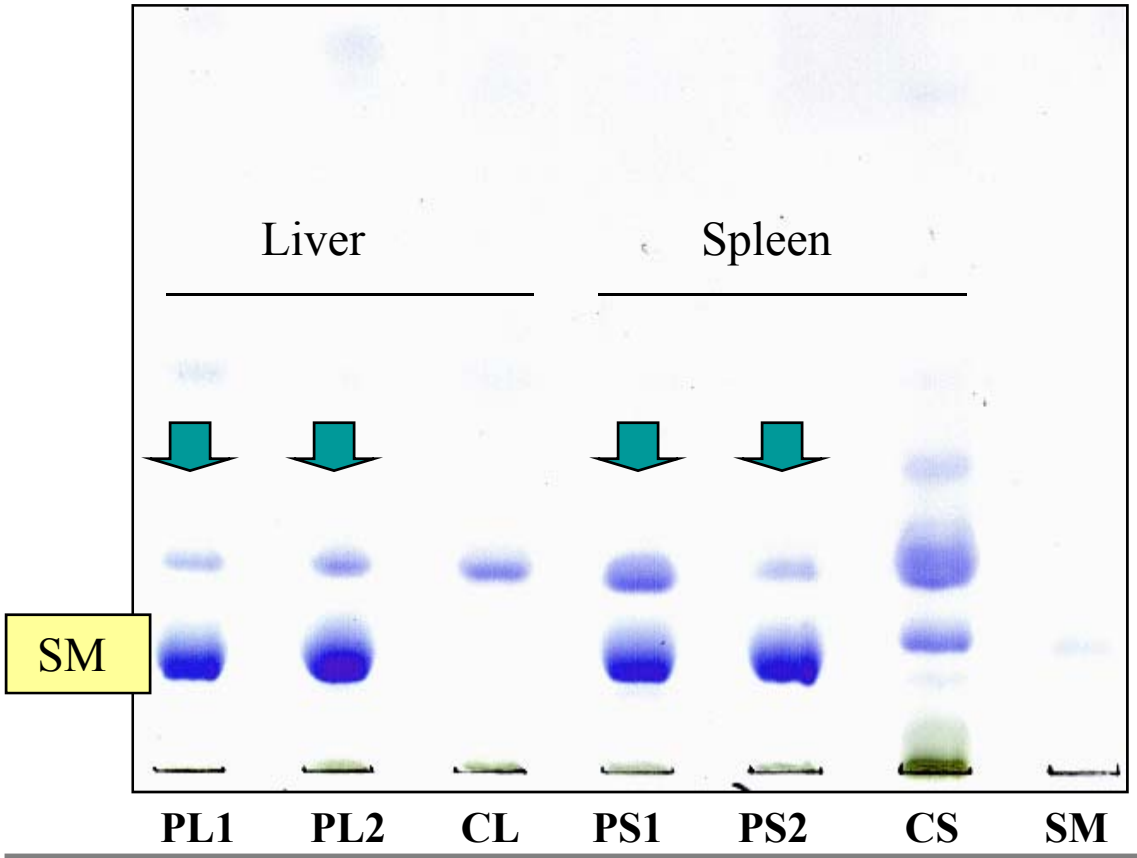
značná fenotypická variabilita – od mírného fenotypu B typu do velmi těžkého A typu s řadou přechodných forem s atypickým fenotypem („česká“ mutace Q292)

Diagnostika: aktivita enzymu v leukocytech, fibroblastech, CVS, amniocytech

Kausální léčba u typu B choroby rekombinantním enzymem se připravuje

DNA diagnostika je zavedena (vyhledávání heterozygotů v rodinách)

Niemann-Pick type A (NPA)



Detection: Phosphorus (molybdate blue)

PL1,2 = cases 1 and 2 (liver)
CL = control liver (SM was under limit of detection)

PS1,2 = cases1 and 2 (spleen)
CS = control spleen

Note: applied aliquots of tissues of patients were only one fifths of those of controls

