

# Lysosomální enzymopatie: dědičné poruchy funkcí lysosomů spojené s hromaděním metabolitů

*RNDr. Jana Ledvinová CSc.*

*Ústav dědičných metabolických poruch 1.LFUK*

*jledvin@cesnet.cz*

Text této přednášky a přednášky Strategie laboratorní diagnostiky (Laboratorní technika 3-1092 a 4-01657) jsou přístupné na webových stránkách Ústavu dědičných metabolických poruch 1. LF UK, oddíl Výukové materiály/Lysosomální enzymopatie

<http://udmp.lf1.cuni.cz/>

# Živočišná buňka – hlavní membránové organely

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

Cytosol – syntéza proteinů,  
metabolické dráhy (54%)

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

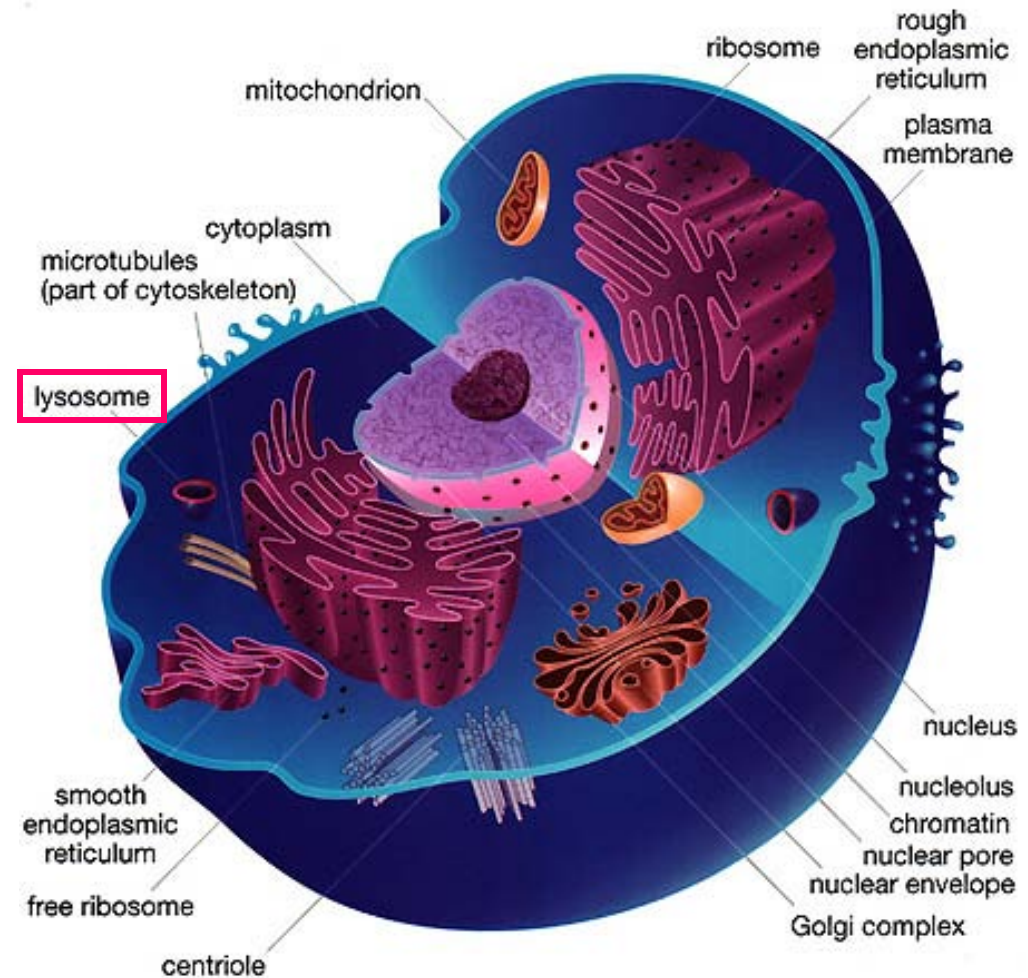
Golgi – úprava, třídění, balení proteinů  
pro předání jiné organelle nebo k sekreci  
(3%)

**Lysosomy – odbourávání  
látek a další funkce (1%)**

Endosomy – třídění endocytovaného  
materiálu, transport (1%)

Mitochondrie – oxidativní fosforylace  
(22%)

Peroxisomy – oxidace toxických  
molekul (1%)



BIOLOGY: Life on Earth, Fifth Edition  
by Teresa Audestik and Gerald Audestik

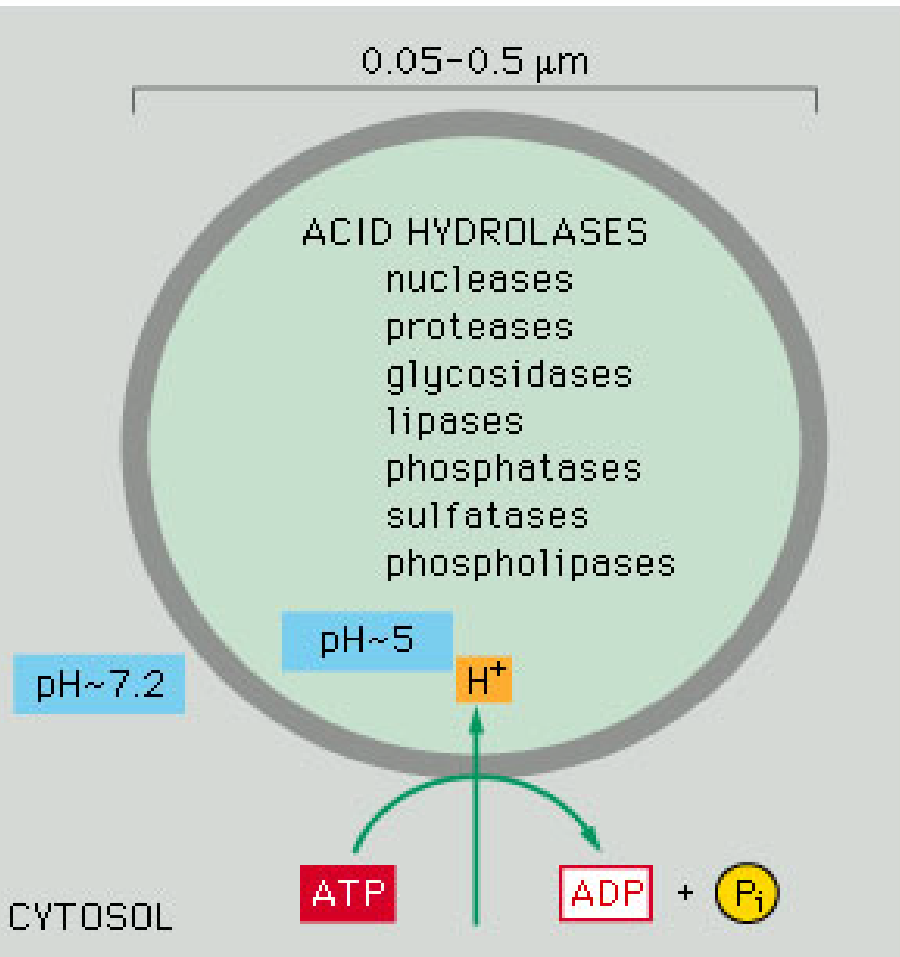
© 1999 by Prentice-Hall, Inc.  
A Simon & Schuster/Viacom Company  
Upper Saddle River, New Jersey 07456

## 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

# Lysosomy



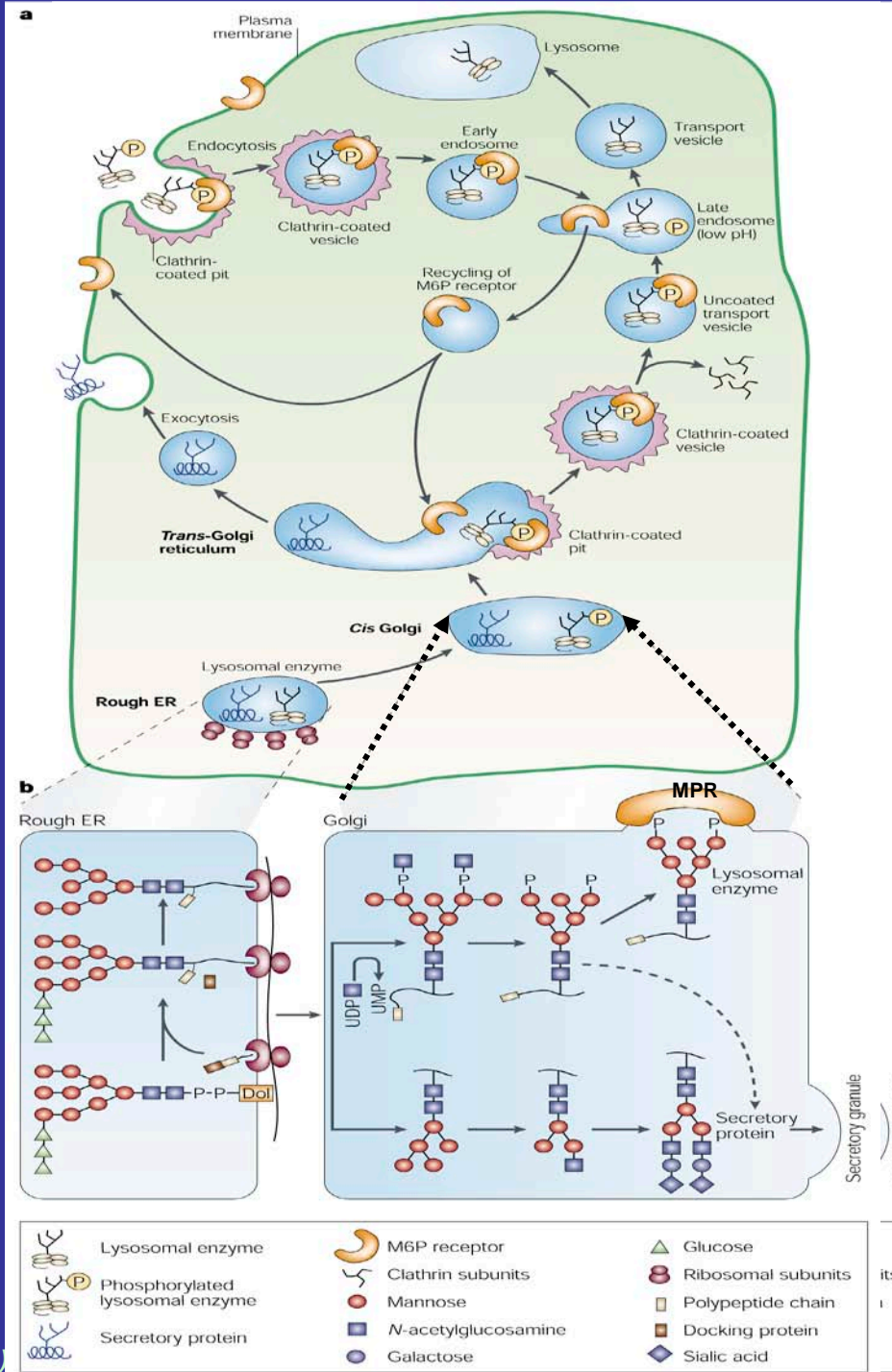
Podle *Molecular Biology of the Cell* by Bruce Alberts et al., Garland Publishing, NY 1994

- 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  $\text{H}^+$  do lumen

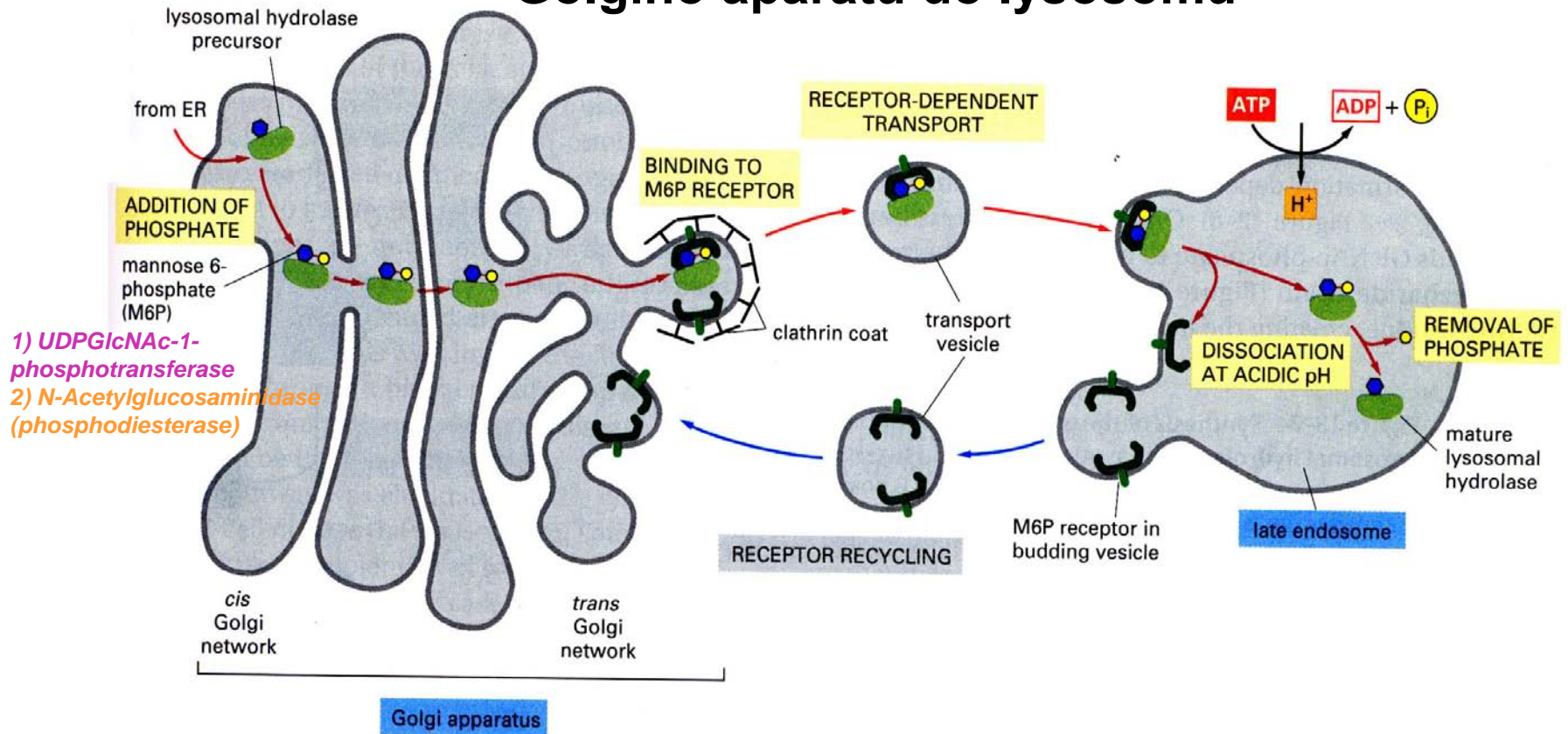
**Kromě katabolických mechanismů mají další důležité funkce (transportní, např. mukolipin, NPC1 protein, sekretorní funkce atd. )**

