

Přírodovědecká fakulta UK v Praze
1.Lékařská fakulta UK, Praha

**Příspěvek k objasnění molekulární podstaty
vybraných lysosomálních onemocnění**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Praha 2008

Martin Hřebíček

Obsah

1 Úvod	4
1.1 Předmluva	4
1.2 Lysosomální systém a lysosomální onemocnění: obecný úvod	5
1.2.1 Transport lysosomálních proteinů.....	6
1.2.2 Lysosomální enzymopatie.....	7
1.2.3 Poruchy procesování a/nebo transportu lysosomálních proteinů.....	9
1.2.4 Deficity aktivátorů lysosomálních hydrolas.....	9
1.2.5 Deficity transportních proteinů lysosomální membrány.....	10
1.2.6 Deficity ostatních lysosomálních membránových proteinů.....	10
1.2.7 Jiné.....	11
1.2.8 Dědičnost a genetické aspekty lysosomálních onemocnění	11
1.2.9 Genetická péče o rodiny s lysosomálními onemocněními.....	12
2 Cíle práce.....	17
3 Výsledky a publikace	18
3.1 Chitotriosidasa.....	19
3.1.1 Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages.....	20
3.2 Deficit prosaposinu.....	22
3.2.1 A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation.....	23
3.2.2 Prosaposin deficiency -- a rarely diagnosed, rapidly progressing, neonatal neurovisceral lipid storage disease. Report of a further patient.....	26
3.3 Fabryho choroba (deficit alfa-galaktosidasy A).....	27
3.3.1 Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population.	28
3.3.2 Recurrence of Fabry disease as a result of paternal germline mosaicism for alpha-galactosidase A gene mutation.	32
3.4 Mukopolysacharidosa IIIC (deficit acetyl CoA: glukosaminid N-acetyltransferasy, M.Sanfilippo IIIC).....	33
3.4.1 Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome).....	34
4 Závěr.....	37
5 Poděkování	39
6 Literatura.....	39

1 Úvod

1.1 Předmluva

Lidská genetická onemocnění často poskytují jedinečný pohled na funkci bílkoviny, jejíž deficit onemocnění způsobuje. U dědičných metabolických onemocnění, u kterých chybějící enzym, aktivátor nebo transportní protein "zablokuje" metabolickou cestu, můžeme získat dodatečný rozměr pohledu z analýzy metabolitů. U lysosomálních chorob, podmnžiny dědičných metabolických onemocnění, u kterých se v buňkách střeádají metabolity s komplexními biologickými funkcemi, nám klinické projevy, morfologické a biochemické změny dávají tušit velký rozsah toho, co zatím nevíme o molekulární patologii těchto nemocí a příčinách klinických projevů. Cílem této disertační práce je přispět malým dílem k znalostem, které v tomto směru máme o lysosomálních nemocech. Věřím, že lidstvo postupně pochopí molekulární podstatu těchto nemocí a že to povede k lepším a kauzativním léčebným postupům, aspoň pro některé z nemocí.

S výjimkou jedné byly předkládané studie prováděny na půdě Ústavu dědičných poruch metabolismu I.LF, kde se skupina vedená Prof. Ellederem a RNDr Janou Ledvinovou dlouhodobě zabývá diagnostikou a výzkumem sfingolipidos na morfologické a biochemické úrovni. Cílem studií bylo zpočátku na tuto práci navázat a doplnit ji o analýzu DNA, zhodnotit vztah genotyp/fenotyp a propojit tyto výsledky s biochemickými studiemi. Později se rozšířily o studium epigenetických vlivů jako je inaktivace chromozomu X a o další molekulární aspekty lysosomálních chorob.

Poslední lysosomální enzymopatii, u které nebyl znám gen kódující deficitní enzym, byla mukopolysacharidosa typu IIIC (deficit acetyl-koenzym A:glukosaminid N-acetyl transferázy). Objevení tohoto genu a jeho charakterizaci popisuje poslední práce této teze.

1.2 Lysosomální systém a lysosomální onemocnění: obecný

úvod

Lysosomální systém je místem, kde se odbourává velký podíl exogenních a endogenních makromolekul (na odbourávání endogenních bílkovin se významně podílí proteasomy v cytosolu). Lysosomální lumen obsahuje enzymy – většina z nich jsou hydrolasy s typickým kyselým pH optimem a vysokou substrátovou specificitou. Lysosomální membrána je tvořena jednoduchou fosfolipidovou dvojrůstvou a obsahuje hojně glykosylované membránové proteiny. O glykosylaci se předpokládá, že lysosomální membránu chrání před účinky hydrolytických enzymů v lumen. Mezi membránovými lysosomálními proteiny jsou transportní proteiny, které exportují metabolity vzniklé degradací makromolekul, receptory, vakuolární protonová pumpa, udržující kyselé prostředí uvnitř lysosomu, integrální membránové proteiny, receptory, proteiny participující na vesikulárním transportu a další proteiny s neznámou nebo špatně charakterizovanou funkcí. V lysosomální membráně je překvapivě i elektrontransportní řetězec [1], jehož funkce v lysosomu není známa.

Geneticky podmíněné deficity velké části těchto proteinů, zejména hydrolas, vedou ke vzniku lidských onemocnění, pro které je charakteristická akumulace materiálu uvnitř lysosomů. Strádaný materiál je obvykle tvořen substrátem deficitního enzymu, může se však jednat o komplexní směs látek, jako je tomu deficitu některých aktivátorových nebo transportních proteinů, tak jak je diskutováno níže.

Lysosomy byly definovány jako terminální degradativní kompartment buňky [2]. Degradace lysosomálními hydrolasami začíná již v pozdních endosomech, od kterých se lysosomy odlišují mj. nižším pH a absencí mannosu-6-fosfátových receptorů. Lysosomy jsou elektrodensní a mohou obsahovat interní vesikuly [3].

In vitro bylo prokázáno, že lysosomy mohou navzájem fúzovat nebo mohou fúzovat i s pozdními endosomy. Lysosomy byly tradičně pojímány jako statická degradativní organela na konci endosomálního systému. Jak je vidět z výše uvedeného, pojetí lysosomů se v posledním desetiletí podstatně změnilo, lysosomy jsou nyní podstatně dynamičtější organelou komunikující s jinými kompartmenty a s plasmatickou membránou[4,5].

1.2.1 Transport lysosomálních proteinů

Většina lumenálních lysosomálních proteinů je transportována do lysosomu z trans-Golgiho aparátu mannosu-6-fosfátovým receptorem [6,7]. Mannosu-6-fosfátový třídící signál je

vytvořen známým způsobem účinkem enzymů během průchodu z ER do Golgiho aparátu. Proteiny obsahující M6P signál jsou vychytávány mannos-6-fosfátovými receptory. Mannoso-6-fosfátový receptor nezávislý na kationtech (CI-M6PR, MPR300) transportuje proteiny s M6P signálem také z plasmatické membrány, kation-dependentní M6PR (CD-M6PR, MPR46) váže ligandy přednostně při pH odpovídajícímu Golgiho aparátu (6.5), ale neinteraguje s lysosomálními enzymy při pH lysosomální membrány (7.4). V kyselém prostředí endosomu se ligandy od M6P receptorů uvolňují.

Deficit GlcNac transferasy (UDP-N-acetylglukosamin:lysosomální enzym N-acetylglukosamin-1-fosfotransferasy), která je klíčovým enzymem při vytváření M6P signálu vede k I-cell disease, lysosomálnímu onemocnění pro které je charakteristická porucha třídění vedoucí k intracelulárnímu deficitu proteinů, které normálně nesou M6P signál a k jejich sekreci do extracelulárního prostředí [8,9].

Membránové lysosomální proteiny mají třídící signály v krátkých amino-koncích orientovaných do cytosolu a jsou rozpoznávány adaptorovými proteiny, které se podílí na jejich transportu do lysosomu [10,11].