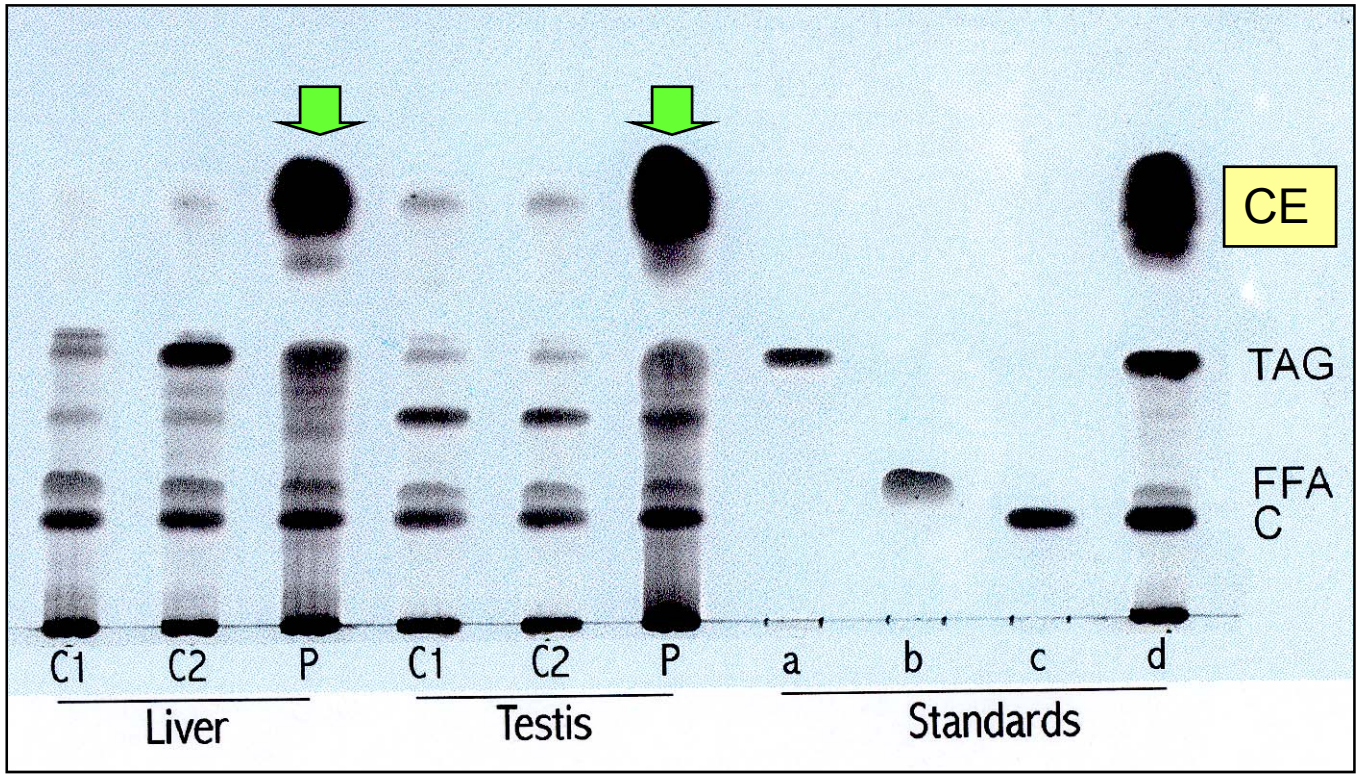
Sphingomyelin (SM) storage in two unrecognized cases of Niemann-Pick disease type A (green arrows)

Original dg.: unspecified storage disease

Deficit aktivity lysosomální kyselé lipázy
(Cholesterol ester storage disease, CESD)

- lysosomální (kyselá) lipáza E.C.3.1.1.13
- ubikviterní enzym hydrolysující CE a TAG
- hlavní známý zdroj substrátu: endocytosa lipoproteinů
- *obligátně* jsou postižené tkáně s konstitucionálně vys. endocytosou LDL
  (hepatocyty, steroidogenní tkáně)
- *fakultativně* histiocyty (oxidované lipoproteiny)

Cholesterol ester storage disease (CESD)



Detection: $CuSO_4$-H_3PO_4

CE = cholesterol esters, TAG = triacylglycerols,

FFA = free fatty acids

C = free cholesterol

Fig.5. Cholesterol ester storage in tissues of unrecognized case of adult type of CESD (green arrows)

Original dg.: atherosclerosis, liver carcinoma

Elleder M. Čas.Lék.čes. 138(1999)719-724

Lysosomální enzymopatie z poruchy funkce proteinového aktivátoru: (n =5+1)