# 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



# Transport lysosomálních enzymů z Golgiho aparátu do lysosomů



- 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-acetylglukosamidase (fosfodiesterasou)
- fosforylované enzymy se váží na M6P receptor v *trans*-Golgi, z kterého „pučí“ váčky obalené klathrinem. Mezi různými organelami existuje „kyvadlová doprava“ prostřednictvím různého typu transportních váček, každý se specifickým nákladem



# Odbourávání molekul: dráhy endosomálního - lysosomálního systému

## 1. do lysosomů

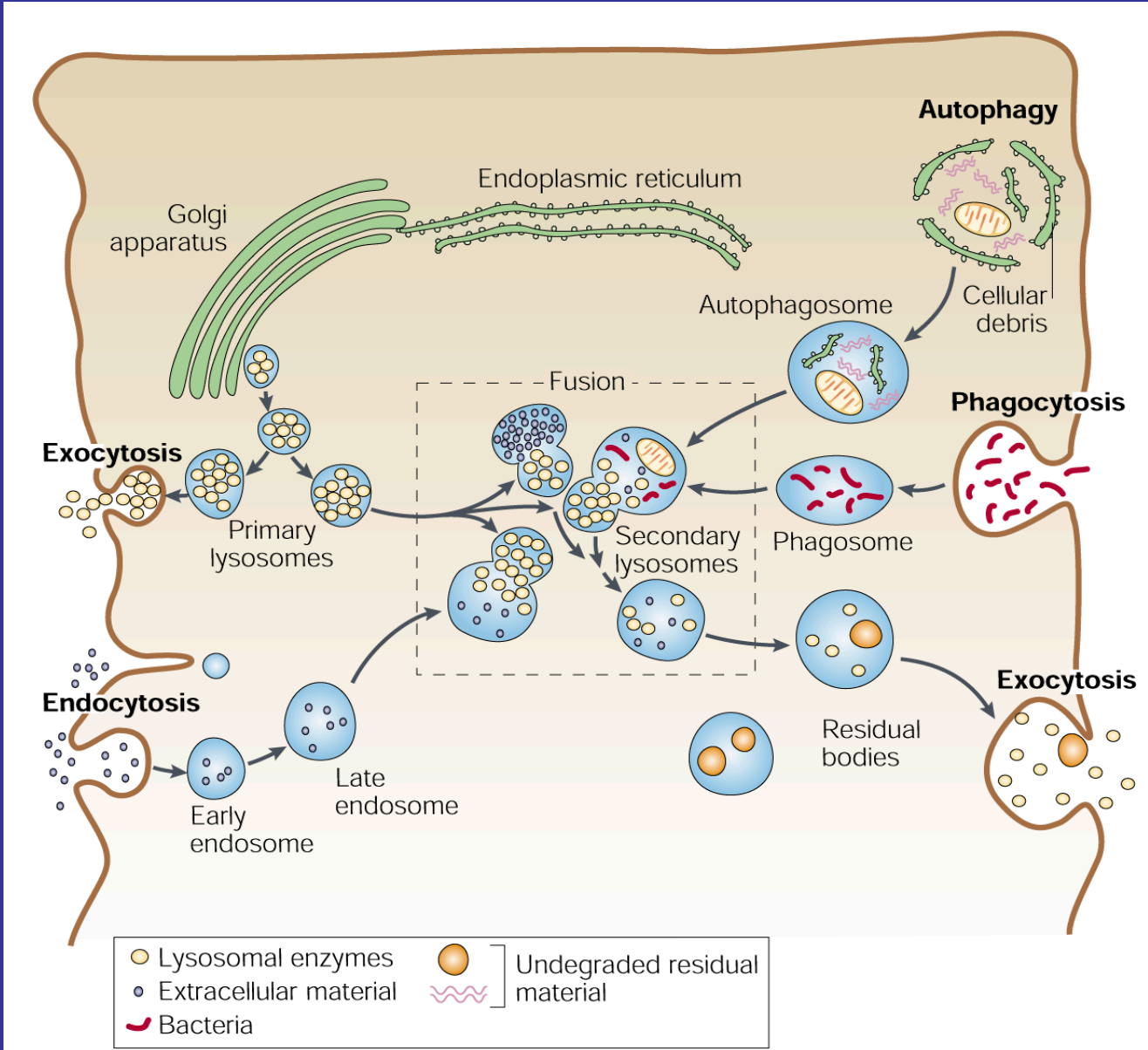
a) z extracelulárního prostoru do buňky:

- pinocytosa
- fagocytosa
- endocytosa a receptory (LDL) zprostředkovaná endocytosa

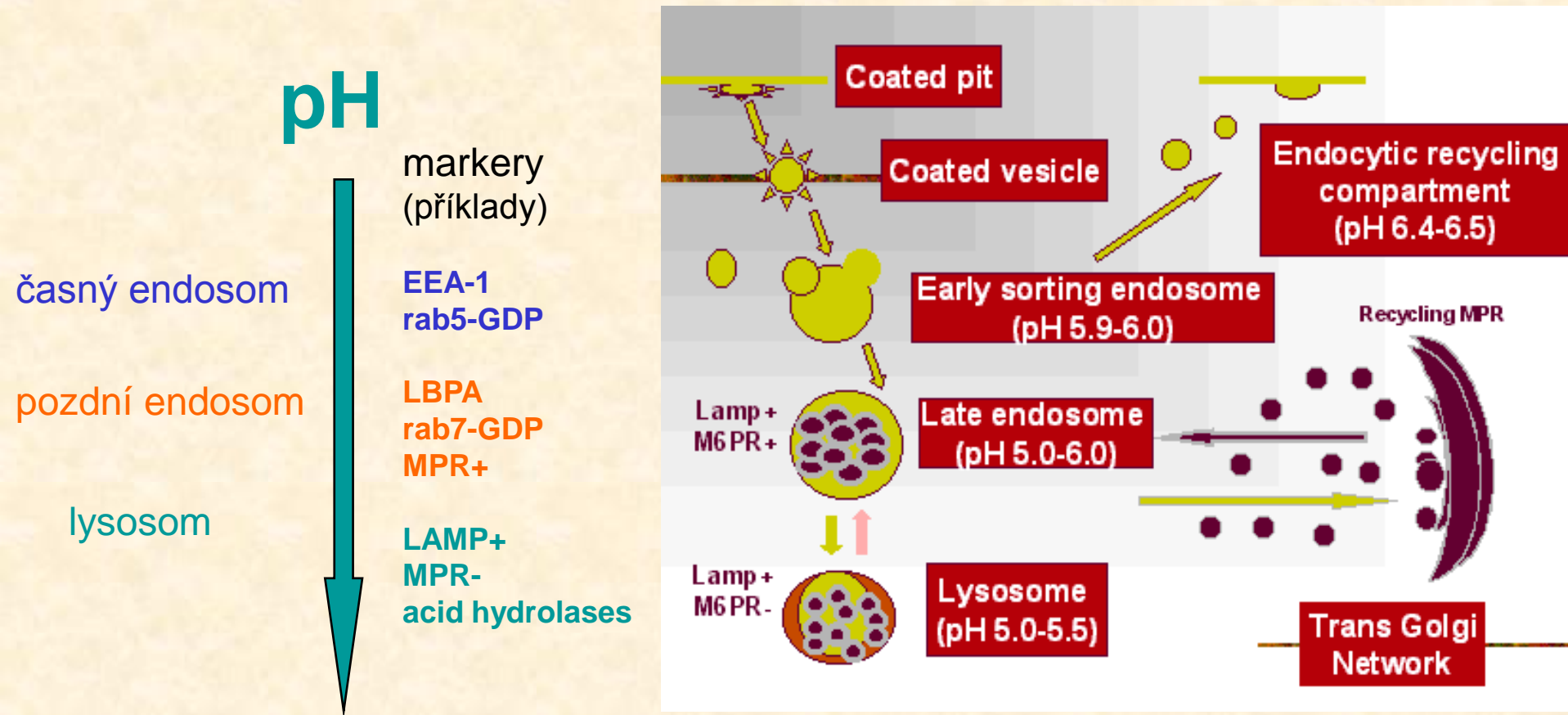
b) autofagocytosa

## 2. z buňky ven:

- exocytosa



# Jednotlivé kroky endocytické dráhy





# Poruchy lysosomálního systému

## OMIM™ - Online Mendelian Inheritance in Man™

Původní členění - podle chemické povahy ukládaného metabolitu

### A. Poruchy postihující degradační funkce lysosomálně-endosomálního systému spojené s hromaděním neodbouraných metabolitů (LSD – lysosomal storage disorders)

#### I. Lysosomální poruchy způsobené **nedostatečnou enzymovou aktivitou** v důsledku

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

#### II. Poruchy lysosomálních **proteinů s nekatalytickou funkcí (jejichž funkce nesouvisí hydrolytickou aktivitou)**

mutace proteinových transporterů a dalších proteinů v **lysosomální membráně** (např ML IV, NPC1, Salla disease) nebo lokalizovaných **Intralysosomálně** (NPC2)

### B. Poruchy sekretorického lysosomálního systému (LRO)

# Poruchy funkce lysosomálních hydrolas :

## 1. Primární poruchy enzymového proteinu

### degradace sfingolipidů a glykoproteinů

1. ceramidasa (N-Acyl-sfingoid=Cer)
2.  $\beta$ -glukosylceramidasa (GlcCer)
3.  $\beta$ -galaktosylceramidasa (GalCer)
4. arylsulfatasa A (SGalCer)
5. NAc- $\beta$ -glukosaminidasa A (GM2)
6. NAc- $\beta$ -glukosaminidasa B (GM2,GP)
7.  $\beta$ -galaktosidasa (GM1, OLS, GP,KS)
8.  $\alpha$ -galaktosidasa A ( Gb3Cer)
9. sfingomyelinasa (P-cholin-cer)
10. kyselá lipasa (CE, TAG)
11.  $\alpha$ -neuraminidasa (GP, gangliosidy)
12.  $\alpha$ -N-acetylgalaktosaminidasa (GP,GL)
13. kyselá  $\alpha$ -1,4-glukosidasa (glykogen)
14.  $\alpha$ -Mannosidasa (GP)
15.  $\beta$ -Mannosidasa (GP)
16.  $\alpha$ -Fukosidasa (GP, GL)
17. aspartylglukosaminidasa (GP)
18. tripeptidylpeptidasa I - TPP (prot.)
19. palmitoylprotein thioesterasa-PPT
20. cathepsin D

### degradace glykosaminoglykanů (GAG)

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

**30 lysosomálních enzymů**  
**29 hydrolas+1 transferasa**  
**30 proteinů = 29 genů**

## ***Poruchy funkce lysosomálních hydrolas v důsledku poruchy neenzymového proteinu***

### **2. poruchy proteinových aktivátorů lysosomálních hydrolas (n=5)**

**deficit prosaposinu**

deficit SAP A

deficit SAP B

deficit SAP C

(deficit SAP D)

deficit aktivatoru hexosaminidasy

### **3. poruchy posttranslační modifikace lysosomálních enzymů (n =2)**

**polysulfatásový deficit**

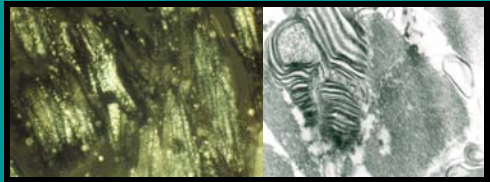
**ML II (mukolipidosa II - I cell disease)**

### **4. destabilisace enzymového komplexu (n=1)**

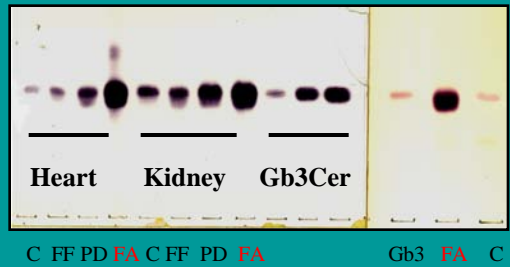
**galaktosialidosa ( deficit kathepsinu A)**

Laboratorní diagnostika:  
1970 .....