Nedávno publikovaná práce identifikovala lysosomální membránový protein LIMP-2 (lysosomal integral membrane protein 2, též LGP85) jako receptor pro rozpoznávání a transport glukocerebrosidasy nezávislý na mannos-6-fosfátu [12]. LIMP-2 je glykosylovaný membránový protein III. typu s dvěma transmembránovými doménami, lumenální doménou o délce cca 400 aminokyselinových zbytků a krátkou cytoplasmatickou doménou (20 aminokyselin). Vazba glukocerebrosidasy na LIMP-2 je závislá na pH, v kyselém prostředí dochází k jejich disociaci. Deficit LIMP-2 vede u myši s vyřazeným genem (knock-out) pro LIMP2 k poruše transportu glukocerebrosidasy do lysosomu [13]. Zatím není známo zda LIMP-2 transportuje i jiné proteiny. V tomto roce byl nalezen první pacient s deficitem LIMP-2, klinickému obrazu dominoval nefrotický syndrom a progresivní myoklonická epilepsie [14].

Sortilin je alternativním receptorem pro lysosomální kyselou sfingomyelinázu, prosaposin a saposiny a pravděpodobně pro další proteiny, které obsahují saposinu podobnou doménu (saposin-like domain) [15,16]. Kyselá sfingomyelináza je kromě sortilinu transportována také pomocí mannos-6-fosfátového receptoru – tomu odpovídá její částečný deficit u I-cell disease. Transport prosaposinu do lysosomu vyžaduje také vazbu sfingomyelinu na konservovanou doménu saposinu D; je možné, že transport závisí na tvorbě mikrodomén obsahujících sfingomyelin.

Po uvolnění karga v endosomálním kompartmentu se třídící receptory vrací do Golgiho aparátu pomocí **retromerového komplexu** [17,18,19]. Zpětný transport jak MP6P receptoru, tak i sortilinu závisí na retromerovém komplexu.

1.2.2 Lysosomální enzymopatie

Funkční deficit lysosomálního enzymu může mít různé příčiny: například deficit aktivity arylsulfatázy A může být způsoben mutacemi v genu ARSA, který kóduje enzym, nebo v jeho aktivátoru saposinu B. Deficit může být také způsobený deficitem enzymu, který modifikuje při translokaci enzymu do endoplasmatického retikula cysteinový zbytek v aktivním centru arylsulfatázy A a vytváří cystein- α -formylglycin. Formylglycin se přímo účastní katalýzy a aktivita sulfatázy je na této postranslační modifikaci závislá. Modifikující enzym, FGE (formylglycin generating enzyme), působí u savců na dvanáct sulfatáz a mutace v něm vedou k mnohočetnému deficitu sulfatáz (multiple sulfatase deficiency).

Onemocnění diskutovaná v tomto oddílu („lysosomální enzymopatie“) jsou způsobena mutacemi v genech kódujících enzymy. Pokud není uvedeno jinak, tak obecná reference pro tuto podkapitolu je [20].

Od 60. let minulého století biochemické studie prokázaly deficit zhruba 30 lysosomálních enzymů jako příčinu onemocnění spojených s ukládáním materiálu v lysosomech (viz Tabulka 1). Glykosidasy, které tvoří největší část enzymů deficitních u lidských onemocnění, mají vysokou substrátovou specifitu a většina z nich jsou exoglykosidasy. Na odštěpení terminálního sacharidu např. z oligosacharidového řetězce tak závisí odštěpení dalších monosacharidů. V případě deficitu enzymu se tak nemohou uplatnit další enzymy v metabolické cestě, i když jejich aktivita není snížena. V situaci, kdy odštěpení jednoho specifického residua závisí na jediném enzymu s vysokou substrátovou specifitou, který není zastupitelný jinými enzymy, mutace v jednom genu vedou k "zablokování" celé metabolické cesty. Není tedy překvapující, že deficity lysosomálních glykohydrolas jsou nejčastěji příčinou stádavých onemocnění [21,22].

Lysosomální enzymopatie můžeme rozdělit podle typu makromolekul, na jejichž odbourávání se podílejí deficitní enzymy.

Mukopolysacharidosy, poruchy odbourávání glykosaminoglykanů, jsou způsobeny deficitem deseti lysosomálních enzymů. Devět z těchto enzymů jsou luminální glykohydrolázy a sulfatasy, desátým enzymem je acetyl-koenzym A:glukosaminid N-acetyl transferasa, která katalyzuje v lysosomu neobvyklou syntetickou reakci : přenos acetylového zbytku na glukosaminidový zbytek heparan sulfátu. Enzym také katalyzuje přenos acetylového zbytku

pocházejícího z cytosolového acetyl-koenzymu A přes lysosomální membránu. Jednotlivá onemocnění jsou stručně shrnuta v *Tabulce I*.

Deficity sedmi hydroláz, které participují na odbourávání oligosacharidových řetězců glykoproteinů způsobují **glykoproteinomy**. Šest z nich jsou exoglykosidasy, které postupně odbourávají oligosacharidový řetězec z neredukujícího konce. Naproti tomu glykopeptidasa aspartylglukosaminidasa, jejíž deficit je příčinou aspartylglukosaminurie, štěpí vazbu mezi aspartylovým zbytkem peptidu a N-vázaným oligosacharidem.

Lipidosy (poruchy odbourávání lipidů) jsou heterogenní skupinou onemocnění. Největší část deficitních enzymů tvoří opět glykohydrolasy a sulfatasa, které působí na sacharidovou část molekuly glykolipidů. Jsou sem řazeny i deficity enzymů, které katalyzují reakci na lipidové části glykolipidů a deficit kyselé lipasy. Nejběžnější lipidosou je Gaucherova choroba z deficitu glukocerebrosidasy, u které dochází k masivnímu střeďání glukosylceramidu v lysosomech buněk makrofágového původu. Střeďající buňky mají nápadou morfologii - tzv. Gaucherovy buňky [23].

Proteinomy: Deficity enzymů, které participují na odbourávání proteinů, vedou ke vzniku tří z neuronálních ceroidlipofuscinos, onemocnění u kterých dochází k ukládání autofluorescentního pigmentu v neuronech. Střeďaný materiál je tvořen z převážné části hydrofobními proteiny jako jsou saposiny A a D nebo podjednotka c mitochondriální ATP synthasy [24]. Kromě vysoce hydrofobních proteinů mohou být v pigmentu přítomny i glykolipidy a některé další proteiny.

Katepsin K je esenciální pro odbourávání kostní proteinové matrix. Katepsin K je secernován z exkrečních lysosomů osteoklastů a jeho deficit u člověka nevede k masivnímu lysosomálnímu střeďání, ale k poruše odbourávání mezibuněčné kostní hmoty a ke kostnímu onemocnění, pyknodysostose [25].

Poruchy odbourávání glykogenu v lysosomu reprezentuje jediná nosologická jednotka, Pompeho choroba, jejíž příčinou je deficit kyselé alfa-glukosidasy. Vede ke střeďání glykogenu v lysosomech [26].

1.2.3 Poruchy procesování a/nebo transportu lysosomálních proteinů

Většina lumenálních lysosomálních proteinů je transportována z cisteren *trans*-Golgiho aparátu pomocí mannosu-6-fosfátového receptoru, který rozpoznává glykoproteiny jejichž oligosacharidové řetězce obsahují mannosu-6-fosfátový zbytek. Tento třídící signál se vytváří posttranslačně, při průchodu proteinu endoplasmatickým retikulem. Mutace v podjednotkách uridin difosfát (UDP)-N-acetylglukosamin:lysosomální enzym N-acetylglukosamin-1-fosfotransferázy (GlcNAc-fosfotransferáza), která přenáší N-acetyl

glukosaminofosfát na terminální mannosy glykanových řetězců na lysosomálních proteinech, vedou k tomu, že většina lysosomálních proteinů je sekretována z buňky, mimo endosomální/lysosomální systém. To je příčinou deficitu mnoha enzymů uvnitř lysosomu a vede k mukopolidose II a III (I-cell disease respektive pseudo-Hurlerovská dystrofii) [27,9].

Enzymy z rodiny sulfatas vyžadují postranslační modifikaci, která přeměnou cysteinového zbytku v aktivním centru enzymu vytvoří cysteinyl- α -formylglycin. Formylglycin se přímo účastní katalýzy a aktivita sulfatasy je na této postranslační modifikaci závislá. Modifikující enzym, FGE (formylglycin generating enzyme), působí u savců na dvanáct sulfatas a mutace v něm vedou k mnohočetnému deficitu sulfatas (multiple sulfatase deficiency) - včetně lysosomálních sulfatas [28,29].