deficit prosaposinu (prekursor saposinů),

publikováno 6 případů na světě

deficit SAP A

deficit SAP B

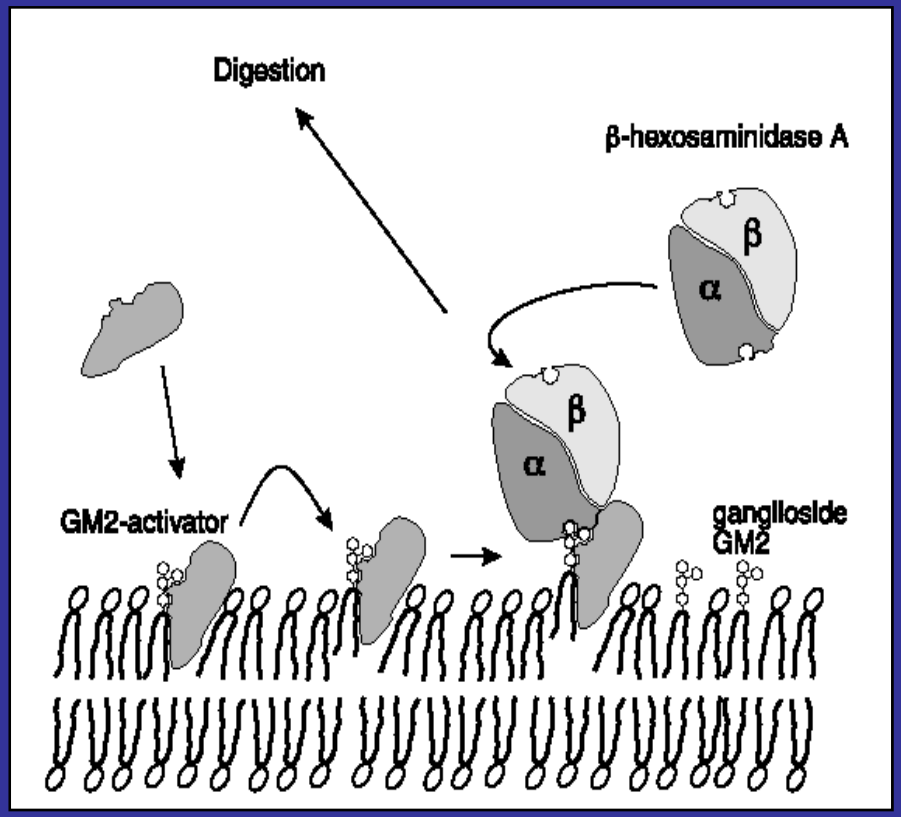
deficit SAP C

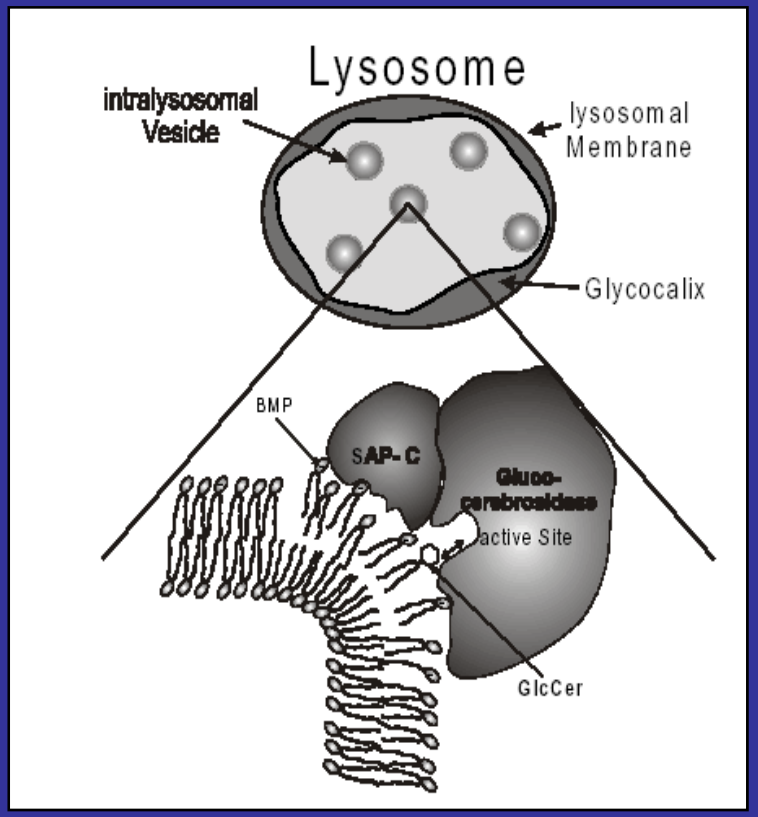
(deficit SAP D – jen na myším modelu)

deficit aktivatoru β-hexosaminidasy (GM2 aktivátor)

- **Jednotlivé saposiny (*s*fingolipid *a*ctivator *p*roteins, ~20kD) vznikají z prekursoru proteolyticky ve stadiu časných endosomů**
- **Deficity jednotlivých aktivátorů (GM2, SAP B, SAP C) připomínají fenotypicky odpovídající enzymový deficit (GM2 gangliosidosa, MLD/Fabry, Gaucher)**
- **Deficit prosaposinu je těžká komplexní sfingolipidosa**

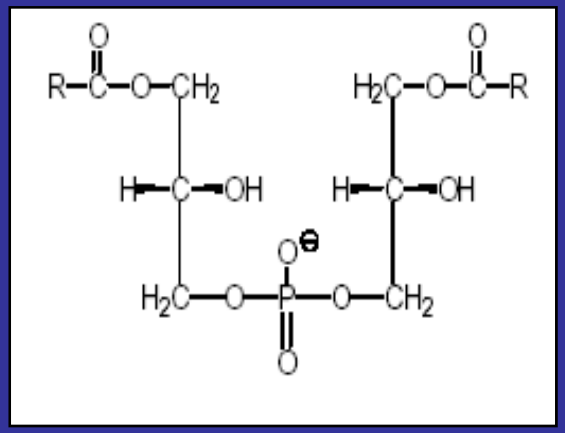
Funkce proteinových aktivátorů sfingolipidových hydrolas