**Důkaz ukládaného metabolitu**

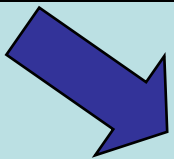
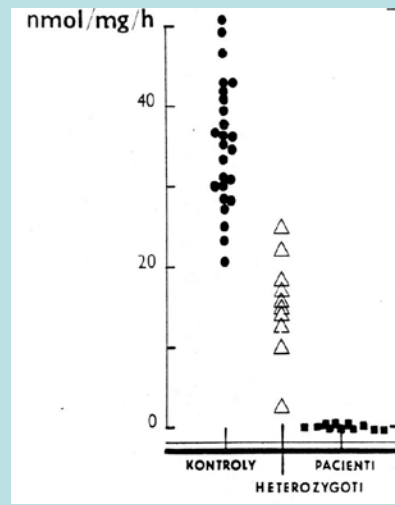


Fabryho choroba (FA, FF) a deficit prosaposinu (PD)



1980 → Enzymová analýza

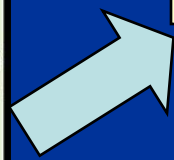
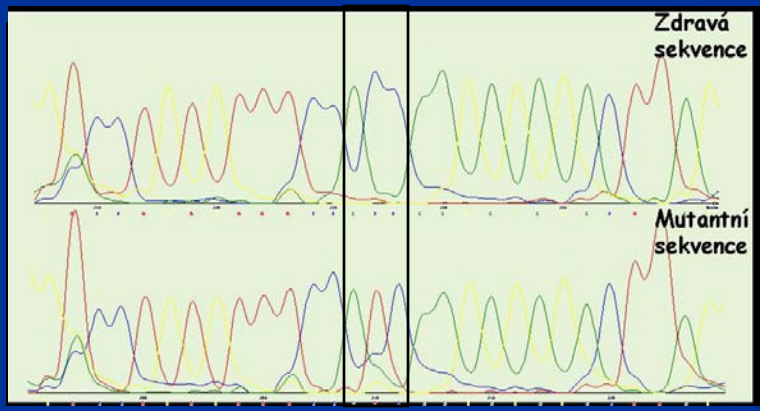
**Stanovení aktivity  $\alpha$ -galaktosidasy A**



**1994 → Prenatální diagnostika**

- Spiral artery
- Villi
- Outer cytotrophoblastic shell
- Intervillous space
- Amnion
- Chorionic plate (extraembryonic mesoderm)
- Syncytiotrophoblast
- Extraembryonic coelom
- Decidua capsularis

1995 → DNA diagnostika



Příklad mutace v genu pro AGAL (Fabryho choroba)

# Základní přístupy laboratorní diagnózy

- **Průkaz neodbourávaných (hromaděných) substrátů:**  
např. oligosacharidy, **GAG**, sfingolipidy v moči -  
HPTLC , ELFO apod  
*Mírnější formy nemocí s pozdějším nástupem nemusí být zachyceny*
- **Enzymová analýza :** - v suché kapkce krve (screening)  
- **potvrzení diagnózy průkazem deficitu aktivity enzymu**  
v leukocytech periferní krve a dalších buňkách (kožní  
fibroblasty; choriové klky, amniové buňky – prenatální dg.)
- **DNA analýza: potvrzení výskytu mutace v genu**  
**příslušné hydrolasy**

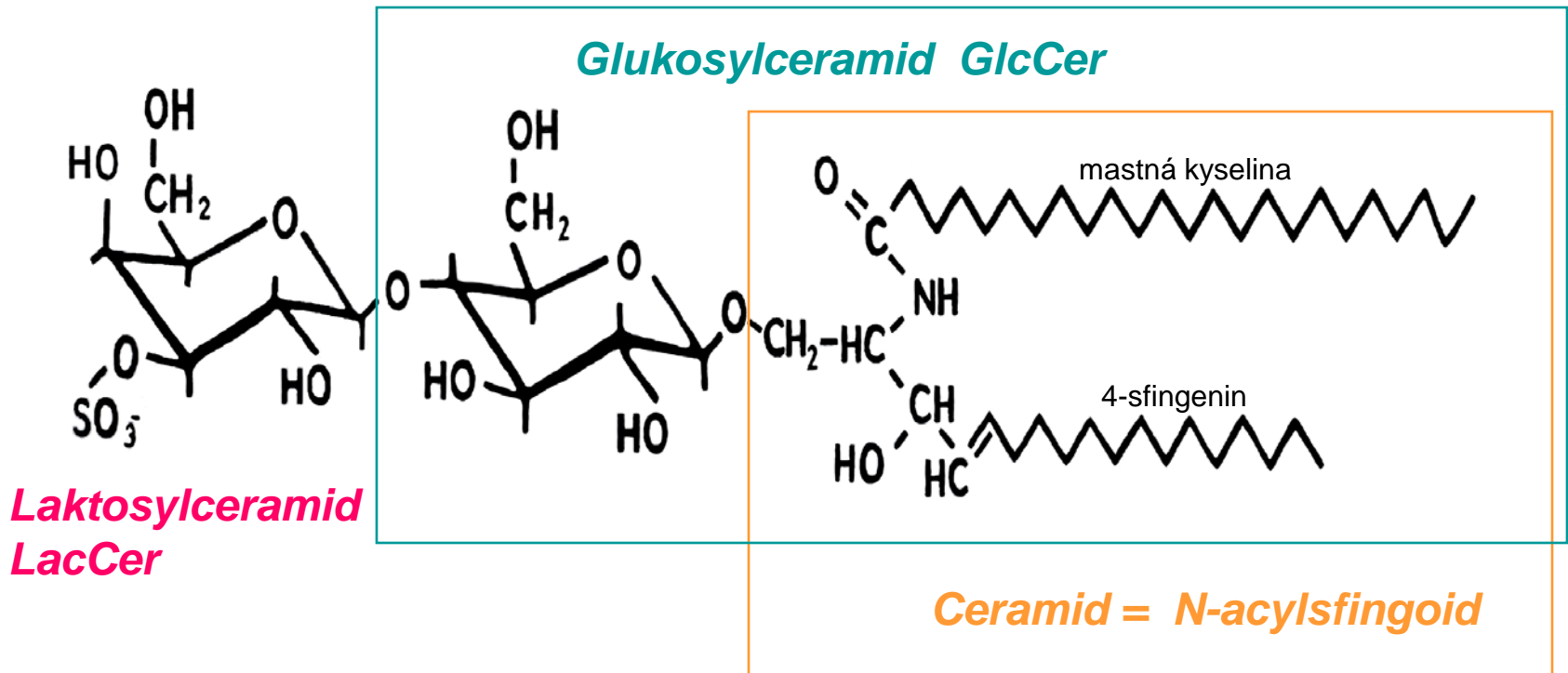
# Sfingolipidy a sfingolipidosy

- 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, časté postižení CNS, viscerálních orgánů, patrné kožní, oční změny, regres vývoje, psychomotorická retardace u dětí a rychlý progres nemoci končící smrtí
- kausální **léčba rekombinantním enzymem** existuje u Fabryho a Gaucherovy choroby a některých dalších.

# Sfingolipidy a sfingolipidosy

## Co jsou sfingolipidy?

Lipidy obsahující sfingoidní base neboli „sfingosiny“, víceuhlíkaté alifatické aminoalkoholy odvozené od sfinganinu (D-erythro-2-amino-1,3-oktadekandiol )



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

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

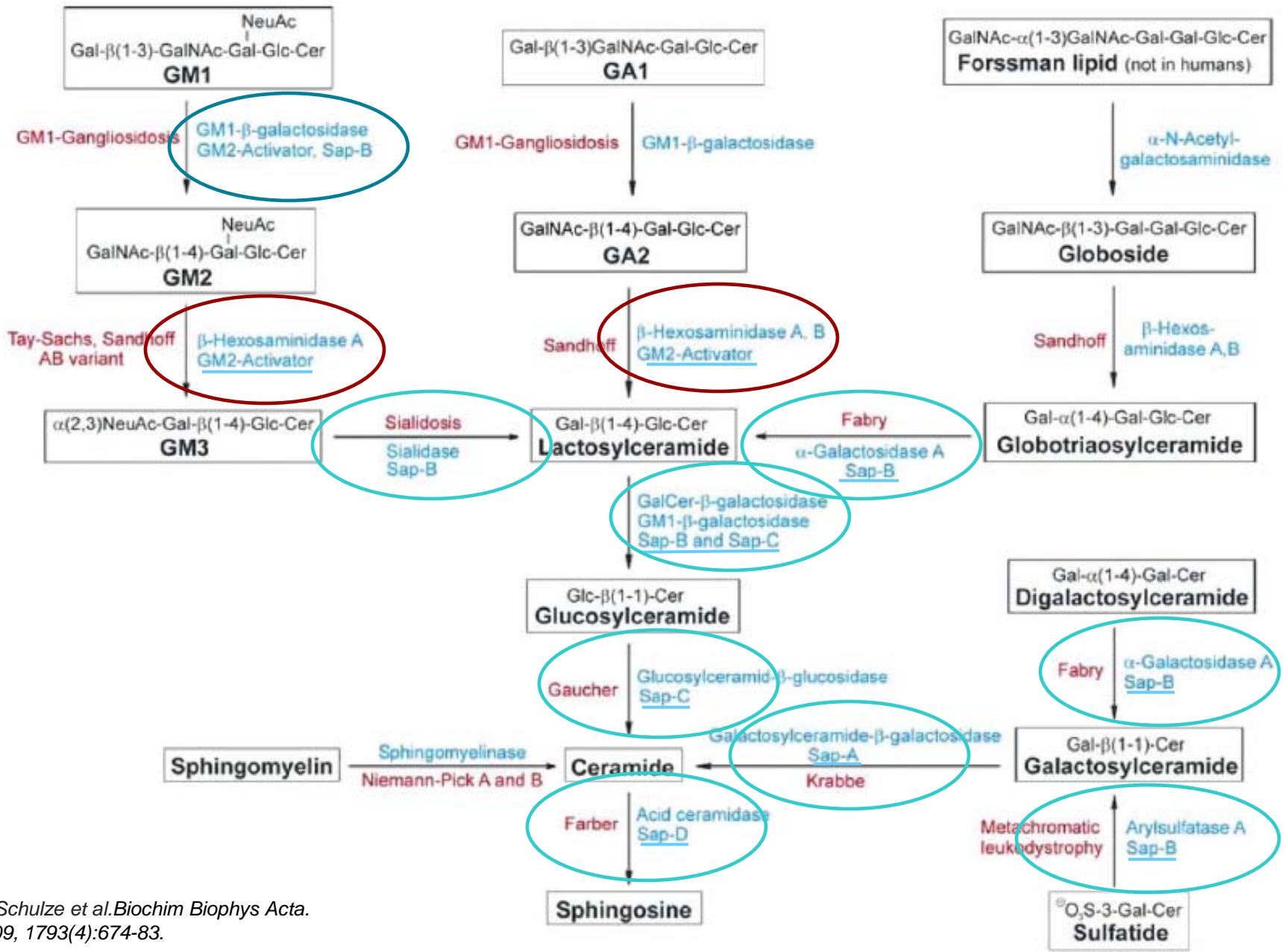
**SACHARIDOVÁ ČÁST:** obsahuje různý počet monosacharidových jednotek (základ 1-4 jednotek), u živočichů především D-glukosu, D-galaktosu, L-fukosu, D-N-acetylgalaktosamin a D-N-acetylglukosamin (neutrální GSL), které mohou být sulfatovány nebo sialovány (kyselé GSL). Rozdělují se proto skupinově na 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 funkce strukturní a integrační, ale také signalisační, receptorové, při vzájemném rozpoznávání buněk aj.*



# LYSOSOMÁLNÍ DEGRADACE VYBRANÝCH SFINGOLIPIDŮ



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

*enzymy štěpící převážně lipidy  
(lipidosy n=10)*

- **ceramidasa (Farber)**
- **sfingomyelinasa (Niemann-Pick typ A/B)**
- **glukosylceramid  $\beta$ -glukosidasa (Gaucher)**
- **galaktosylceramid  $\beta$ -galaktosidasa (Krabbe)**
- **arylsulfatasa A (MLD, sulfatidosa,)**
- **$\alpha$ -galaktosidasa A (Fabry)**
  
- **GM1- $\beta$ -galaktosidasa (GM1 gangliosidosa)**
- **$\beta$ -hexosaminidasa (GM2 gangliosidosa)**  
defekt řetězce podjednotky A (Tay-Sachs)  
defekt řetězce podjednotky B (Sandhoff)
  
- **kyselá lipasa (Wolmanova nemoc, CESD)**

*= lipidosy*

*substrát*

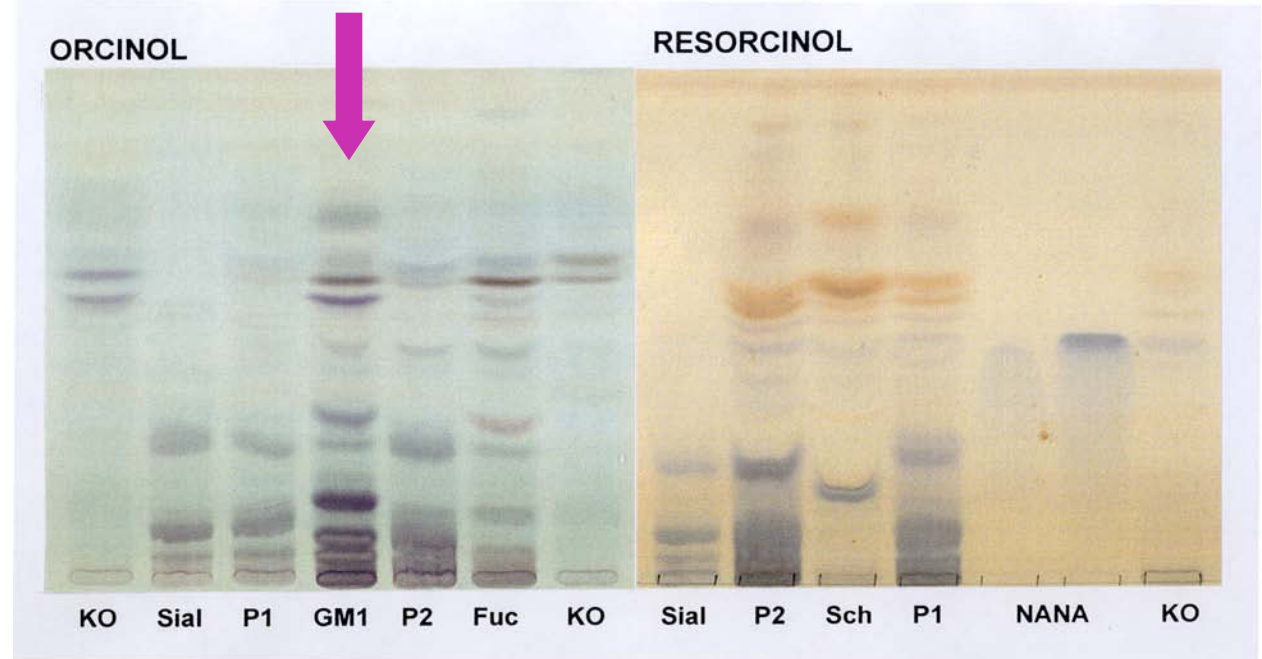
**ceramid**  
**sfingomyelin**  
**glukosylceramid**  
**galaktosylceramid**  
**sulfatid**  
**Gb<sub>3</sub>Cer, Ga<sub>2</sub>Cer,**  
**krevní.sk.B**  
**GM1 gangliosid, GP, (KS)**  
**GM2 gangliosid**  
“ **a některé GP** “  
**estery cholesterolu**