1.2.4 Deficity aktivátorů lysosomálních hydrolas

Další příčinou lysosomálních onemocnění jsou deficity aktivátorů lysosomálních hydrolas : saposinů a GM2 aktivátoru (a také prosaposinu). Saposiny A,B,C a D jsou malé hydrofobní proteiny (15 - 25 kDa), které vznikají proteolytickým štěpením multifunkčního glykoproteinu prosaposinu [30,31,32]. Prosaposin a saposiny jsou dále diskutovány v kapitole 3.2. Saposiny jsou nezbytné při štěpení některých glykolipidových substrátů. Saposin A aktivuje především galaktosylceramidasy a jeho deficit vede k variantní formě Krabbeho choroby. Deficit saposinu B, jak bylo již zmíněno výše, vede k variantní metachromatické leukodystrofii a deficit saposinu C, který je nezbytný pro aktivitu glukosylceramidasy vůči přirozenému substrátu, vede k variantní Gaucherově chorobě [33,34,35,36,37]. Deficit saposinu D byl objasněn na myším modelu deficitu saposinu D, ze kterého je zřejmé, že způsobuje deficit ceramidasy [38].

Deficit GM2-aktivátoru, který je nezbytný pro aktivitu beta-hexosaminidasy A vůči glykolipidním substrátům, způsobuje variantní formu GM2 gangliosidasy [39].

1.2.5 Deficity transportních proteinů lysosomální membrány

V lysosomální membráně bylo charakterizováno více než 20 transportních proteinů, které jsou specifické pro skupiny aminokyselin, sacharidy, nukleosidy, anorganické ionty a vitaminy. U několika z nich byly popsány deficity způsobující lidská onemocnění. Deficit cystinového transportéru cystinosinu způsobuje cystinosis, která vede k ukládání volného cystinu v lysosomech za vzniku cystinových krystalů. Sialin transportuje volnou kyselinu neuraminovou (sialovou) přes lysosomální membránu a jeho deficit vede k jejímu strádání v lysosomu a vzniku lysosomálního onemocnění [40].

1.2.6 Deficity ostatních lysosomálních membránových proteinů

V této skupině jsou nejhojněji zastoupené proteiny z rodiny LAMP (Lysosome-associated membrane protein) a LIMP (Lysosomal integral membrane protein). Lysosomální membránové proteiny jsou obvykle hojně glykosylované na lumenálnímu povrchu lysosomální membrány.

Deficit LAMP2, jehož gen je lokalizován na chromozomu X, vede k Danonově chorobě [41], pro kterou je charakteristická myopatie s autofagickými vakuolami v cytoplasmě a často ke strádání glykogenu. Klinicky je nejvýraznějším rysem hypertrofická kardiomyopatie, častá je psychomotorická retardace a proximální myopatie.

1.2.7 Jiné

Funkční aktivita sialidasy, beta galaktosidasy, N-acetylamino-galacto-6-sulfát sulfatasy v lysosomu závisí na jejich asociaci v multienzymový komplex s lysosomální karboxypeptidasou katepsinem A. Přítomnost v komplexu chrání proteiny před odbouráním a prodlužuje jejich poločas uvnitř lysosomu z hodin na dny, aktivita sialidasy přímo závisí na asociaci s katepsinem A. Mutace v katepsinu A (též protective protein) mohou mít za následek rozpad komplexu a vznik lysosomálního onemocnění, galaktosialidosy [42,43]. Pacienti s galaktosialidosou mají klinické a biochemické příznaky odpovídající zhruba kombinaci deficitů jednotlivých komponent multienzymového komplexu.

Mukolipidosa IV je způsobena mutacemi v mukolipinu 1, kationtovém kanálu lysosomální membrány. Přesná funkce mukolipinu je doposud předmětem diskuse, ale několik prací svědčí pro to, že mukolipin 1 je kanálem pro H⁺ ionty a reguluje lysosomální pH. Podle těchto prací je pH v lysosomech v tkáňových kulturách od pacientů s mukolipidosou IV výrazně sníženo v důsledku porušeného transportu H⁺ z lysosomu v důsledku deficitu mukolipinu 1 [44,40]. Nápadně snížené jsou aktivity lipas.

Gen *CLN3* (nezaměňovat s *CLN3* u kvasinek, což je G1 cyklin), který je mutovaný u pacientů s juvenilní ceroidlipofuscinosou [45], kóduje transmembránový protein, který se zřejmě podílí na regulaci lysosomální acidifikace. Doposud existuje řada otázek ohledně funkce proteinu, které bude třeba zodpovědět předtím než bude možné pokládat definitivně juvenilní ceroidlipofuscinosu za deficit lysosomálního transportéru.

1.2.8 Dědičnost a genetické aspekty lysosomálních onemocnění

Většina lysosomálních onemocnění je dědičná autosomálně recesivně, výjimkou jsou Fabryho a Danonova choroba, které jsou dědičné gonosomálně - geny mutované u těchto chorob se nachází na dlouhém raménku chromozomu X.

Gen pro kyselou sfingomyelinázu je podle malého počtu prací imprintovaný a jeho exprese může být monoalelická. Gen se nachází v okolí imprintovaného úseku chromozomu 11 (11p), který se podílí na patogeneze Beckwith-Wiedemannova syndromu. U pacientů s Beckwith-Wiedemannovým onemocněním byly popsány snížené aktivity sfingomyelinázy [46, 47].

mRNA pro alfa-galaktosidasu A, jež je deficitní u Fabryho onemocnění, podle jedné práce podléhá RNA editování. Práce z jiných laboratoří editování této mRNA nepotvrdily [48].

1.2.9 Genetická péče o rodiny s lysosomálními onemocněními

Velkou část lysosomálních onemocnění lze pokládat za velmi závažná neléčitelná hereditární onemocnění, u kterých je v případě postižení plodu indikováno ukončení těhotenství z genetické indikace. Genetická péče se soustřeďuje na identifikaci osob s možným postižením, identifikaci heterozygotů a určení rizika postižení plodu v těhotenství. V rodinách je poskytováno genetické poradenství a u párů s vysokým rizikem postižení plodu je nabízena prenatální diagnostika. Identifikace přenašečů je zvláště významná u gonosomálně recesivních onemocnění, kde jedna kopie mutantního genu zděděná od heterozygotní matky stačí k rozvoji onemocnění u plodu. Pro určení heterozygotů v rodinách jsou s výhodou užívány molekulárně genetické metody.