GM2 aktivátor vyzdvihuje glykolipid (GM2 gangliosid) z membrány

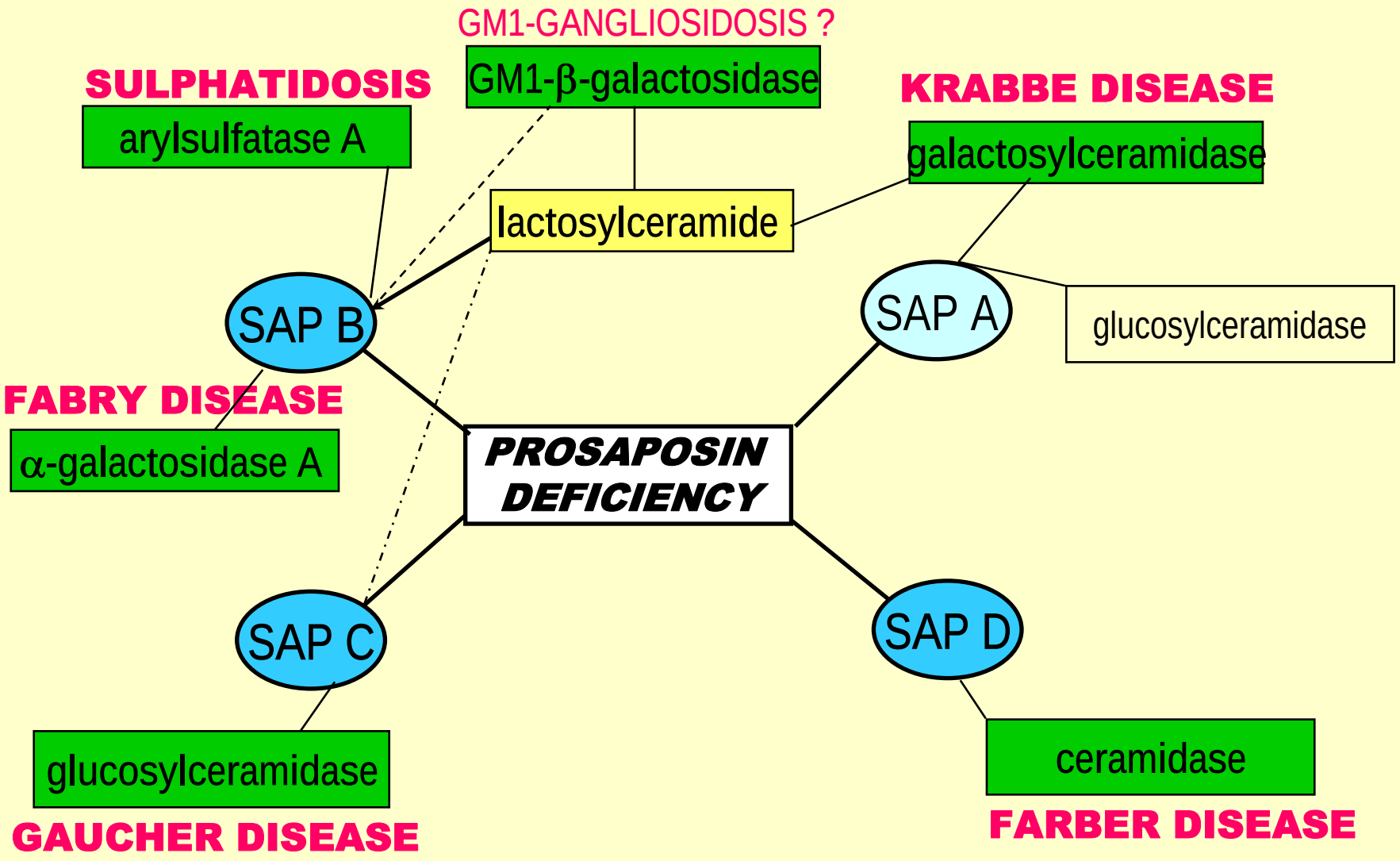
Na stejném principu funguje Sap-B



Sap-C tvoří nejprve komplex s enzymem a BMP

Podle Kolter T., Sandhoff K. Brain Pathology 1998, 8: 79-100

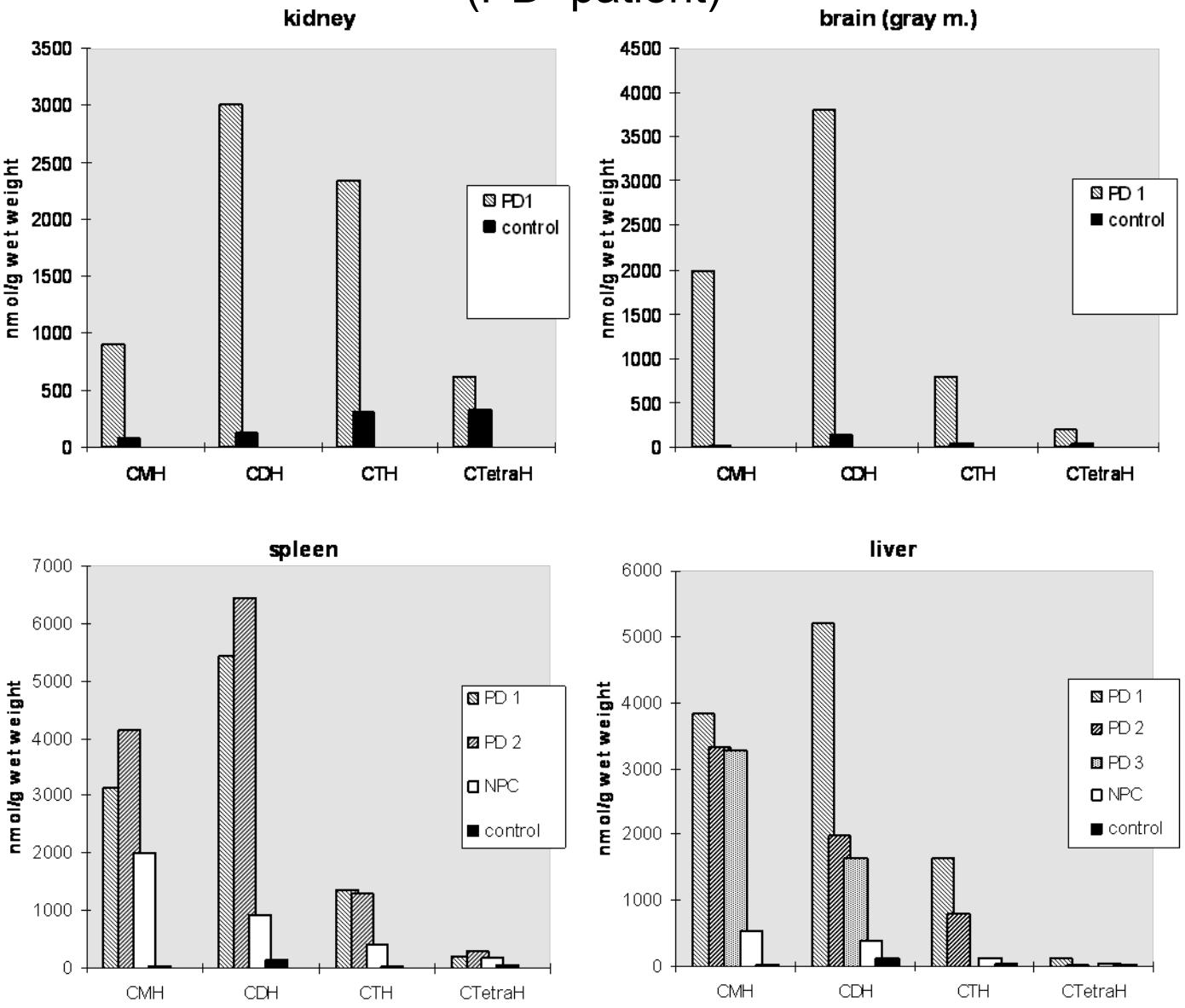
Podle Wilkening G et al. J Biol Chem 1998, 273:30271-78