# Příklady poruch funkcí sfingolipidových hydrolas:

## GM1 gangliosidosa : $\beta$ -galaktosidasa

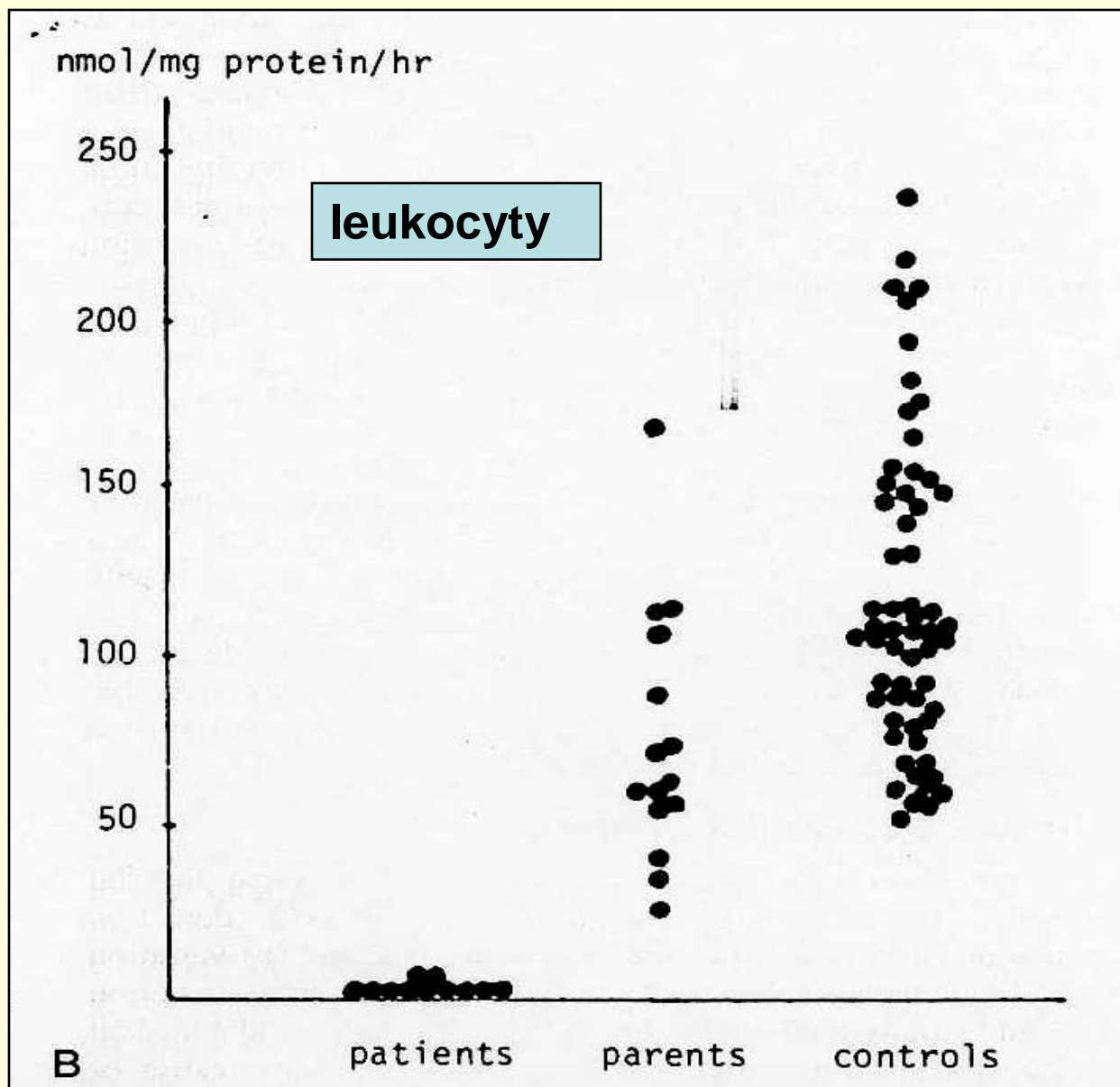
- Substráty GM1 gangliosid, asialoderivát, laktosylceramid, oligosacharidy
- Hromadění GM1 v neuronech, oligosacharidy v viscerálních orgánech, exkrece oligosacharidů v moči
- Postižení CNS, regres vývoje

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



**GM1 gangliosidosa:**  
příklad HPTLC  
oligosacharidů  
v moči

# Aktivita $\beta$ -galaktosidasy u pacientů s GM1 gangliosidosou



## GM2 gangliosidosa :

### deficit $\beta$ -hexosaminidasy, $\beta$ -N-acetylgalactosaminidasy

(syst.name  $\beta$ -N-acetyl-D-galactosaminide N-acetylgalactosaminohydrolase, EC 3.2.1.53)

Dva isoenzymy: HEX A (polypeptid  $\alpha\beta$  - termolabilní) HEX B (polypeptid  $\beta\beta$ )

- **Tay-Sachsova choroba** – defekt  $\alpha$  –podjednotky (HEXA 15q22>q25)

#### deficit HEX A

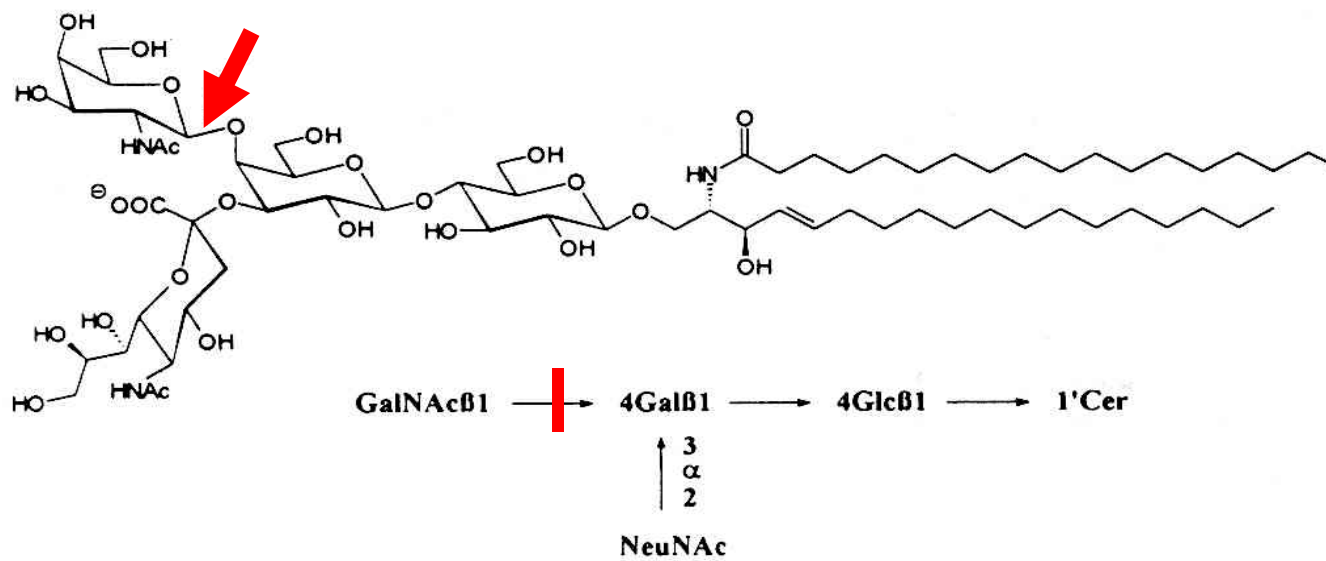
- **Sandhoffova choroba** – defekt  $\beta$ -podjednotky (HEXB 5q13) **deficit HEX A i B**

- **Defekt GM2 aktivátoru** (GM2A 5q32-33)

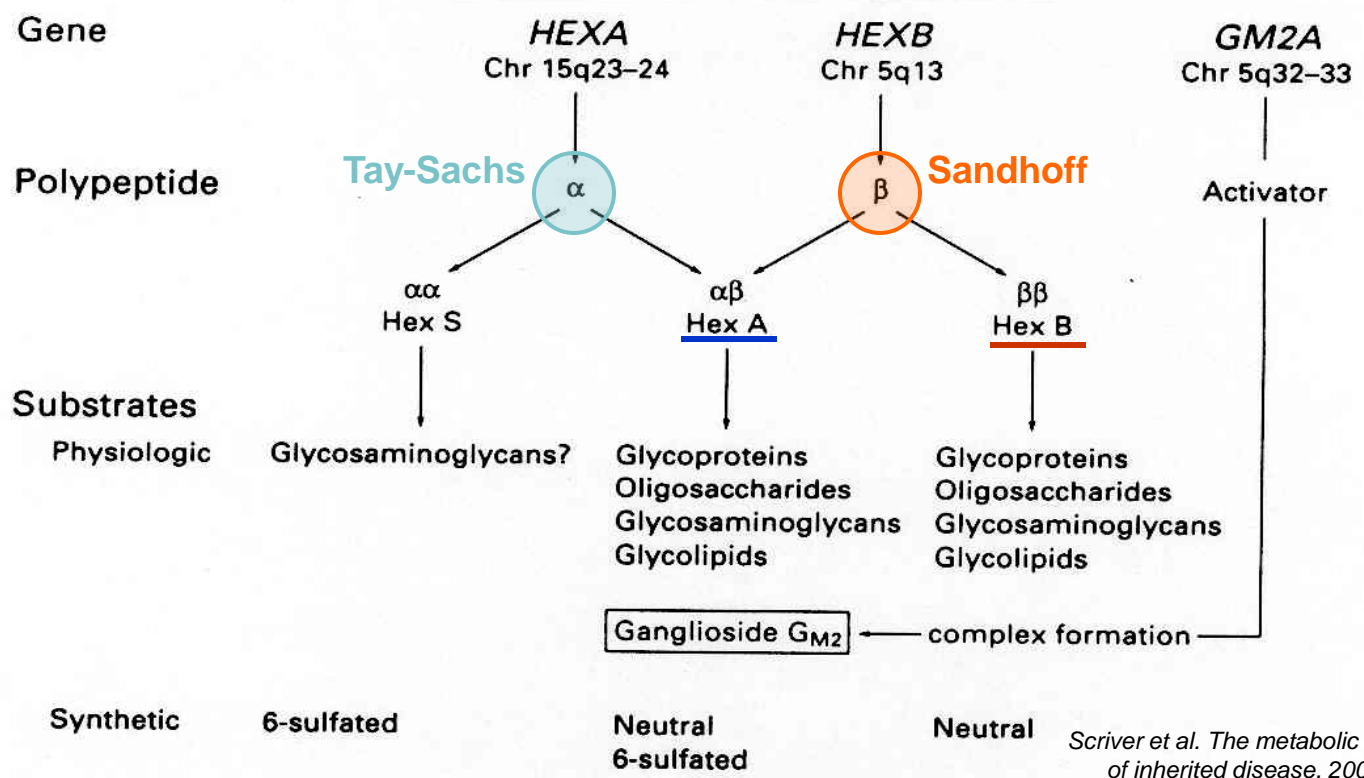
- „**pseudodeficit**“ hex A – zdraví jedinci s bodovou mutací, funkčnost enzymu vůči přirozenému substrátu zachována zachována

- **Klinické fenotypy** : *infantilní* – progresivní neurodegenerativní onemocnění;  
*subakutní a chronické formy* s pozdějším nástupem,

Substráty **GM2 gangliosid** (asialo a deacylované formy),  
u Sandhoffovy choroby též globosid (viscerální orgány) , OLS a GAG