Tabulka I: Lysosomální onemocnění

Onemocnění	deficitní enzym/protein	střádaný materiál/substrát	Hlavní příznaky
<u>Mukopolysacharidosy</u>			
MPS I (M.Hurler, M.Scheie)	α -L-iduronidasa	DS, HS	organomegalie, dysostosis multiplex, faciální dysmorfie, zákal rohovky, mentální retardace +/-, malý vzrůst
MPS II (M.Hunter)	iduronát sulfatasa	DS, HS	organomegalie, dysostosis multiplex, faciální dysmorfie, mentální retardace +/-, malý vzrůst
MPS IIIA (M.Sanfilippo A)	heparan-N-sulfatasa	HS	těžká mentální retardace, hyperaktivita, mírnější fyzické postižení, spasticita
MPS IIIB (M.Sanfilippo B)	α -N-acetyl glukosaminidasa	HS	stejně jako MPS IIIA
MPS IIIC (M.Sanfilippo C)	acetyl-koenzym A:glukosaminid N-acetyl transferasa	HS	stejně jako MPS IIIA
MPS IIID (M.Sanfilippo D)	N-acetylglukosamin sulfatasa	HS	stejně jako MPS IIIA
MPS IVA (M.Morquio A)	galaktosa 6-sulfatasa	KS, H6S	specifické postižení skeletu, zákal rohovky, normální inteligence
MPS IVB (M.Morquio B)	β -galaktosidasa	KS	podobné jako MPS IVA
MPS VI (M.Maroteaux-Lamy)	N-acetylglaktosamin 4 -sulfatasa (arylsulfatasa B)	DS	dysostosis multiplex, zákal rohovky, organomegalie, normální inteligence
MPS VII (M.Sly)	β -glukuronidasa	DS, HS, C4S, C6S	dysostosis multiplex, organomegalie, variabilní tíže postižení
MPS IX	hyaluronidasa	hyaluronan	malý vzrůst, periartikulární měkká ztlustění
<u>Glykoproteinosy(oligosacharidosy)</u>			
Schindlerova choroba Kanzaki disease	α -N-acetylglaktosaminidasa	glykopeptidy, oligosacharidy a glykolipidy s terminálním α -N-acetylglaktosaminilovým zbytkem	neuroaxonální dystrofie, psychomotorická retardace, kortikální slepota, myoklonus, Existuje mírnější adultní forma s angiokeratoma corporis diffusum(Kanzaki disease)
α -mannosidosa	α -mannosidasa	oligosacharidy s terminální α -mannosou	organomegalie, dysostosis multiplex, psychomotorická retardace, hluchota, porucha chemotaxe leukocytů
β -mannosidosa	β -mannosidasa	oligosacharidy s terminální β -mannosou	mentální retardace, hluchota, respirační infekce, spasticita, angiokeratomy
fukosidosa	α -fukosidasa	oligosacharidy s terminální α -fukosou	psychomotorická retardace, dysmorfie, dysostosis multiplex, angiokeratomy, zvýšené chloridy v potu
sialidosa	neuraminidasa	oligosacharidy s terminální kyselinou neuraminovou	třešňová skvrna, generalizovaný myoklonus, křeče, ataxie, hyperreflexie, u části pacientů visceromegalie, dysostosis multiplex, mentální retardace

aspartylglukosaminurie	aspartylglukosaminidasa	aspartylglukosamin	progredující psychomotorická retardace, mírná dysmorfie, křeče
<u>Poruchy lysosomálního odbourávání glykogenu</u>			
Pompeho choroba	kyselá a-glukosidasa (kyselá maltáza)	glykogen	hypertrofická kardiomyopatie, myopatie, hepatomegalie
<u>Lipidosy</u>			
Wolmanovachoroba, cholesteryl ester storage disease	kyselá lipáza	cholesteryl estery, triglyceridy	hepatosplenomegalie, steatorhea, kalcifikace nadledvin, neprospívání cholesteryl ester storage disease má výrazně benignější průběh: hepatomegalie, předčasná aterosklerosa, hyperbetalipoproteinemie
Farberova lipogranulomatosa	kyselá ceramidasa	ceramid	deformace a bolesti kloubů, podkožní uzlíky v okolí kloubů, chraptivý hlas, postižení jater, srdce
Niemann-Pickova choroba typu A a B	kyselá sfingomyelináza	sfingomyelin	hepatosplenomegalie, progresivní neurodegenerativní průběh, plicní infiltrace
Gaucherova choroba	β -glukocerebrosidasa	glukosylceramid	hepatosplenomegalie, cytopenie, osteopenie, výjimečně supranukleární obrna okohybných nervů, demence, spasticita; Parkinsonova choroba ?
Krabbeho choroba	β -galaktosylceramidasa	galaktosylceramid	leukodystrofie, hypersensitivita k externím stimulům, spasticita, hluchota, slepota, demence
Metachromatická leukodystrofie	arylsulfatasa A	3-0-sulfogalacto glykolipidy	porucha chůze, mentální regrese, progredující spasticita, leukodystrofie, poruchy chování, u dospělých psychotické změny
Fabryho choroba	α -galaktosidasa A	globotriaosylceramid,	hypertrofická kardiomyopatie, selhání ledvin, angiokeratomy, snížené pocení, periferní neuropatie,
G _{M1} gangliosidosa	β -galaktosidasa	gangliosid G _{M1}	psychomotorická retardace, spasticita, hepatosplenomegalie, třešňová skvrna
Galaktosialidosa	katapsin A/protektivní protein	jako u deficitu β -galaktosidasy a neuraminidasy	organomegalie, dysostosis multiplex, faciální dysmorfie, mentální retardace, spasticita, třešňová skvrna
Tay-Sachsova choroba	β -hexosaminidasa-podjednotka α (HEXA)	gangliosid G _{M2}	progredující neurologické onemocnění, spinocerebellární degenerace, vystupňovaná úleková reakce, dystonie, třešňová skvrna
Sandhoffova choroba	β -hexosaminidasa-podjednotka β (HEXB)	gangliosid G _{M2}	progredující neurologické onemocnění, spinocerebellární degenerace, vystupňovaná úleková reakce, dystonie, třešňová skvrna
<u>Deficity aktivátorů hydrolas</u>			
deficit prosaposinu	prosaposin	mnohočetné glykolipidy	při narození hepatosplenomegalie, závažné neurologické postižení, křeče, úmrtí do 6 měsíců
deficit saposinu A	saposin A		variantní Krabbeho choroba

deficit saposinu B	saposin B		variantní metachromatická leukodystrofie
deficit saposinu C	saposin C		variantní Gaucherova choroba s neurologickým postižením
Deficit GM2 aktivátoru	GM2 aktivátor	gangliosid GM2	progredující neurologické onemocnění, spinocerebellární degenerace, vystupňovaná úleková reakce, dystonie, třesňová skvrna
<u>Neuronální ceroidlipofuscinosy</u>			
Kongenitální NCL	katapsin D	saposin D a A	závažné neurologické abnormality při narození, křeče, mikrocefalie, apnoe,
Infantilní neuronální ceroidlipofuscinososa (NCL) (CLN1)	protein-palmitoyl thioesterasa	saposin D a A	slepota, křeče, demence, stereotypní pohyby rukou, choreoatetosa, výrazná atrofie mozku
Pozdní infantilní NCL (LINCL) (CLN2)	tripeptidylpeptidasa	podjednotka c ATP synthasy	křeče, demence, zrakové selhání, myoklonus, ataxie, atrofie mozku
Juvenilní NCL (CLN3)	battenin	podjednotka c ATP synthasy	slepota, křeče, demence, myoklonus, setřená řeč, echolalie, atrofie mozku
Adultní NCL (CLN4)	CLN4	podjednotka c ATP synthasy	demence, faciální dyskinesy, myoklonus, psychotické příznaky, atrofie mozku
Finská LINCL (CLN5)	CLN5	podjednotka c ATP synthasy	křeče, demence, zrakové selhání, myoklonus, ataxie, atrofie mozku
Variantní LINCL (CLN6)	CLN6	podjednotka c ATP synthasy	křeče, demence, zrakové selhání, myoklonus, ataxie, atrofie mozku
Turecká LINCL (CLN7)	CLN7	podjednotka c ATP synthasy	křeče, demence, zrakové selhání, myoklonus, ataxie, atrofie mozku
progresivní epilepsie s mentální retardací (CLN8)	CLN8	podjednotka c ATP synthasy	křeče, demence
<u>Deficity lysosomálních transportních proteinů</u>			
cystinosa	cystinosin	cystin	zákal rohovky, hepatopatie, nefropatie, porucha růstu, acidosa
Sialic acid storage disease, Salla disease	sialin	volná kyselina sialová	neprospívání, hepatosplenomegalie, psychomotorická retardace, dysostosis multiplex
Mukopolipidosa IV	mucopolipin-1	komplexní strádání materiální	psychomotorická retardace, oční abnormality porucha acidifikace endosomu
<u>Jiné</u>			
mnohočetný deficit sulfatas (multiple sulfatase deficiency)	formylglycin generating enzyme (FGE)	strádání a změny způsobené deficitem 12 sulfatas	variabilní fenotypové projevy odpovídající deficitu jednotlivých sulfatas, mj. hepatomegalie, hrubé rysy obličeje, ichtiosa
I-cell disease, pseudo-Hurler polydystrophy	N-acetylglukosaminyl-1-fosfotransferasa	komplexní strádání způsobené deficitem proteinů transportovaných M6PR	dysmorfie, zbytnění dásní, dysostosis multiplex, organomegalie, psychomotorická retardace, zákal rohovky
Pyknodysostosa	Katepsin K		malý vzrůst, dysmorfie, generalizovaná osteoskleróza,