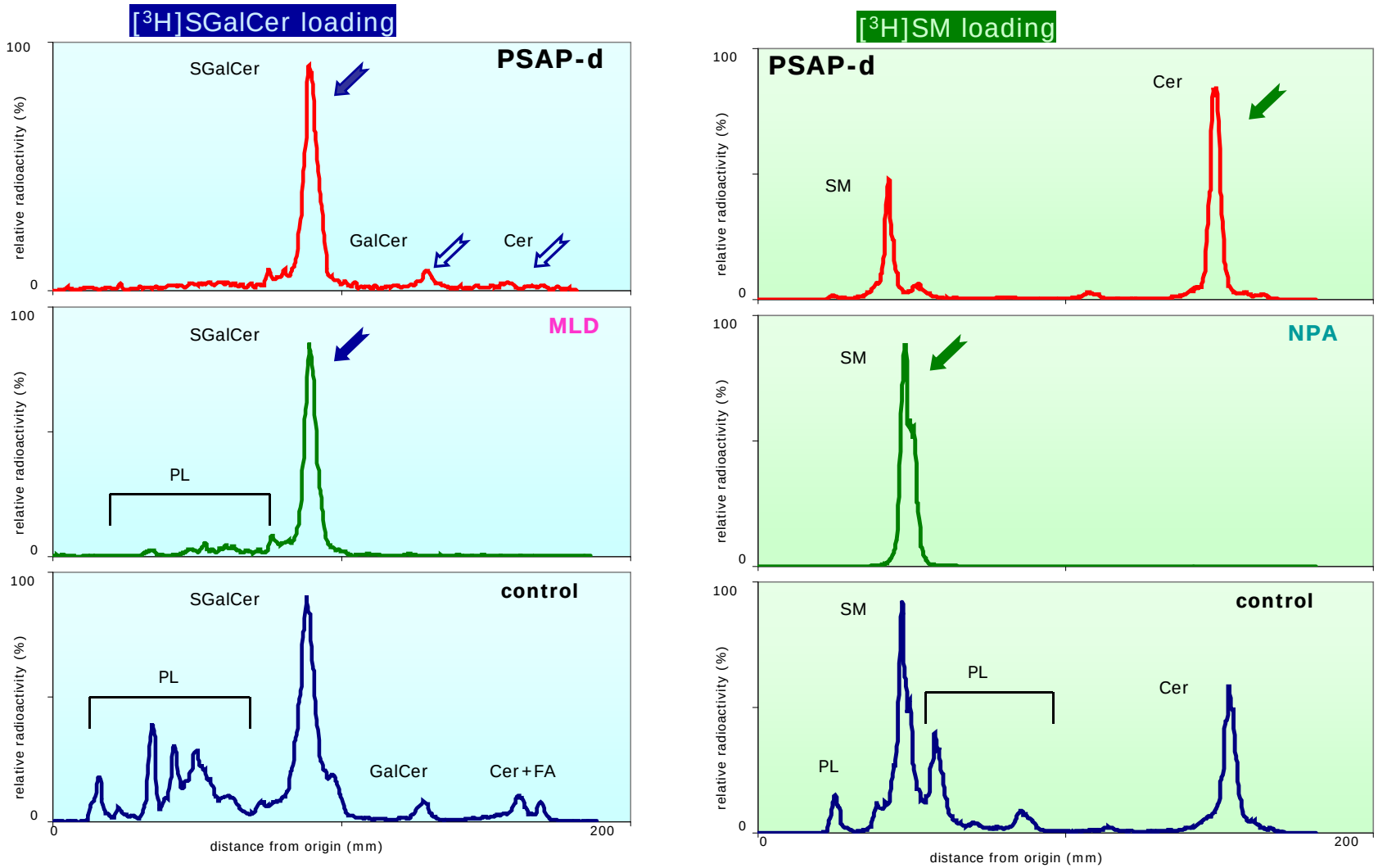
SPHINGOLIPIDOSIS MULTIPLEX

Glycosphingolipids in PSAP-d tissues

(PD=patient)



Rutinní enzymologií in vitro v přítomnosti detergentů nelze defekt prokázat, diagnostický význam mají funkční studie v kultuře fibroblastů se značenými sfingolipidy



Lysosomální enzymopatie v důsledku:

- ***chybné posttranslační modifikace lysosomálních enzymů*** (n =2)

polysulfatásový deficit – chybí enzym, který v ER konvertuje v doméně katalytického aktivního místa společného všem 12 sulfatasam *cystein na formylglycin*

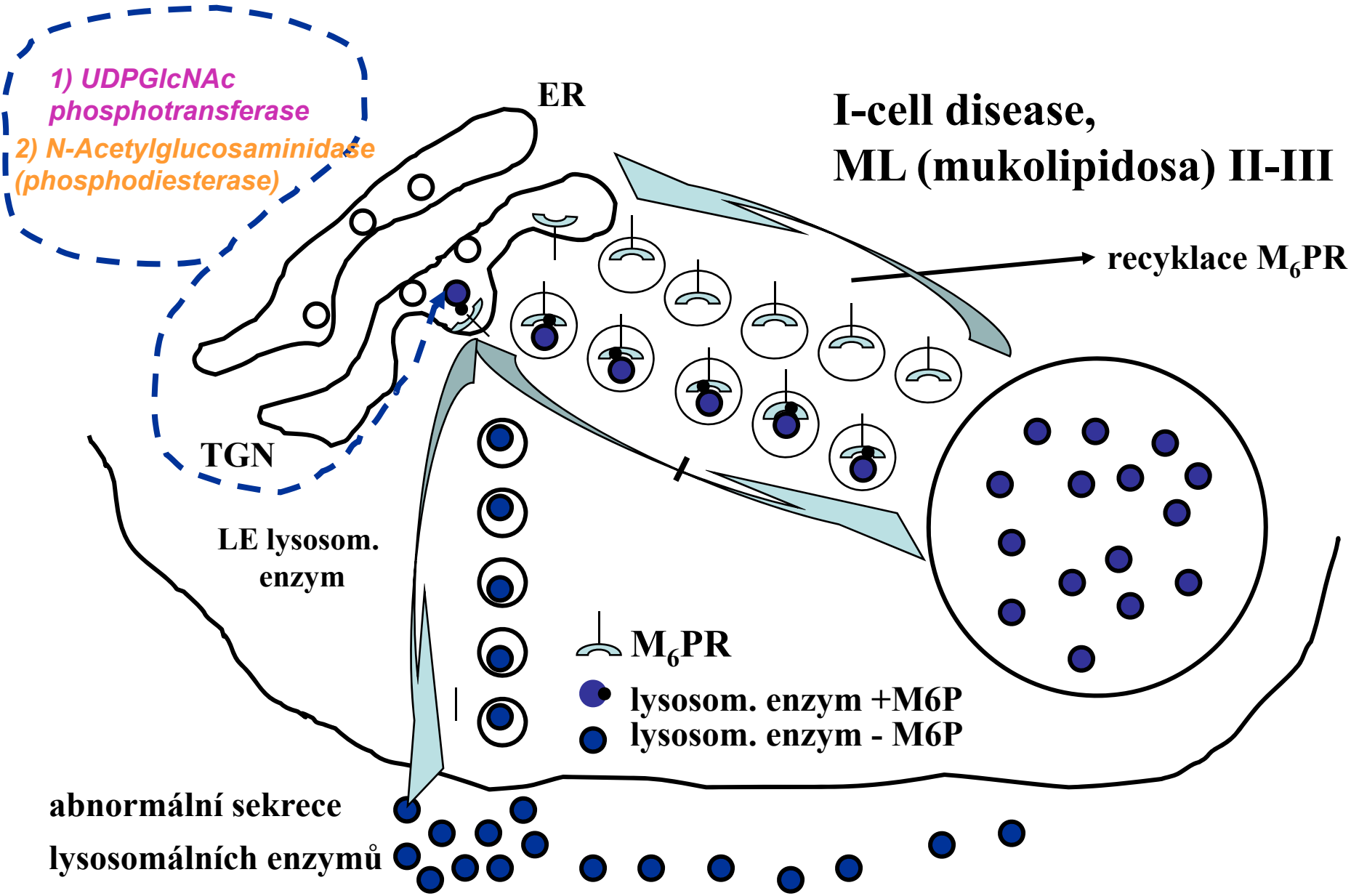
ML II – chybný transport enzymů v důsledku nefunkční UDP-GlcNAc:lysosomální enzym GlcNAc-1- fosfotransferasy