**FIG. 92-1** Structure of ganglioside  $G_{M2}$ . The arrow indicates the bond to be cleaved by hexosaminidase A.



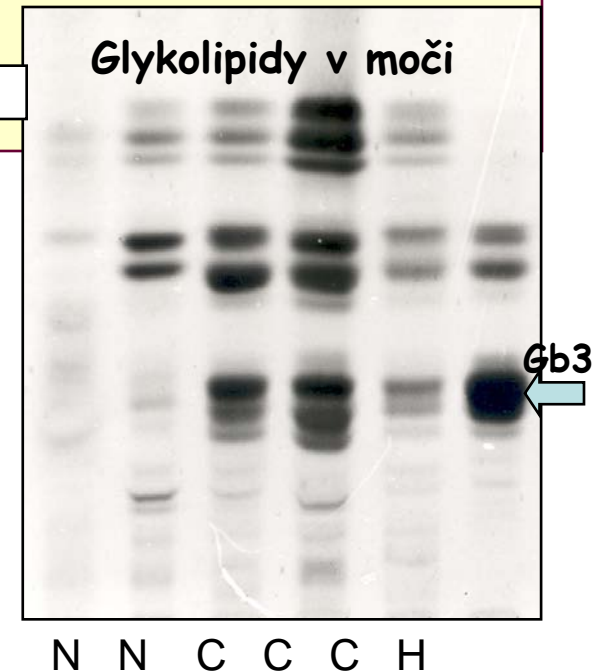
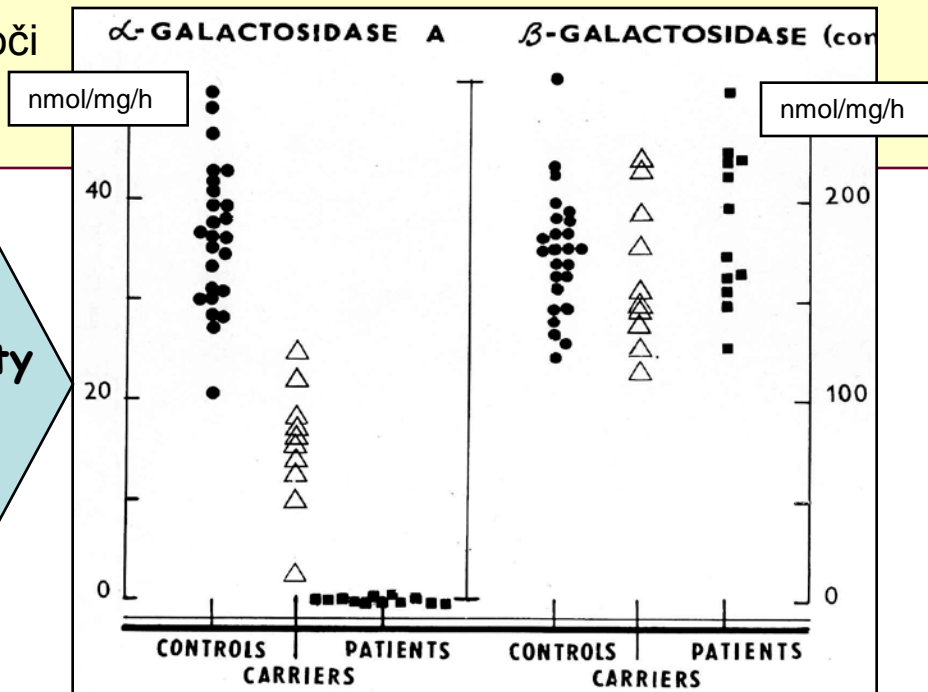
**FIG. 92-4** The  $\beta$ -hexosaminidase gene system. Three polypeptides, each encoded by a different gene, are needed for the degradation of ganglioside  $G_{M2}$ : the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the Hex A isoenzyme and the  $G_{M2}$  activator protein, which binds the ganglioside and presents it to the enzyme.

# Fabryho choroba: nedostatek aktivity $\alpha$ -galaktosidasy A

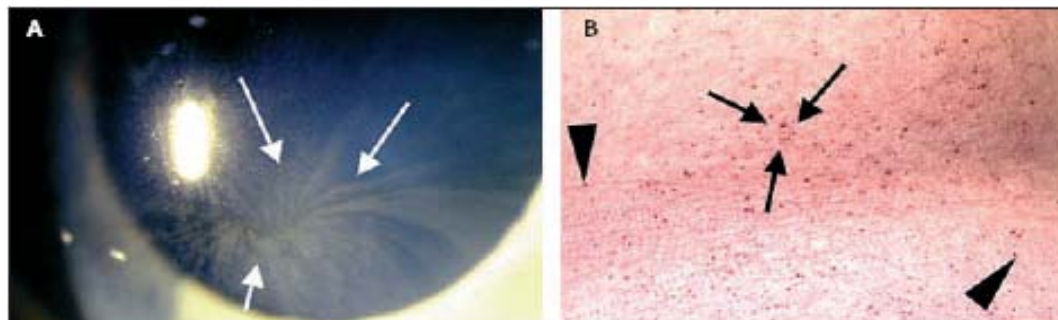
(syst.název:  $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22)

- Gen (*GLA*) na chromosomu Xq22 (**X-vázaný přenos**)
- Substráty: **globotriaosylceramid**, **digalaktosylceramid (galabiosylceramid)**, **glykolipidy krevní skupiny B**, patří k nejčastějším sfingolipidosám spolu s Gaucherovou nemocí, incidence 1: 40 000.
- Hromadění v myokardu, cévách (endotel), ledvinách, lymfatických uzlinách, plicích aj., exkrece v moči

Enzymové aktivity  
v leukocytech



**Klinické znaky:** onemocnění srdce a ledvin, zákal rohovky, angiokeratomy, akroparesthesie,  
Nemoc má **pouze adultní formu** (jako jediná z lysosomálních enzymopatií)  
**Terapie:** 2 rekombinantní  $\alpha$ -galaktosidasy



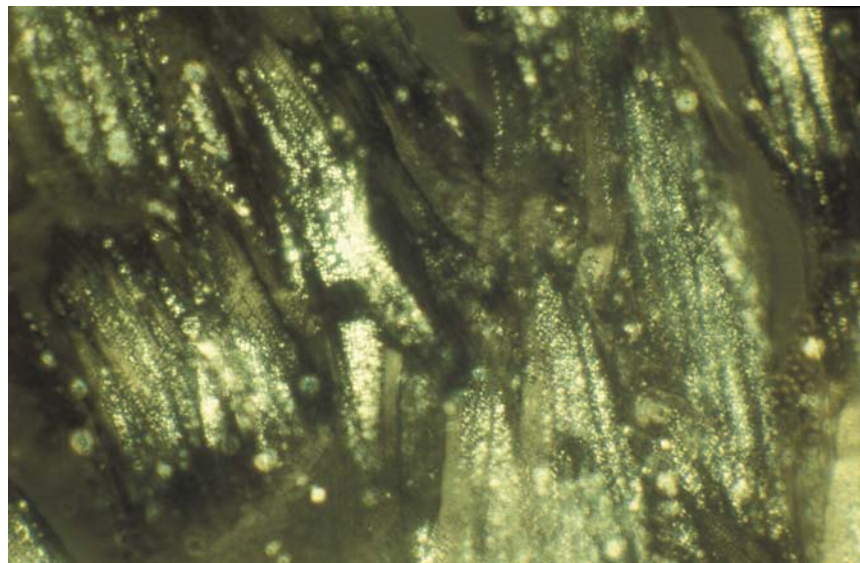
A. Typický vějířovitý zákal rohovky B. Angiokeratomy na kůži

Schiffmann R. [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) Vol 366 November 19, 2005

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

*(srdeční sval – fixovaná  
tkáň)*

*Prof. M. Elleder, ÚDMP, 1.LF UK*





# Gaucherova nemoc: nedostatek aktivity $\beta$ -glukocerebrosidasy

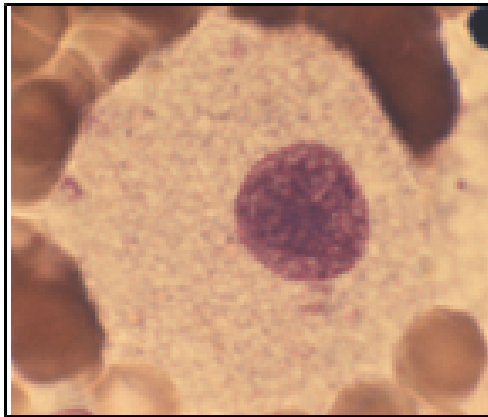
(syst.název *D-glucosyl-N-acylsphingosine  $\beta$ -glucohydrolase, EC 3.2.1.45*)

- gen (*GBA*) na chromosomu 1 (q21); 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: neurodegenerace, trombocytopenie, hepatosplenomegalie, kostní změny
- tři klinické varianty: chronický viscerální-typ 1, akutní neuronopathický-typ 2 (těžká forma), neuronopathický- typ 3
- Incidence: 1:7000-10000, nejčastější sfingolipidosa
- Terapie : - enzymová modifikovaným rekombinantním enzymem, ale prakticky žádný enzym se nedostává do Gaucherových buněk (změněných makrofágů)  
- inhibitory biosynthesy glykolipidů
- $\beta$ -glukocerebrosidasa není přenášena M6P cestou, ale prostřednictvím selektivní vazby a transportu s LIMP 2 proteinem. Vazba je závislá na pH, proteiny jsou asociovány v ER a transportovány do lysosomu, kde v kyselém pH disociují.



### Příklad obvyklé vakuolizace u LSD

microscopic form



### Příklad Gaucherovy buňky

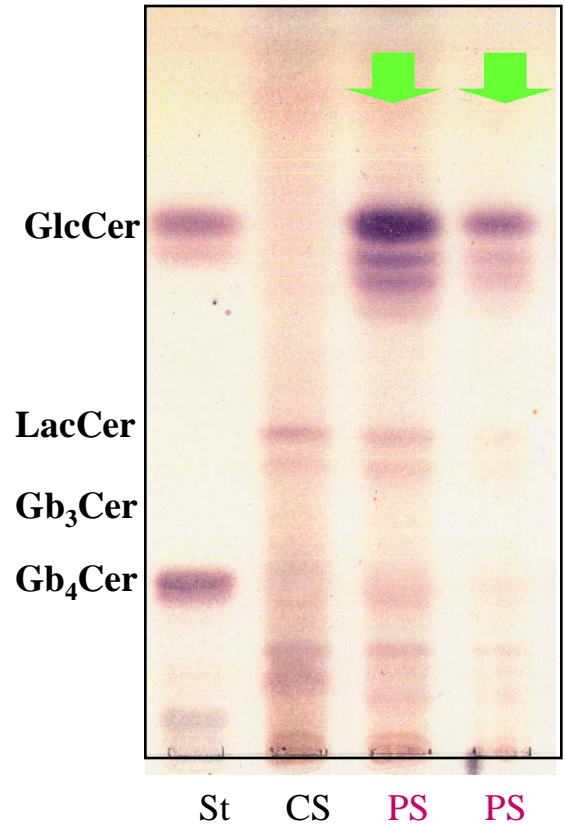
stained



cytologic variants of lysosomal storage

Prof.M.Elleder,DrSc, ÚDMP

### Příklad HPTLC glykolipidů tkání



Detection: orcinol

CS= control spleen, PS =GD patient spleen St= Standards of glycolipids

# Metachromatická leukodystrofie, sulfatidosa: deficit aktivity arylsulfatasy A (ASA, cerebrosid sulfat sulfatasa)

(syst.název: cerebroside-3-sulfate 3-sulfohydrolase, EC 3.2.1.22)

**Gen:** ARSA na chromosomu 22q13 (507 aminokyselin, 3 glykosylační místa)  
Zjištěno několik prevalentních mutací

**Substrát:** sulfatid (galaktosylceramid 3-sulfát, cerebrosid-3-sulfát)

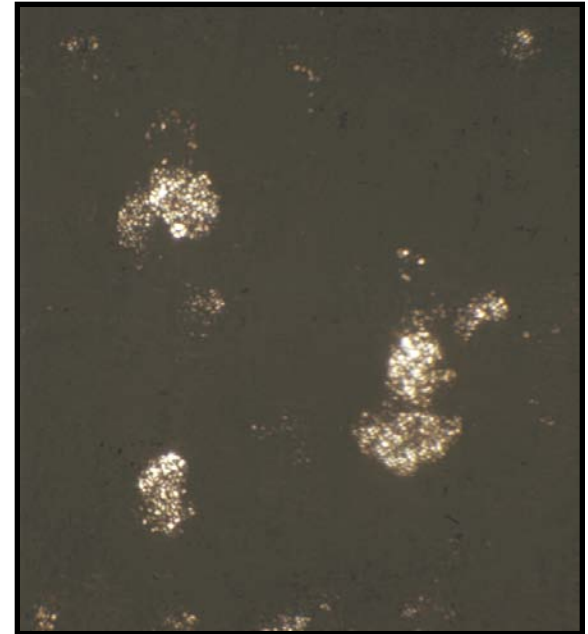
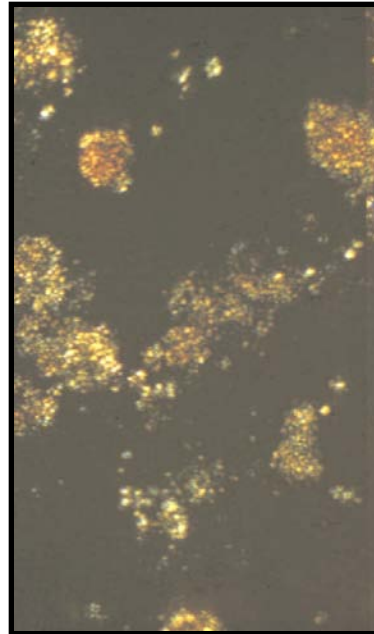
- Hromadí se v mozku (demyelinisace), ledvinách, žlučníku, játrech, exkrece v moči
- Klinické znaky: postižení PNS, CNS, tři varianty podle začátku onemocnění
- Diagnostika: analýza sulfatidů v moči (také histochemický průkaz metachromasie)  
**stanovení aktivity ASA** v leukocytech aj. buňkách

Je nutné vyloučení tzv. **pseudodeficitu** (DNA analýza, sulfatidy v moči)