Niemann-Pickova choroba typu C	neenzymové proteiny NPPC1 a NPC2	cholesterol, glykolipidy	variabilní hepatosplenomegalie, vertikální supranukleární oftalmoplegie, progresivní ataxie, dystonie a demence
Danonova choroba	LAMP2	komplexní strádání, glykogen	Kardiomyopatie, akumulace autofagických vakuol v srdečním a kosterním svalu
Zkratky: LAMP2 ... lysosomal membrane protein 2 NCL ... neuronální ceroidlipofuscinosa LINCL ... pozdní infantilní NCL (late infantile NCL) M6PR ... mannosu-6-fosfátový receptor HS ... heparan sulfát DS... dermatan sulfát C4S ... chondroitin 4 sulfát C6S ... chondroitin 6 sulfát KS ... keratan sulfát			

2 Cíle práce

1. Deficit prosaposinu, prekursorového proteinu pro aktivátory glukocerebrosidasy a dalších lysosomálních hydroláz, byl do té doby popsán u jedné rodiny na světě. Naším cílem bylo v další rodině podrobně charakterizovat klinické, morfologické, biochemické a molekulární rysy onemocnění a odvodit z nich poznatky o patogeneze choroby.
2. Chitotriosidasa je chitináza masivně exprimovaná strádajícími Gaucherovými buňkami u Gaucherovy choroby. Cílem studie, na které se autor teze podílel při práci v zahraniční laboratoři, bylo charakterizovat i další, neenzymové členy proteinové rodiny, do které chitotriosidasa patří.
3. U Fabryho nemoci, gonosomálně dědičné sfingolipidosy, byl nejasný vliv inaktivace chromozomu X na fenotyp heterozygotních žen. Cílem práce bylo sledovat rozdíl mezi tíží postižení u žen s výrazným zešikmením inaktivace ve prospěch mutantního chromozomu a žen s náhodnou inaktivací a tak odvodit zda zešikmení má vliv na fenotyp. Dalším cílem práce bylo charakterizovat mutace u uceleného souboru českých pacientů s Fabryho chorobou.
Dalším cílem práce bylo objasnit na molekulární úrovni příčiny onemocnění u dvou žen s Fabryho chorobou, u jejichž rodičů nebyla v DNA izolované z krve nalezena mutace v genu pro alfa-galaktosidasu A.
4. Poslední lysosomální enzymopatií, u které nebyl znám gen kódující deficitní enzym byla Sanfilippova choroba typu C (mukopolysacharidosa IIIC, MPS IIIC). Cílem práce bylo pomocí genové vazby zúžit kandidátní interval, identifikovat gen pro onemocnění, a charakterizovat jej. Dalším cílem bylo provést analýzu mutací u co největšího počtu pacientů s MPS IIIC.

3 Výsledky a publikace

Výsledky jsou řazeny do kapitol. Diskuse k publikacím je uvedena hned v příslušné podkapitole.

3.1 Chitotriosidasa

3.1.1 Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages.

Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, Muijsers AO, Hřebíček M, Aerts JM.

Eur J Biochem. 1998 Jan 15;251(1-2):504-9.

Chitotriosidasa je lidskou chitinasou, která je exprimovaná především aktivovanými makrofágy. Její aktivita je extrémně zvýšena v séru pacientů s Gaucherovou chorobou a některými dalšími onemocněními [49] a stala se biochemickým markerem používaným pro monitorování léčby pacientů s Gaucherovou chorobou (deficit glukocerebrosidasy). Chitotriosidasa byla popsána poměrně nedávno - skupina Hanse Aertse ji objevila začátkem devadesátých let minulého století a v roce 1998 byla publikována práce popisující gen pro chitotriosidasu [50]. Své jméno získala díky schopnosti štěpit umělé chitotriosidové substráty. Je schopna štěpit chitin a předpokládá se, že může hrát roli v obraně proti patogenům obsahujícím chitin.

V plasmě a tkáních pacientů s Gaucherovou chorobou je výrazně zvýšená aktivita chitotriosidasy, díky masivní produkci Gaucherovými buňkami střádajícími glukosylceramid. Chitotriosidasa v lidských tkáních je heterogenní, jednotlivé isoformy mají rozdílný isoelektrický bod a/nebo molekulovou hmotnost. Hlavní isoforma má molekulovou hmotnost 50kDa, minoritní forma 39 kDa. 50 kDa forma je posttranslačně O-glykosylována na karboxylovém konci molekuly. Většina 50-kDa enzymu je sekretována, menší část však zůstává intracelulárně a transportována do lysosomu. Tento enzym je intracelulárně proteolytickým štěpením na karboxy konci procesován na 39 kDa formu [51].

Gen pro chitotriosidasu se nachází za chromozomu 1 (1q31), má délku 20 kb a skládá se z 12 exonů [50].

Chitotriosidasa je spolu s oviduktinem, lidským chrupavkovým glykoproteinem 39 (human cartilage glycoprotein 39, HC gp-39) a YKL39 řazena do rodiny lidských chitináz. Tyto další proteiny na rozdíl od chitotriosidázy nemají detekovatelnou enzymovou aktivitu a jejich funkce není zcela jasná.

Deficit chitotriosidázy je častý v mnoha populacích, v holandské populaci je 6% osob homozygoty a 37% osob heterozygoty pro deficitní alelu popsanou níže. Všechny vyšetřené osoby s deficitem byly homozygoty pro duplikaci 24 párů bazí v 10. exonu genu pro chitotriosidázu. Duplikace vede k aktivaci kryptického 3' sestřihového místa a k delecii 87

nukleotidů v mRNA, která neporušuje čtecí rámeček. Deficit nemá žádný zjevný fenotypový projev, což by mohlo naznačovat, že aktivita chitotriosidázy je u člověka redundantní. Funkcí orthologních chitináz u rostlin je obrana proti patogením houbám a obdobnou funkci pravděpodobně plní chitotriosidáza u člověka. Nabízí se srovnání s lysosymem, který má prokázanou antibakteriální funkci a jehož deficit u králíků není spojen s žádným fenotypem. Skupina dr. Aertse popsala v roce 2001 další lidskou chitinázu – savčí kyselou chitinázu (acidic mammalian chitinase, AMCCase) [52]. Tento enzym, který je odlišný od chitotriosidázy a má odlišné pH optimum a jinou expresi v tkáních, může hypoteticky kompenzovat funkci chitotriosidázy u osob s deficitem tohoto enzymu. AMCasa má orthology u řady savčích druhů.

Přiložená práce prokazuje, že aktivované makrofágy secernují velké množství chitotriosidasy a HC gp-39. Tento protein je lektinem, který se specificky váže na chitin a v doméně, která u chitotriosidázy odpovídá aktivnímu centru, obsahuje mutaci způsobující, že je protein enzymaticky neaktivní.

Na této práci se předkladatel podílel v době svého pobytu v laboratoři Dr. Hanse Aertse v Amsterdamu.

3.2 Deficit prosaposinu

3.2.1 A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation.

Hůlková H, Červenková M, Ledvinová J, Tocháčková M, Hřebíček M, Poupětová H, Befeckadu A, Berná L, Paton BC, Harzer K, Böör A, Šmíd F, Elleder M.

Hum Mol Genet. 2001 Apr 15;10(9):927-40.

Prosaposin je polyfunkční glykoprotein, který je prekursorem saposinů, čtyř malých aktivátorů hydroláz účastnících se lysosomálního odbourávání komplexních glykosfingolipidů a současně je mu přisuzována řada dalších funkcí intra - i extracelulárně, včetně neurotrofních a neuroprotektivních účinků. Lidský gen pro prosaposin je lokalizován na chromosomu 10 a je dlouhý více než 40 kb. mRNA pro prosaposin kóduje polypeptid o velikosti 70 kDa obsahující signální peptid pro vstup do endoplasmatického retikula a čtyři homologní domény odpovídající čtyřem saposinům A-D (SAP, sphingolipid activator protein). U lidí alternativní sestřih exonu 8, který se nachází v doméně pro saposin B, vede ke vzniku tří forem prosaposinu (524, 526 a 527 aminokyselin) [53,54,30]. Studie v tkáňových kulturách svědčí pro to, že intracelulární transport prosaposinu je do značné míry závislý na isoformě. Forma s třemi aminokyselinami kodovanými exonem 8 je přednostně sekretována, zatímco forma bez těchto aminokyselin končí přednostně v lysosomu [55].