- ***destabilisace enzymového komplexu (n=1)***

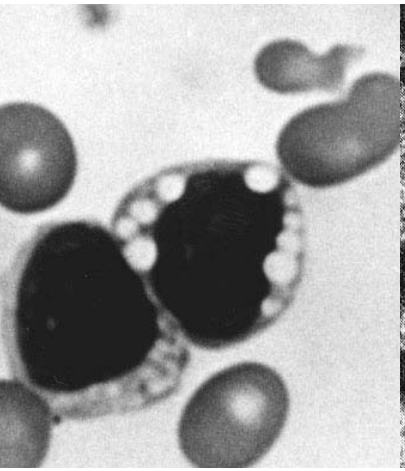
galaktosialidosa (deficit kathepsinu A = *multifunkční enzym s deamidasovou/esterasovou aktivitou*)

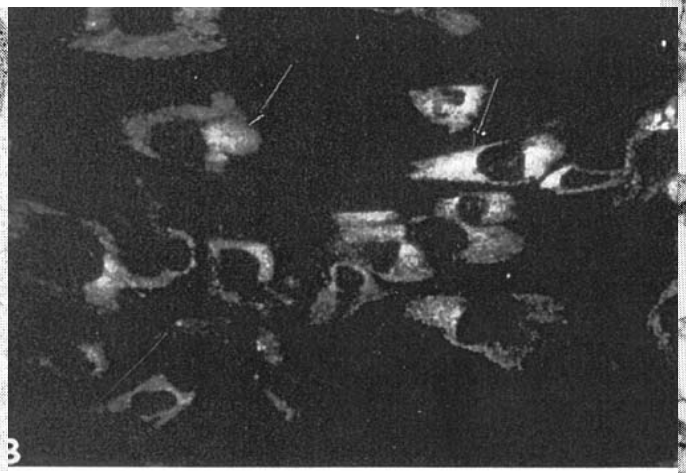
Defekt posttranslační úpravy-

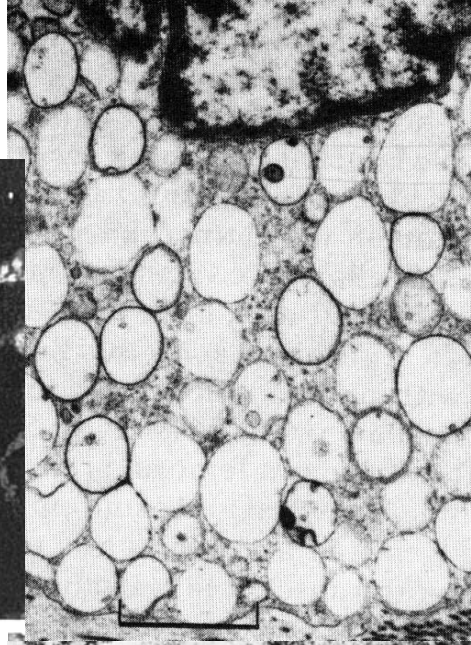
chybné cílení lysosomálních enzymů do lysosomů