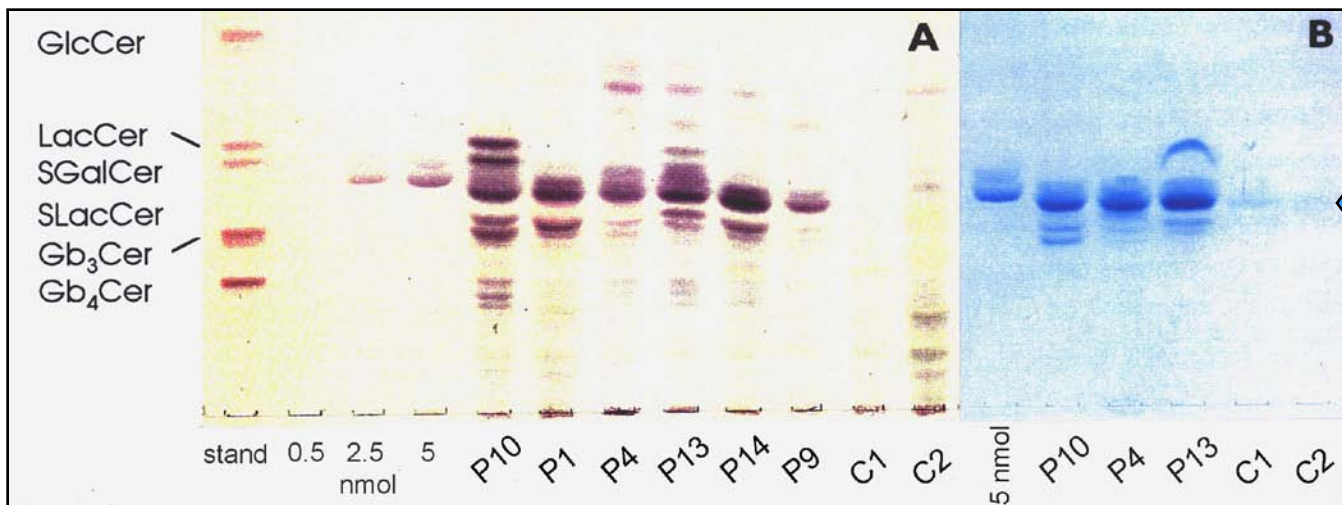
- Cílená terapie neexistuje, pokusy s BMT nepříliš úspěšné,
- DNA analýza: nezbytná především při zjišťování pseudodeficitní alely

**Sulphatiduria  
in ASA deficiency (MLD)**

**Birefringence after staining  
with Cresyl violet (dichroism)  
and without it**



**Příklad HPTLC sulfatidů 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:

*kromě ASA existuje i u mutací dalších lysosomálních hydrolas*

- *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 ASA: Asn350Ser (AAT>AGT)

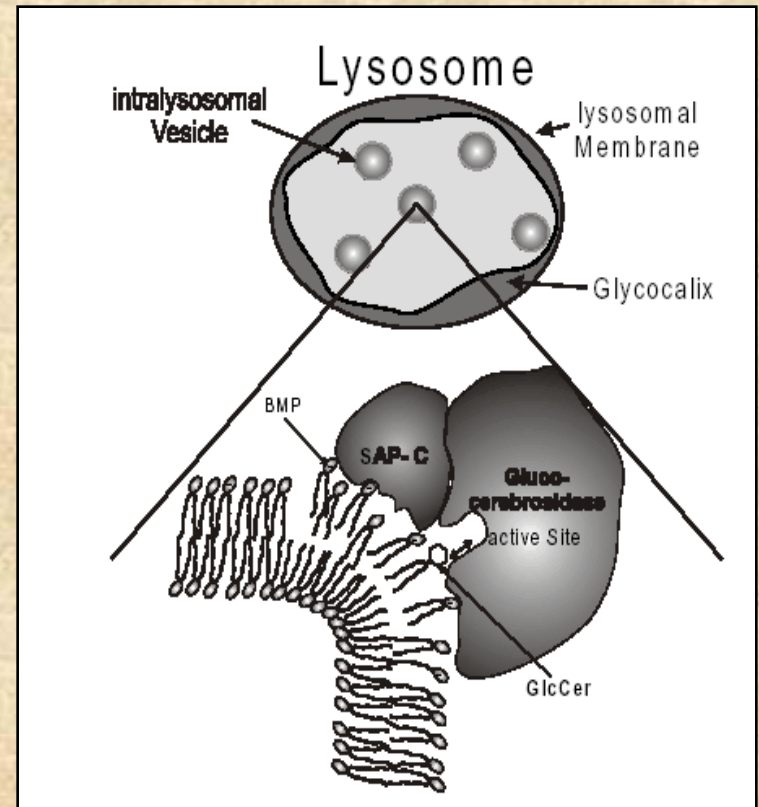
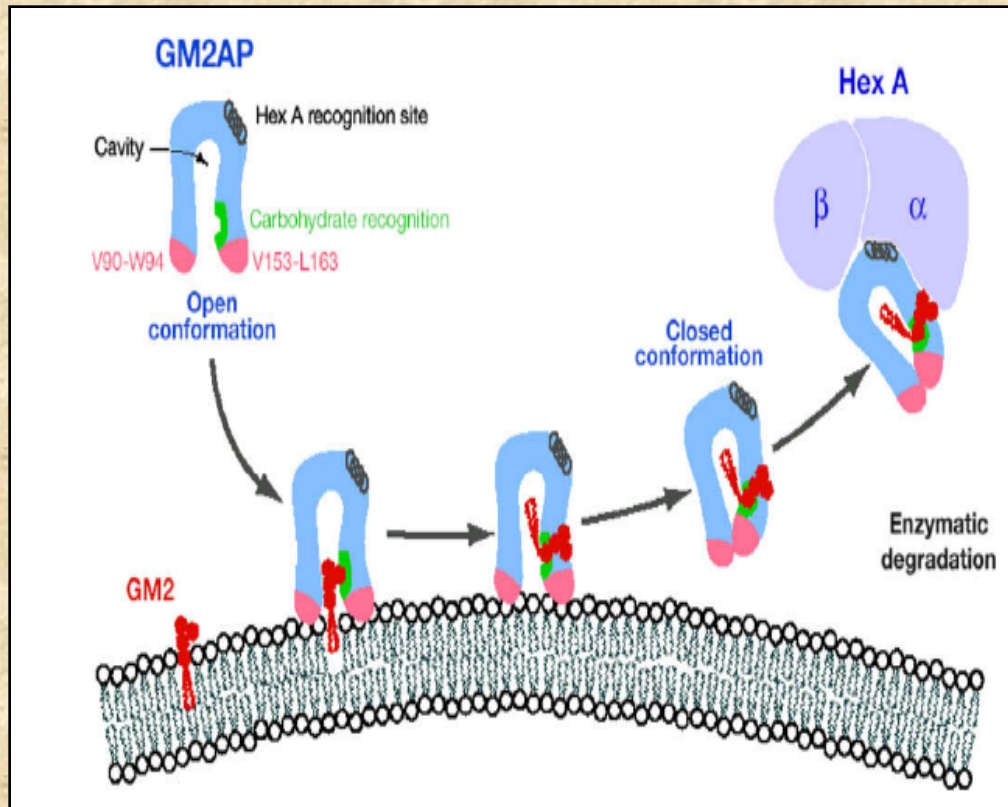
A→G v poly A signálu (aataac>agtaac)

***Zjištění pseudodeficitu má zásadní význam pro prenatální diagnostiku !***

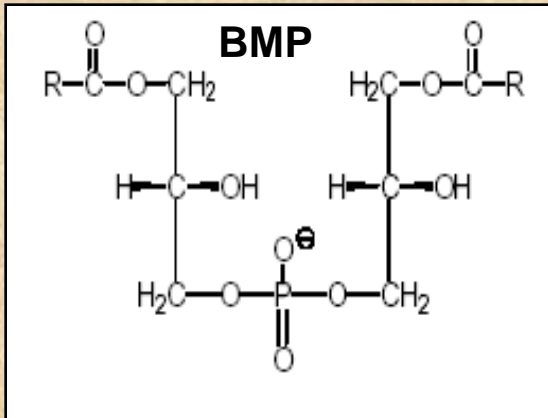
## 2. Proteinové aktivátory sfingolipidových hydrolas a jejich poruchy

- **aktivátory** - malé neenzymové proteiny (do ~20kDa):
  - 1) **GM2 aktivátor**, kódován na 5 chromosomu 5q32-33
  - 2) **saposiny (SAP) A,B,C,D** (*Sfingolipid Activator Proteins*)
- **prosaposin (73kDa)**: SAP-prekursor, kódován na chromosomu 10 q21-23
  - je intracelulárně transportován via M6P receptor, sortilin, sekretován a re-endocytován vazbou na M6P nebo mannosový receptor, nebo LRP
  - jednotlivé **saposiny vznikají z prekursoru proteolyticky** na úrovni pozdních endosomů/lysosomů
  - mají vysokou homologii, působí ale odlišně a s různou specifitou
  - prosaposin má také **neurotrofní** aj. důležité funkce

# Modely 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

## Deficit prosaposinu je těžká komplexní sfingolipidosa

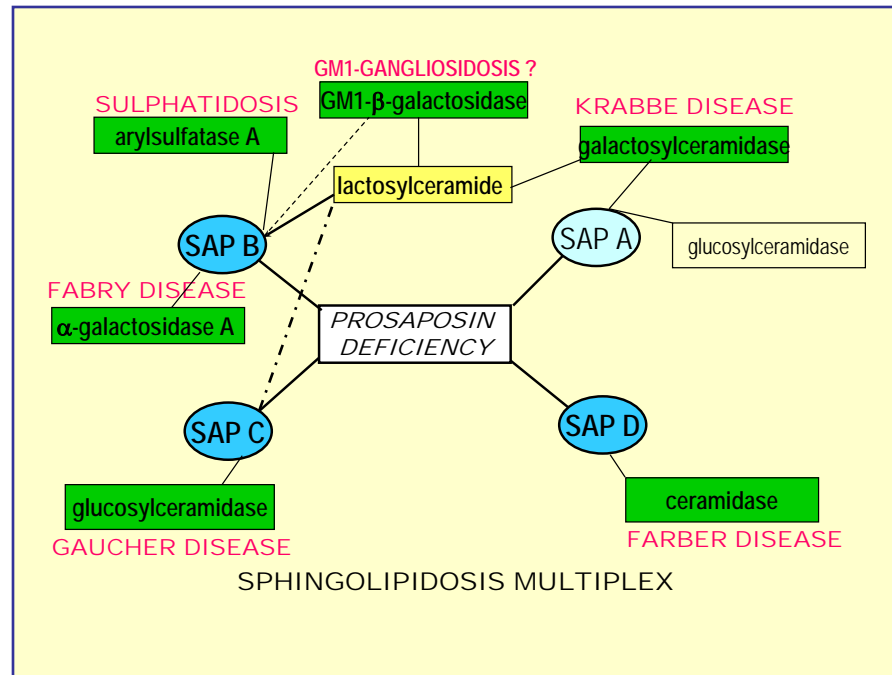
s příznaky od narození, zatím popsáno na světě 6 případů (2 slovenské):

Úplná absence prosaposinu a saposinů A,B,C,D vede k masivnímu ukládání následujících jednoduchých sfingolipidů v tkáních: **ceramidu,**

**GlcCer, GalCer, LacCer, Gb3Cer, Ga2Cer, sulfatidu a GM3, jejich deacylovaných a desialylovaných forem**

## Deficity jednotlivých aktivátorů (GM2, SAP B, SAP C, SAP A)

připomínají fenotypicky odpovídající enzymový deficit (GM2 gangliosidosa, MLD/Fabry, Gaucher)





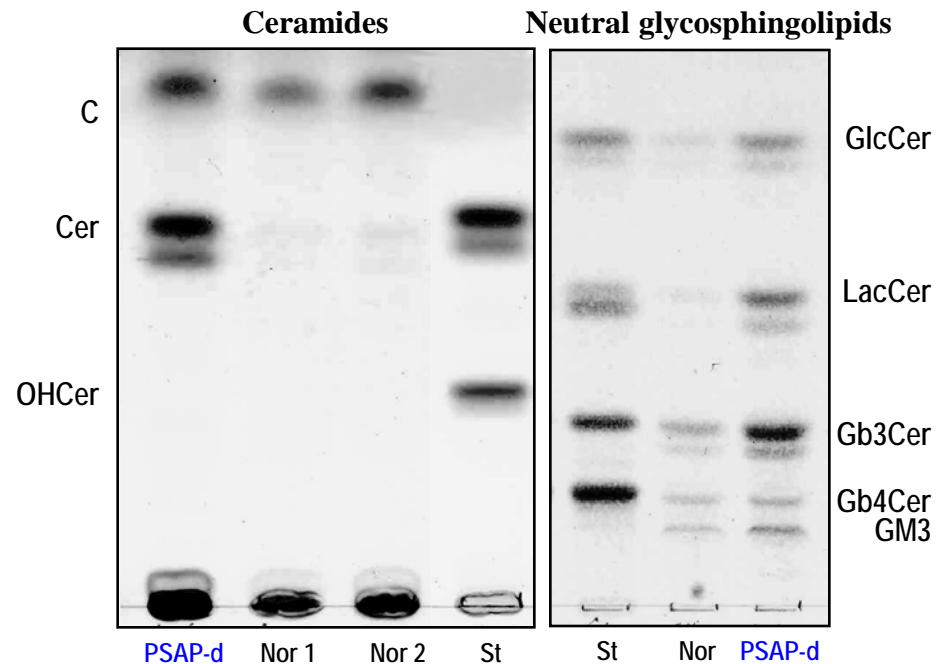
## Laboratorní diagnosa:

- **důkaz ukládaných lipidů** (histologická, ultrastrukturální, biochemická analýza tkání), **analýza sfingolipidů v moči**,
- **stanovení aktivit příslušných hydrolas v reakci bez detergentů**,
- **imunohistochemický důkaz nepřítomnosti saposinů**,
- **dynamické funkční testy v buněčné kultuře**,
- **zjištění mutace v genu pro prosaposin**