Hanzkani-Covo a spolupracovníci [56] z fylogenetické a evoluční analýzy dostupných prosaposinových sekvencí odvodili, že lidský gen pro prosaposin vznikl pravděpodobně dvěma po sobě následujícími duplikacemi. Všechny saposiny mají obdobnou strukturu – mají velikost blízkou 80 aminokyselinám, mají šest cysteinových zbytků na obdobných pozicích, glykosylační místo a konzervovaný prolin. Všechny saposiny vznikají proteolýzou prekurzorového proteinu, prosaposinu.

Saposiny jsou navzájem vysoce homologní a jejich sekvence obsahuje šest vysoce konzervovaných cysteinových zbytků a konzervované N-glykosylační místo. Struktura disulfidových můstků byla objasněna u saposinů B, C, D. Přítomnost disulfidových můstků je nezbytná pro funkci saposinů a také se zřejmě podílí na vysoké termostabilitě saposinů a jejich odolnosti vůči kyselému pH a proteolytickým enzymům [57].

Prosaposin *in vitro* stimuluje růst neuritů a předchází apoptóze. *In vivo* bylo ukázáno, že předchází ischemickému poškození neuronů - z toho byla dovozena neuroprotektivní /neurotrofní funkce tohoto proteinu. Malé peptidy, odvozené ze sekvence aminoterminální

části saposinu – označované též jako prosaptidy - obsahují předpokládanou neurotrofní sekvenci. Syntetický prosaptid založený na této sekvenci však na ověřeném modelu spinální ischemie neměl neuroprotektivní účinky, ale naopak vedl ke zhoršení behaviorálních účinků ischemie [58,59].

Ve studiích *in vitro* byly popsány vlivy, které mají jednotlivé saposiny na aktivaci různých lysosomálních hydroláz. Průkaz aktivace *in vitro* není průkazem, že k obdobné aktivaci dochází *in vivo*, řada těchto výsledků je zjevně arteficiální a není zcela relevantní pro hodnocení funkce saposinů v organismu. Velký význam má fenotyp a biochemické abnormality u lidských a zvířecích deficitů jednotlivých saposinů. Deficit saposinu A způsobuje variantní formu Krabbeho choroby s normální aktivitou galaktocerebrosidasy. Krabbeho choroba je geneticky odlišné onemocnění způsobené mutacemi v genu pro galaktocerebrosidasu [35,60].

Deficit saposinu B je asociován s variantní formou metachromatické leukodystrofie (MLD) s normální aktivitou arylsulfatázy A, jejíž deficit je příčinou MLD [61]. Mutace v doméně pro saposin C způsobují variantní formu neuronopatické Gaucherovy choroby s normální glukocerebrosidasou [62]. Teprve nedávno bylo prokázáno na zvířecím modelu, že saposin D *in vivo* aktivuje kyselou ceramidazu [38].

Deficit celého prekursorového proteinu, prosaposinu, vede u lidí k nesmírně závažnému lysosomálnímu onemocnění, jehož příznaky jsou patrné již při narození. Toto onemocnění je předmětem dvou přiložených publikací, které popisují klinické, biochemické a molekulární nálezy u dvou pacientů s tímto velmi vzácným onemocněním. V době, kdy vyšla, popisovala první z publikací druhou známou rodinu s deficitem prosaposinu [63].

Biochemické rysy odpovídají kombinaci deficitů všech čtyř saposinů a vystupňovaná neuronální deplece je kompatibilní s deficitem neurotrofní funkce prosaposinu. Ve tkáních je přítomno střezení komplexní směsi lipidů. Detailní popis a rozbor morfologických a biochemických nálezů je součástí publikace.

V první popsané rodině s deficitem prosaposinu byl proband homozygotní pro mutaci v iniciačním kodonu genu pro prosaposin [62]. V iniciačním kodonu a v sekvenci kódující saposin A jsme nenalezli žádnou mutaci, i když byly přítomny biochemické známky deficitu všech saposinů včetně saposinu A. Homozygotní mutaci c.809delG jsme našli až v 9 exonu v doméně saposinu B. Mutace vede k posunu čtecího rámce a předčasnému stop kodonu. Naše hypotéza, že mutace vede k odbourání transkriptu mechanismem nonsense-mediated decay, byla potvrzena vyšetřením v kultivovaných kožních fibroblastech u rodičů. V jaderné RNA byl nalezen technikou RT-PCR primární transkript z mutantního genu, ale v cytosolové RNA mutantní transkript nebylo možné detekovat.

Revidovali jsme také diagnosu u pacienta, který zemřel v osmdesátých letech pod diagnosu těžké formy Niemann-Pickovy choroby typu C se strádáním laktosylceramidu [64]. Imunohistochemicky byl prokázán deficit všech saposinů a u matky pacienta byla nalezena mutace c.809delG. DNA od pacienta nebyla k dispozici pro vyšetření. Rodiny obou pacientů neudávaly vzájemné příbuzenství, obě však pochází z východního Slovenska poblíž Košic z vesnic vzdálených zhruba 30 km.

Druhá z publikací popisuje dalšího pacienta, původem z Německa. Pacient je homozygotní pro mutaci c.1 A > T, která byla nalezena v již dříve v německé rodině s deficitem prosaposinu.

Tyto publikace podrobně definovaly fenotypové rysy deficitu prosaposinu, prokázaly, že deficit celého prosaposinu může být důsledkem mutací v distálních částech genu díky mechanismu nonsense-mediated decay a upozornily dále na nutnost zvažovat diagnosu deficitu prosaposinu u dětí se závažným neurologickým postižením a organomegalii v novorozeneckém věku. Navrhli jsme dále, že vhodným způsobem screeningu u dětí s podezřením na deficit prosaposinu může být vyšetření lipidů v moči hmotovou spektrometrií - to se později potvrdilo. Revidovali jsme sekvenci prvního exonu genu pro prosaposinu a změny podali do Genbank (accession no. AF307850).

3.2.2 Prosaposin deficiency -- a rarely diagnosed, rapidly progressing, neonatal neurovisceral lipid storage disease. Report of a further patient.

Elleder M, Jeřábková M, Befekadu A, Hřebíček M, Berná L, Ledvinová J, Hůlková H, Rosewich H, Schymik N, Paton BC, Harzer K.

Neuropediatrics. 2005 Jun;36(3):171-80

Diskuse k publikaci je v předchozí kapitole

3.3 Fabryho choroba (deficit alfa-galaktosidasy A)

3.3.1 Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population.

Dobrovolný R, Dvořáková L, Ledvinová J, Magage S, Bultas J, Lubanda JC, Elleder M, Karetová D, Pavliková M, Hřebíček M

J Mol Med. 2005 Aug;83(8):647-54

Fabryho choroba je způsobena deficitem lysosomální hydrolasy alfa-galaktosidasy A. Gen pro alfa-galaktosidasu A je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu X a je homologní s genem pro lysosomální alfa-N-acetylgalaktosaminidasu (NAGA, dříve alfa-galaktosidasa B), která má podobnou substrátovou specifitu [65]. NAGA, na rozdíl od alfa-galaktosidasy A, která má afinitu k glykolipidním substrátům, působí přednostně na hydrofilní oligosacharidové substráty. Deficit NAGA u lidí je příčinou Schindlerovy choroby, respektive Kanzaki disease, u kterých se střeďají glykopeptidové substráty [66]. Předpokládá se, že oba geny vznikly duplikací hypotetického ancestrálního genu. U *C.elegans* a příbuzných organismů byl nalezen pouze jeden ortolog obou genů, jehož produkt je aktivní vůči oběma druhům substrátů. Tento gen může být blízký hypotetickému ancestrálnímu genu [67].