Mukolipidosa II – I cell disease

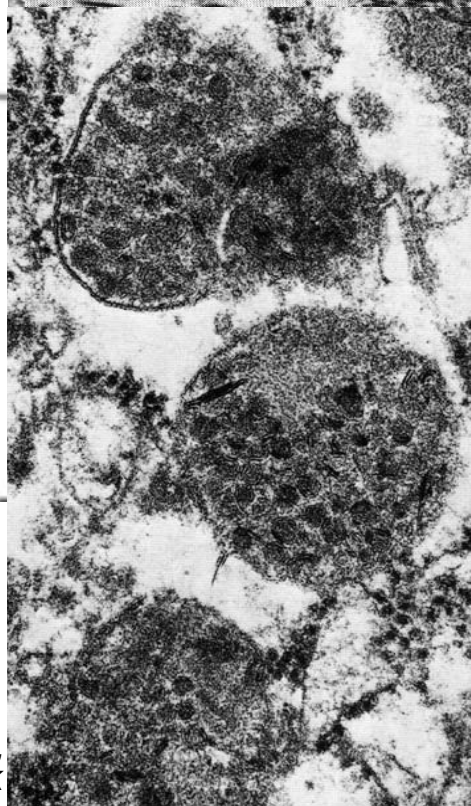






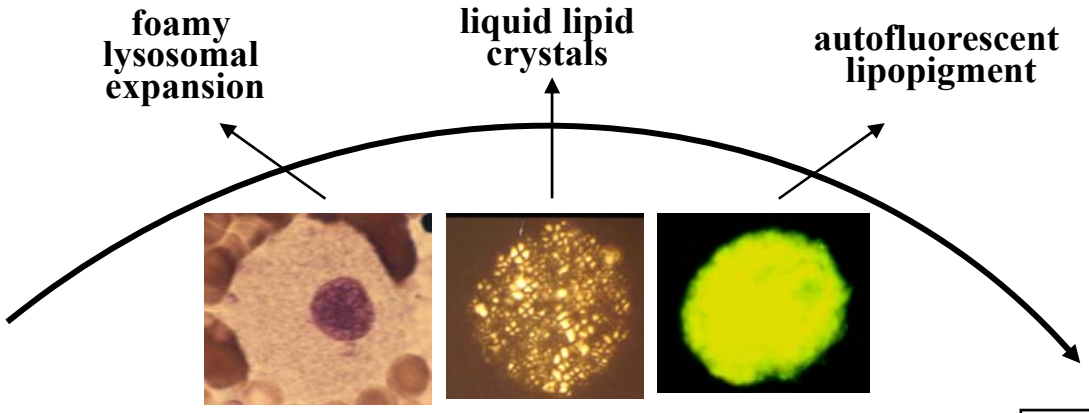
Tab. 1. Aktivity lysozomálních hydroláz v séru pacienta s dg. mukolipidóza II (v nmol/ml . h)

	PACIENT	OTEC	MATKA	KONTROLY
β-hexosaminidáza	39 872	2 560	3 200	1991 ± 120*
β-galaktosidáza	68,4	7,3	5,3	3,4 ± 0,8
α-manosidáza	18 018	344	181	81 ± 7,1
α-fukosidáza	5 120	481	1 227	758 ± 135
Arylsulfatáza A	3 978	8,6	19,4	46,8 ± 4,4



Prof.MUDr.M.Elleder, DrSc. ÚDMP, 1.LFUK

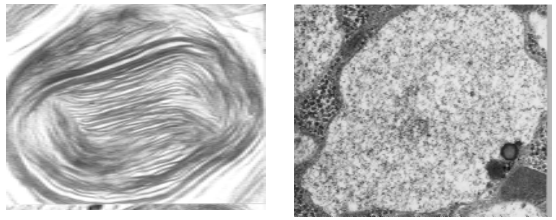
Multidiscipline approach to diagnosis of LSD



decision at the clinical level (phenotype analysis)

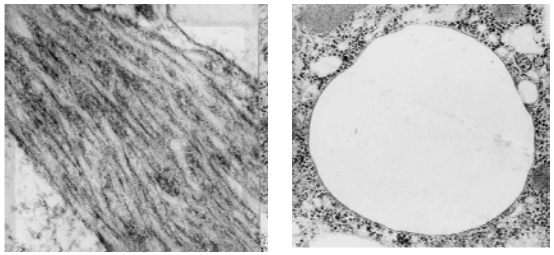
lysosomal storage expansion (biopsy)

biochemical (molecular) diagnosis



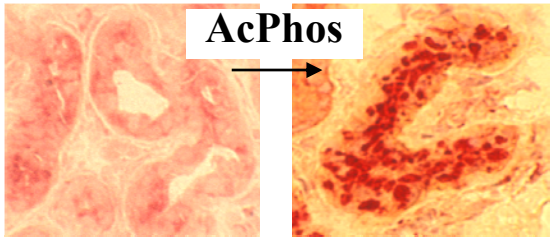
GGL

MPS



GD

CESD



CO

LSD

enzyme deficiency

mutation in DNA

noncatalytic protein affection

Prof.MUDr.M.Elleder, DrSc. ÚDMP, 1.LFUK

Léčba lysosomálních enzymopathií

- inhibice biosynthesy substrátu – Gaucherova choroba, NPC, MPS III
- ERT (enzyme replacement therapy): pro formy nemocí nepostihující CNS -
  již využívána pro Fabryho, Gaucherovu, Pompeho chorobu, MPS I, MPS II, MPS VI, připravuje se pro NPB, α-mannosidosu a další
- EET (enzyme enhancement therapy): zvýšení residuální funkce mutovaného proteinu, využití malých molekul jako farmakologických chaperonů u špatně složených nebo nestabilních mutant – výhoda přestupu přes hematoencefalickou barieru
- BMT (bone marrow transplantation) : nejúspěšnější u MPS I, nutno provádět v ranném dětství, nese značné riziko
- genová terapie – zatím na úrovni buněčných a zvířecích modelů