### Příklad:

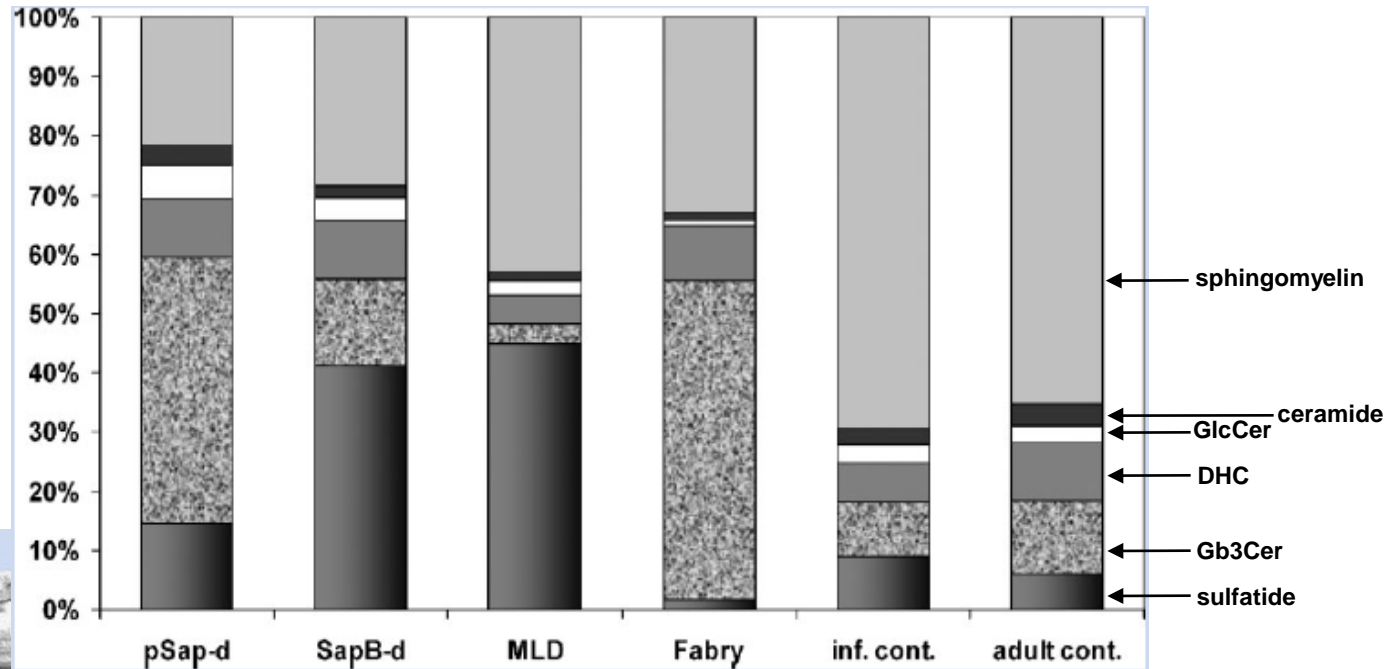
**PSAP-d :deficit prosaposinu -  
neodbourávané sfingolipidy ve  
fibroblastech**

*Nor1,2 – controls, St - standardy*



## Procentuální zastoupení hlavních sfingolipidů v moči

ESI-MS/MS analysis (L Kuchar, et al. 2009, Am J Med Genet Part A 149A:613–621)



**Příklad: Analýza sfingolipidů v moči u sfingolipidos s poruchou odbourávání Gb3Cer a sulfatidů - významný příspěvek k diagnóze**

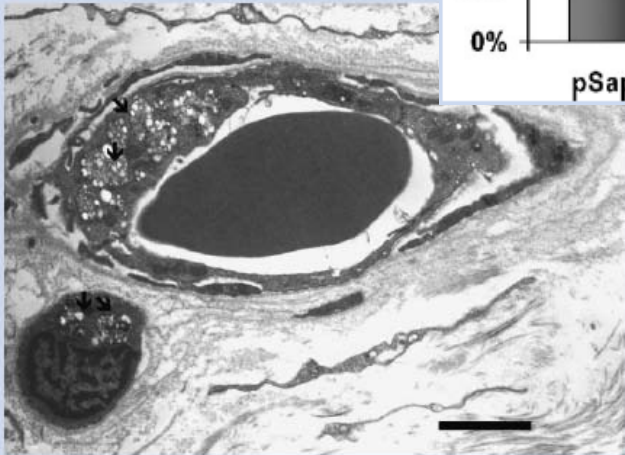


FIG. 2. Skin biopsy from patient 1 (pSap-d). Arrows mark clusters of heterogeneous lysosomal storage material containing bright (electron-lucent) vesicles in an endothelial cell (capillary vessel, upper half) and a perivascular cell (bottom left hand corner). Bar at bottom, 3  $\mu$ m.

Prof M.Elleder, ÚDMP 1.LF UK

## DEFICIT PROSAPOSINU:

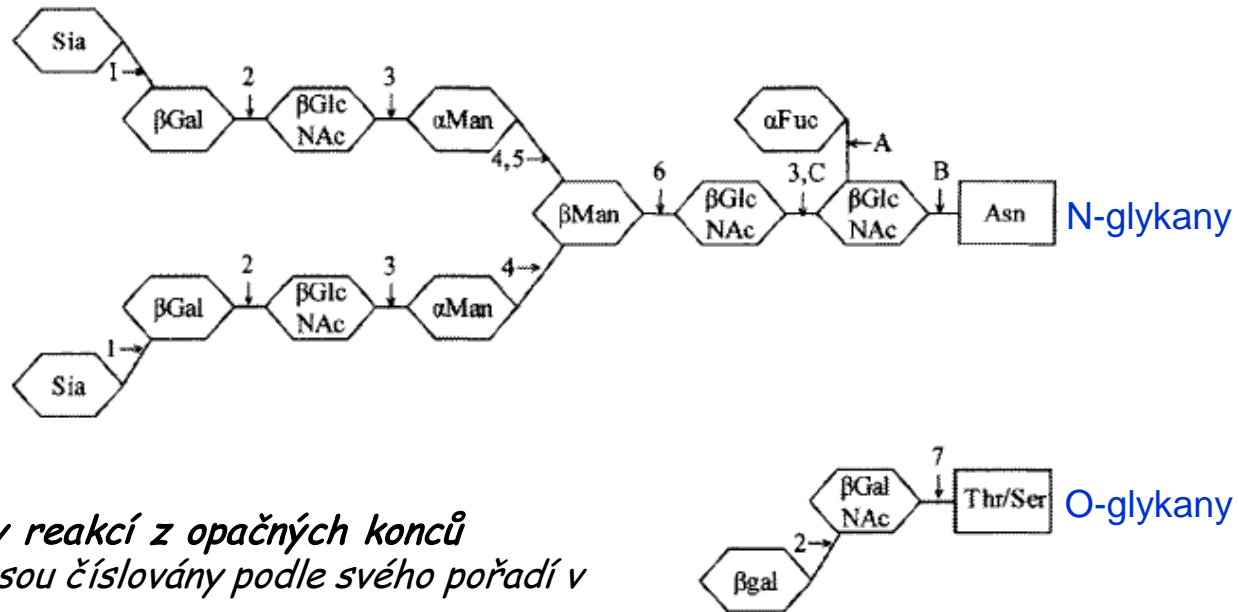
Příklad masivního ukládání heterogenního materiálu v kožních kapilárách

# Glykoproteiny a glykoproteinosy

- glykoproteiny jsou hojně zastoupeny na buněčných membránách
- mají důležité funkce – strukturní, signalizační, rozpoznávací aj.
- jejich oligosacharidové struktury jsou postupně odbourávány v lysosomech skupinou exoglykosidas a endoglykosidas
- poruchy degradace vedou k hromadění neodbouraných substrátů v lysosomech (**glykopeptidy, modifikované oligosacharidy, někdy glykolipidy**) a k závažnému metabolickému onemocnění s variabilním fenotypem (regres vývoje, postižení CNS, dysmorfické rysy, někdy poruchy sluchu, kožní nálezy aj.)
- modifikované **oligosacharidové struktury jsou vylučovány v moči**

**Laboratorní diagnostika:** Morfologicky - inkluze v krevních elementech  
Biochemicky – oligosacharidy v moči, deficit enzymové aktivity v buňkách (např leukocyty), DNA analýza

# Příklady katabolismu glykokonjugátů : glykoproteiny



*Probíhají dvě skupiny reakcí z opačných konců degrační cesty a jsou číslovány podle svého pořadí v tomto procesu:*

**Reakce 1-6:** odštěpování jednotek od neredukujícího konce řetězce exoglykosidasami. (1)  $\alpha$ -neuraminidasa (sialidasa), vyžadující kathepsin A; (2)  $\beta$ -galaktosidasa vyžadující kathepsin A; (3)  $\beta$ -hexosaminidasa; (4)  $\alpha$ -mannosidasa; (5)  $\alpha(1-6)$ mannosidasa; (6)  $\beta$ -mannosidasa; (7)  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidasa

**Reakce A-C:** postupné odbourávání od redukujícího konce endoglykosidasami. (A)  $\alpha$ -fukosidasa; (B) glykosylasparaginasa; (C) chitobiasa

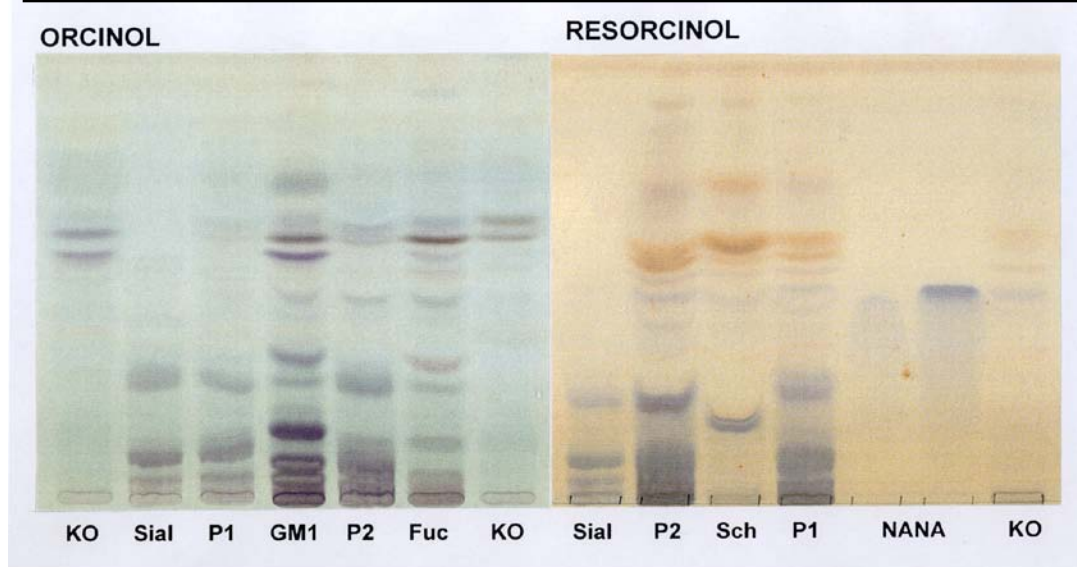
Sia: Sialic acid  
 $\beta$ Gal:  $\beta$ -linked galactose  
 $\beta$ GlcNAc:  $\beta$ -linked N-Acetyl glucosamine  
 $\alpha$ Man:  $\alpha$ -linked mannose  
 $\beta$ Man:  $\beta$ -linked mannose  
 $\alpha$ Fuc:  $\alpha$ -linked fucose  
 $\beta$ GalNAc:  $\beta$ -linked N-Acetyl galactosamine  
 Asn: Asparagin  
 Thr/Ser: Threonine or Serine

# Glykoproteinosy

Nemoc / Příčina	Hromadění glykoproteinů	Hromadění glykolipidů
$\alpha$ -mannosidosa / enzym	hlavní	ne
$\beta$ -mannosidosa / enzym	hlavní	ne
$\alpha$ -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

## Příklady:

### Glykoproteinosy - HPTLC oligosacharidů v moči



Sial = sialidosa

GM1=GM1 gangliosidosa

Fuc = fukosidosa

Sch=Schindlerova choroba

P1,P2=pacient s podezřením na Sch

KO= kontrolní vzorek

NANA= standard kys.sialové

### $\alpha$ -mannosidosa: vakuoly v lymfatické tkáni tonsil



# Glykosaminoglykany (GAG) a mukopolysacharidosy (MPS)

- GAG jsou nejčetnější polysacharidové struktury kovalentně vázané na protein, s dlouhými strukturami obsahujícími disacharidové jednotky; zajišťují vysokou viskozitu a rigiditu
- tvoří důležitou integrální součást buněčných membrán, extracelulární matrix i některých intracelulárních struktur

## Důležité glykosaminoglykany (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

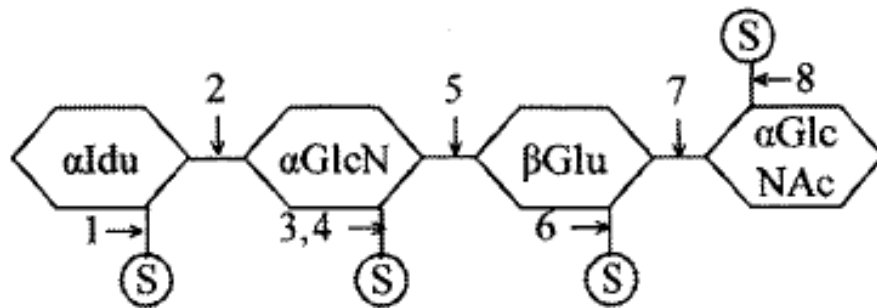
# Mukopolysacharidosy (MPS)

- 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 skupin onemocnění
- důsledkem je lysosomální hromadění GAG ve všech typech buněk (hlavně buňky mesenchymu, ale i epiteliální a neuronální)
- typické kostní a kloubní změny s poruchou růstu, kraniofaciální dysmorfie, regres psychomotorického vývoje, hepatosplenomegalie, kardiomyopatie, zákal rohovky, poruchy sluchu
- fragmenty GAG jsou vylučovány v moči pacientů

**Laboratorní diagnostika:** Morfologicky - inkluze v krevních elementech,  
**Biochemicky - deficit enzymové aktivity v buňkách (leukocyty)**  
Průkaz vylučování GAG v moči - ELFO  
**DNA analyza**



## Příklady katabolismu glykokonjugátů: glykosaminoglykany (GAG)



HEPARAN SULFÁT

$\alpha$ Idu:  $\alpha$ -Iduronic acid

$\alpha$ GlcN:  $\alpha$ -linked Glucosamine

$\beta$ Glu:  $\beta$ -linked Glucuronic acid

$\alpha$ GlcNAc:  $\alpha$ -linked N-Acetylglucosamine

*Zúčastněné hydrolasy (a jedna transferasa): (1) iduronat-sulfatasa; (2)  $\alpha$ -iduronidasa; (3) heparan sulfatasa; (4) Acetyl-CoA transferasa; (5)  $\alpha$ -N-acetylglukosaminidasa; (6) glukuronát sulfatasa; (7)  $\beta$ -glukuronidasa; (8) N-acetylglukosamin-6-sulfatasa*