Lidský gen pro alfa-galaktosidasu A je lokalizován na Xq22.1 a obsahuje sedm exonů (Gen Bank accession X 14448). mRNA koduje polypeptid o 429 aminokyselinách [68]. Zprávy o editaci mRNA nebyly jinými laboratořemi potvrzeny. U pacientů s Fabryho chorobou v něm bylo nalezeno více než 300 mutací [48,69]. Diagnosa Fabryho choroby je obvykle stanovena vyšetřením aktivity alfa-galaktosidasy A v leukocytech, plasmě nebo kultivovaných fibroblastech.

Fabryho choroba je gonosomální onemocnění s těžkým postižením u hemizygotních mužů a různou tíží postižení u heterozygotních žen. Fabryho choroba byly tradičně popisována jako gonosomálně recesivní onemocnění s minimálním postižením u žen, ale novější zhodnocení fenotypu heterozygotních žen ukázalo, že postižení často bývá stejně těžké jako u hemizygotních mužů, i když v pozdějším věku [70] a že onemocnění díky tomu nelze pokládat za recesivní.

Inaktivace chromozomu X je biologicky důležitý mechanismus kompenzace genové dávky mezi pohlavími u savců. Mechanismus náhodné inaktivace chromozomu X je předmětem řady přehledných publikací (např. B. Migeon, "Females are mosaics", Oxford University Press, 2007) a nebude zde proto diskutován. Poměr mezi inaktivovanými chromozomy X je obvykle

blízký poměru 1:1. Zešíkmení inaktivace (X-inactivation skewing) ve prospěch jednoho z chromozomů X může být náhodné. Zešíkmení inaktivace je stochastický děj, v populaci zdravých žen rozdělení zešíkmení odpovídá náhodnému rozdělení. Výrazné zešíkmení ve prospěch jednoho z chromozomů může být také způsobeno selekcí buněk v důsledku mutací či polymorfismů ovlivňujících růst či přežití buněk v genech lokalizovaných na chromozomu X [71]. Příkladem je extrémní zešíkmení inaktivace v lymfocytech u žen heterozygotních pro některé formy těžké X-vázané imunodeficiency (XSCID) [72].

U žen heterozygotních pro gonosomální onemocnění inaktivace může, ale nemusí, podstatně ovlivnit tíži onemocnění. Několik publikací popisujících klinický obraz u žen s Fabryho chorobou svědčilo pro to, že inaktivace chromozomu X může ovlivnit fenotyp u žen heterozygotních pro Fabryho chorobu [73,74]. Rozhodli jsme se vztah mezi genotypem a inaktivací prozkoumat systematicky.

Problém řady dřívějších studií hodnotících vliv inaktivace chromozomu X na fenotyp u Fabryho choroby jsme viděli v tom, že nebraly do úvahy věk pacientů. Fabryho choroba je pomalu progredující onemocnění s postupným zhoršováním orgánových funkcí. Například, "lehký" průběh onemocnění ve čtyřiceti letech věku znamená obvykle závažnější postižení než "těžký" průběh ve dvaceti letech - proto bylo při hodnocení závažnosti choroby brát v úvahu věk. Rozhodli jsme se použít klinické skóre a ve spolupráci s Prof. Bultasem a jeho spolupracovníky z II. interní kliniky jsme začali skóre vyvíjet a klasifikovat pacienty. V průběhu práce bylo velmi podobné klinické skóre publikováno skupinou autorů s univerzity v Mainzu (MSSI Mainz Severity Score Index) [75]. Vzhledem k tomu, že za této je situace bylo velmi těžké naše skóre prosadit a také proto, že MSSI bylo velmi podobné našemu skóre a dávalo srovnatelné výsledky, rozhodli jsme se hodnotit fenotyp pomocí MSSI.

Zešíkmení inaktivace jsme kvantifikovali pomocí nejčastěji užívaného testu, který hodnotí metylaci v CpG ostrůvku v promotorové oblasti genu pro lidský androgenní receptor (HUMARA), alely jsou rozlišeny pomocí vysoce polymorfního délkového polymorfismu v blízké repetitivní sekvenci [76,77]. Současně jsme vyšetřili mutaci a délku repetitivní sekvence ležící na mutantním chromosomu jsme identifikovali vyšetřením u rodičů. Předpokládali jsme, že nedošlo k rekombinaci. Osoby, které byly informativní pro polymorfismus v HUMARA jsme zařadili do studie, zešíkmení inaktivace jsme vyjadřovali jako poměr mezi inaktivními chromosomy nesoucími normální sekvenci alfa-galaktosidasy A a mutantními chromosomy (XCIR - X-chromosome inactivation ratio).

Rozmezí, podle kterých se v literatuře zešíkmení inaktivace hodnotí jako "normální", "výrazně zešíkmené", "extrémně zešíkmené" a podobně, jsou čistě arbitrární a v publikacích se používají různé hodnoty. Pro účely naší studie jsme zkoumané osoby rozdělili do dvou

skupin: významné zešíkmení ($XCIR \leq 25:75$ nebo $\geq 75:25$); náhodná inaktivace ($XCIR \geq 25:75$ a současně $\leq 75:25$), tak jako jiní autoři. Pro každou ze skupin jsme vynesli do grafu celkové MSSI skóre vůči věku. Porovnávali jsme regresní křivky u obou skupin a zkonstruovali jsme několik regresních modelů, v příložené publikaci je uveden ten nejlepší z nich. Rozdíl mezi oběma skupinami pacientek byl statisticky významný, což svědčí pro významný vliv inaktivace chromozomu X na fenotyp u heterozygotních žen. I když počet informativních heterozygotek byl poměrně malý a výsledky by bylo vhodné ověřit na větší skupině, je tato práce první studií, která systematicky prozkoumala vztah mezi inaktivací a tíží postižení u žen s Fabryho chorobou a potvrdila, že dřívější pozorování nebyla náhodná.

Je velmi zajímavé, že s jednou výjimkou byl ve skupině žen s významným zešíkmením inaktivován přednostně vždy zdravý chromozom (10:1). Vzhledem k relativně malému počtu osob v této skupině se může jednat o náhodný výsledek, nelze však vyloučit, že dochází k selekci ve prospěch buněk strádajících biologicky aktivní glykolipidy (globotriaosylceramid). Rozdíl by neměl být zapříčiněn výběrem, české rodiny s Fabryho chorobou jsou systematicky vyšetřované a výběr zahrnoval ženy všech věkových skupin s různým postižením. O možném mechanismu lze pouze spekulovat, hlavní strádaný glykolipid globotriaosylceramid je receptorem pro shiga- toxin a příbuzné toxiny (jeho přirozený ligand zatím nebyl jednoznačně identifikován). Tato hypotéza vyžaduje další výzkum a výše uvedené pozorování je třeba ověřit na větším počtu heterozygotních žen.

Nenalezli jsme významný rozdíl v tíži klinického postižení mezi hemizygoty s missense a nonsense mutacemi vzhledem k věku, i když takový rozdíl našli jiní ve větším počtu pacientů jiní autoři.

V práci jsou také popsány nové nové mutace, které jsme našli v českých rodinách s M.Fabry.

3.3.2 Recurrence of Fabry disease as a result of paternal germline mosaicism for alpha-galactosidase A gene mutation.

Dobrovolný R, Dvořáková L, Ledvinová J, Magage S, Bultas J, Lubanda JC, Poupětová H, Elleder M, Karetová D, Hřebíček M.

Am J Med Genet A. 2005 Apr 1;134A(1):84-7

Germinální mosaicismus byl identifikován jako nepříliš častá příčina genetického onemocnění u řady nemocí, které ve svém přehledném článku diskutuje Zlotogora [78]. Frekvence germinálního mosaicismu se však liší u různých nemocí, u některých nemocí může být jeho výskyt poměrně vysoký – například u Duchennovy choroby je přítomen u 20% matek, které v somatických tkáních nenesou mutace nalezené u jejich postižených synů [79, 80]. To je významné riziko a je důvodem pro provedení prenatální diagnostiky.

Germinální mosaicismus pro mutaci vzniká v časně embryogenesi buď přímo v zárodečné linii nebo při vývoji tkání a má za následek současně mosaicismus germinální a somatický.

Podezření na germinální mosaicismus vznikne například pokud se rodičům, kteří nenesou v krvi mutace pro některé dominantní či gonosomální onemocnění narodí dvě či více dětí s tímto onemocněním [78].