# MPS: primární defekt a hromaděné GAG

Nemoc	Enzymový deficit	Hromaděné GAG
MPS I (Hurler,Schie)	$\alpha$ -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 $\alpha$ -N-acetalglukosaminidasa AcCoA : $\alpha$ -glukosaminid N-acetyltransferasa N-acetylglukosamin-6-sulfat sulfatasa	HS
MPS IV A (Morquio A) <b>MPS IV B (Morquio B)</b>	Galaktosa-6-sulfatasa <b><math>\beta</math> - galaktosidasa</b>	KS <b>ale GM1 gangliosid se            normálně odbourává</b>
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arylsulfatasa B	DS
MPS VII	$\beta$ -glukuronidasa	HS,DS,CS

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

## ***Příklad:***

**MPS II: Hunterova  
choroba**

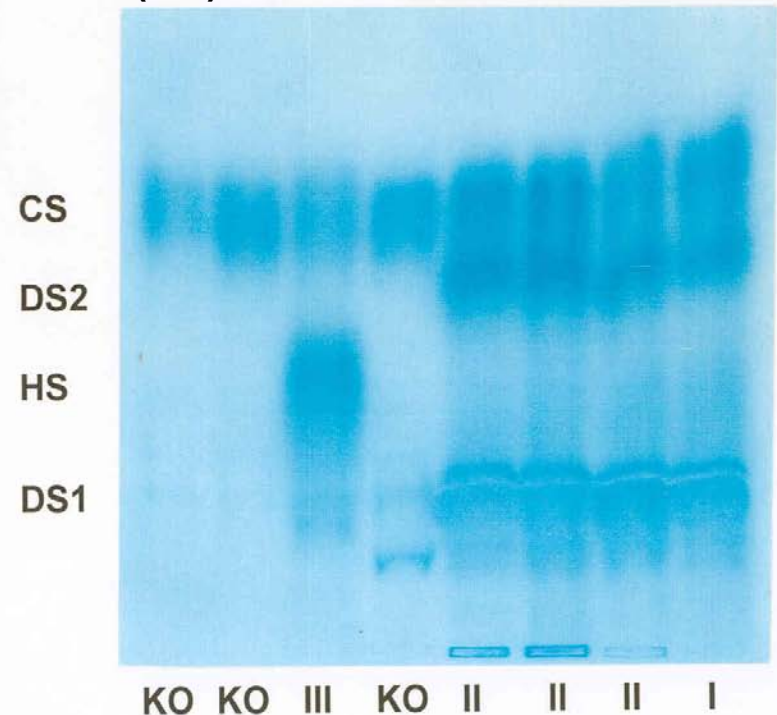
**Deficit aktivity alfa-  
iduronosulfat sulfatasy**

**Dědičnost je vázaná na  
X-chromosom**

**ELFO glykosaminoglykanů moči:**

***Exkrece dermatan sulfátu (DS1 a  
DS2 u MPS I a II and heparan  
sulfátu (HS) v moči pacientů s  
MPS III***

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



***KO=kontrola***

***CS=chondroitin sulfát***

## Další lysosomální enzymopatie:

### Glykogenosy – Pompeho choroba

- porucha degradace glykogenu
- **deficit lysosomální  $\alpha$ - glukosidasy**
- klinické znaky: myopathie, kardiomyopathie, CNS nepostižen, různé formy nemoci
- diagnosa: enzymová analýza v leukocytech (inhibice akarbosou) aj. buňkách
- **existuje enzymová terapie**

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

- ubikviterní enzym hydrolyzující estery cholesterolu a TAG
- hlavní známý zdroj substrátu: endocytosa lipoproteinů
- postiženy jsou tkáně s konstitucionálně vysokou endocytosou LDL (hepatocyty, steroidogenní tkáně), *částečně* histiocyty (oxidované lipoproteiny)

#### Laboratorní nálezy v krevní plasmě:

**zvýšení celkového sérového cholesterolu :  $8.0 \pm 0.2$  mmol/l** (kontroly 3.83 – 5.80 mmol/l)

**snížení cholesterolu v třídě HDL:  $0.69 \pm 0.2$  SD mmol/l** (kontroly 1.1. – 1.60 mmol/l)

**zvýšení koncentrace apo B:  $2.15 \pm 0.5$  SD g/l** (kontroly 0.3 – 0.63 g/l)

## Další lysosomální poruchy způsobené:

### 3. chybnou posttranslační modifikací lysosomálních enzymů (n =2):

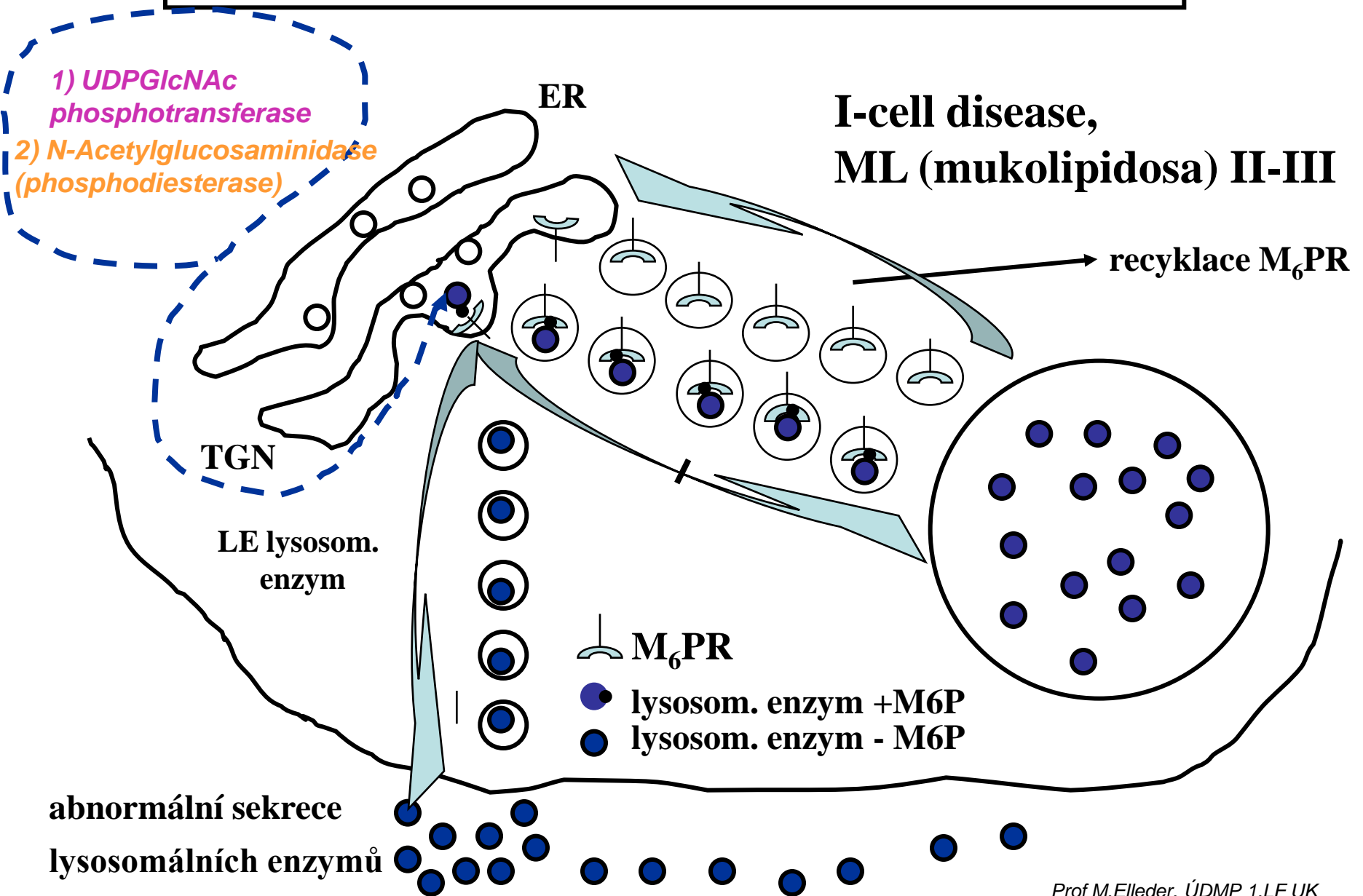
**polysulfatásový deficit** – chybí enzym, který v ER konvertuje v doméně katalytického aktivního místa společného všem 12 sulfatasam **cystein na formylglycin**

**mukopolidosa typu II (ML II)** – chybný transport enzymů v důsledku nefunkční **UDP- GlcNAc:lysosomální enzym GlcNAc-1-fosfotransferasy** v cis-Golgi

### 4. destabilisací enzymového komplexu (n=1)

**galaktosialidosa** (deficit **kathepsinu A** = *multifunkční enzym s deamidásovou/esterásovou aktivitou*)

# *ML II - defekt posttranslační úpravy-* chybné cílení lysosomálních enzymů do lysosomů



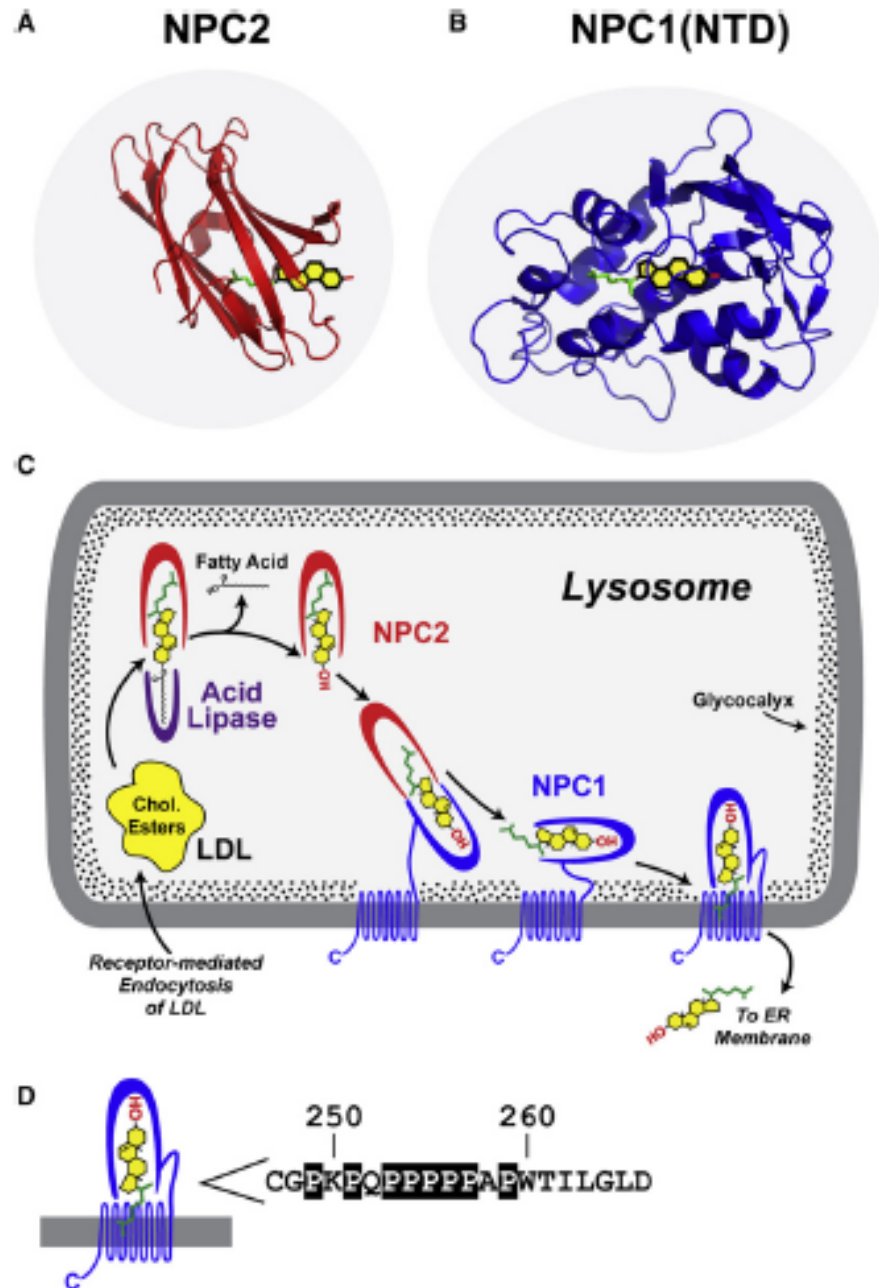
## Poruchy lysosomálních proteinů s nekatalytickou funkcí:

mutace proteinových transportérů v lysosomální membráně a dalších méně definovaných *neenzymových proteinů* lysosomálních a Golgiho membrán se střeďáním *heterogenní skupiny látek*:  
*MLIV; NPC1-2; NCL 3,5,6,8*

- Příklad: NPC1, NPC2 proteiny

Předpokládaný model  
výstupu LDL/VLDL-  
cholesterolu z lysosomů

- A) Struktura NPC2 navázaného na cholesterol
- B) Struktura NPC1 (NTD) navázaného na cholesterol
- C) Navržená dráha transferu cholesterolu z LDL/ $\beta$ VLDL na NPC2 a NPC1 proteiny a na membránu
- D) Sekvence AMK 247-266 která váže N-terminální doménu NPC1 k první transmembránové doméně obsahující 8 prolinových zbytků. Tato doména je u obratlovců značně konzervována.





# 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,  $\alpha$ -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 bariéru
- BMT (bone marrow transplantation) : nejúspěšnější u MPS I, nutno provádět v ranném dětství, nese značné riziko
- genová terapie – zatím na úrovni experimentální

# EET: stabilizace enzymového proteinu účinkem farmakologických chaperonů