Naše publikace popisuje první dokumentovaný případ germinálního mosaicismu u Fabryho choroby a diskutuje důsledky rizika germinálního mosaicismu u Fabryho nemoci pro genetické poradenství a pro prenatální diagnostiku.

**3.4 Mukopolysacharidosa IIIC (deficit acetyl CoA:
glukosaminid N-acetyltransferasy, M.Sanfilippo IIIC)**

3.4.1 Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome).

Hřebíček M, Mrázová L, Seyrantepe V, Durand S, Roslin NM, Nosková L, Hartmannová H, Ivánek R, Čížková A, Poupětová H, Sikora J, Uřinová J, Stránecký V, Zeman J, Lepage P, Roquis D, Verner A, Ausseil J, Beesley CE, Maire I, Poorthuis BJ, van de Kamp J, van Diggelen OP, Wevers RA, Hudson TJ, Fujiwara TM, Majewski J, Morgan K, Knoch S, Pshezhetsky AV.

Am J Hum Genet. 2006 Nov;79(5):807-19

Sanfilippův syndrom (mukopolysacharidosa III typu) je způsoben deficitem čtyř enzymů, které se podílí na lysosomální degradaci glykosaminoglykanu heparansulfátu. Tři z těchto enzymů jsou lysosomální hydrolasy, čtvrtý enzym, acetyl-koenzym A: glukosamin N-acetyl transferasa (N-acetyltransferasa), je membránový enzym zodpovědný za acylaci glukosaminových zbytků ve oligosacharidech pocházejících z heparansulfátu [81]. Deficit tohoto enzymu je příčinou mukopolysacharidosis typu IIIC, závažného dědičného metabolického onemocnění, které se klinicky jen nepatrně odlišuje od ostatních typů Sanfilippova syndromu [82].

N-acetyltransferasa je mezi lysosomálními enzymy výjimkou : acetylkoenzym A slouží k acylaci histidinového zbytku enzymu na cytosolární straně lysosomální membrány. Acetylový zbytek je translokován do lumina lysosomu a následně je přenesen na glukosaminový zbytek. Acylace je podmínkou pro další enzymatický krok, štěpení N-acetylglukosaminidasou. Tento model byl rozvinut v osmdesátých letech minulého století zejména v pracích Karen Bame a Leonarda H. Rome [83,84,85,86]. Meikle a spolupracovníci diskutovali podrobně kinetiku enzymové reakce [87].

Pokusy o purifikaci enzymu byly doposud neúspěšné, zdařilo se pouze částečné obohacení enzymové aktivity [88]. Ausseil a spolupracovníci [89] našli 120 kDa acetylovaný lysosomální membránový protein, který nebyl přítomen ve kultivovaných fibroblastech pacienta s MPS IIIC, nepodařilo se jím nicméně protein identifikovat.

Pokusy nalézt gen pomocí genové vazby umístily gen do pericentromerické oblasti chromosomu 8, nicméně žádný z více než dvou desítek vyšetřených genů neobsahoval u pacientů s MPS IIIC mutace (A.Pshezhetsky, osobní sdělení).

Gen mutovaný u MPS III C byl posledním neznámým genem ve skupině lysosomálních onemocnění. V České republice byl malý počet rodin s MPS IIIC, který nedovoloval mapovat

MPS IIIC pomocí genové vazby jako autosomální recesivní vlohu. Stanovení enzymové aktivity však umožňuje rozlišit s dobrou spolehlivostí přenašeče a zdravé homozygoty pro MPS IIIC. To nám umožnilo mapování s využitím kodominantního modelu. V mapování jsme se soustředili na pericentromerickou oblast 8. chromozomu vymezenou dřívějšími studii. Podařilo se nám zúžit kandidátní oblast na úsek mezi markery D8S1115 a D8S1460, který obsahoval 32 genů. Tento úsek však stále obsahoval v podstatě neznámou sekvenci centromery.

Pro identifikaci genu jsme využili dvě strategie – vyhledávání kandidátních genů a hledání rozdílů v expresi genů z kandidátního úseku mezi kontrolami a pacienty s MPS IIIC.

Biochemické studie prokázaly, že N-acetyltransferáza je vysoce hydrofobní transmembránový protein, studie Ausseil et al. [89] naznačila, že by jeho molekulová hmotnost mohla být zhruba 120 kDa. Naším hlavním kriteriem pro vyhledávání v kandidátní oblasti byly mnohočetné transmembránové úseky v predikovaném proteinu. Pouze jeden protein měl více než čtyři predikované transmembránové úseky – protein neznámé funkce, TMEM76.

Druhá strategie pro nalezení genu kódujícího N-acetyltransferázu byla založena na hledání rozdílů v expresi genů z kandidátního úseku mezi pacienty a kontrolními osobami. Pokud pacienti nesou mutace, které snižují množství transkriptu – jako například nulové mutace, které často vedou k odbourání mutantní mRNA mechanismem nonsense-mediated decay - lze očekávat, že kandidátní gen bude mít sníženou expresi u pacientů s MPS IIIC. Expresi genů jsme vyšetřili pomocí DNA čipů připravených pro tento účel. Čipy obsahovaly části sekvence cDNA 32 genů z kandidátní oblasti. Analýza exprese u dvou pacientů s MPS IIIC, od kterých jsme měli k dispozici kultivované kožní fibroblasty jako zdroj RNA, opět identifikovala TMEM76 jako jediný gen s významnými změnami v expresi genů. Detaily statistického zpracování jsou uvedeny v publikaci.

Vyšetření sekvence TMEM76 u všech pacientů s MPS IIIC našlo mutace, navíc mutace kompletně segregovaly s heterozygotními aktivitami N-acetyltransferasy u členů rodin s MPS IIIC. To potvrdilo, že TMEM76 je genem zodpovědným za mukopolysacharidosu IIIC. Transientní expresí TMEM 76 v deficitních fibroblastech jsme potvrdili, že gen kóduje N-acetyltransferázu.

Gen byl objeven ve stejné době také jinou skupinou [90]. V současnosti nese jméno HSGNAT (Homo Sapiens Glucosaminid N-Acetyl Transferase) a je předmětem dalšího výzkumu naší skupiny i jiných [91].

4 Závěr

Jak bylo zmíněno již v úvodu, lysosomální nemoci poskytují jedinečný pohled na funkci deficitních proteinů, která nemusí být plně objasněna studiiemi *in vitro*. Proto má význam studovat pacienty s těmito vzácnými nemocemi a poučit se z komplexních projevů nemoci na biochemické, morfologické a molekulární úrovni.

Tato teze předkládá práce, které se zabývají sfingolipidosami, nejčastější skupinou lysosomálních chorob a také jednou z mukopolysacharidos. Jádrem této práce je sledování molekulárních příčin nemocí ve vztahu ke klinickým projevům. To má praktický význam, protože u několika lysosomálních nemocí je k dispozici účinná, ale extrémně drahá léčba, kterou zdravotní pojištění není s to hradit pro všechny pacienty nikde na světě. Léčba je také sporná u pacientů s pokročilým onemocněním, kde existující orgánové postižení (tzv. reziduální nemoc) nedává naději na zlepšení stavu léčbou příčin nemoci. Například u pacientů v konečných fázích ledvinného selhání v důsledku Fabryho nemoci nemá podávání deficitního enzymu smysl, protože patologické změny v ledvinné tkáni jsou ireversibilní. Do popředí se tak dostává preventivní léčba, která je zvažována u pacientů s rizikem závažného průběhu nemoci. Problémem je, jak riziko závažného postižení zjistit u pacientů, kteří v mladém věku mají zatím jen minimální příznaky.

U Fabryho choroby jsme jako první potvrdili, že tíže postižení u heterozygotních žen skutečně závisí na inaktivaci chromozomu X a že vyšetření inaktivace lze pravděpodobně využívat pro predikci fenotypu – to bude předmětem dalších studií. Studie nám také umožnila vyslovit zajímavou hypotézu o možné selekci ve prospěch buněk vykazujících střádání – to také bude předmětem dalšího studia.

Důležitým přínosem této disertace pro základní výzkum je nalezení a charakterizace genu mutovaného u mukopolysacharidosy typu IIIC. Gen kóduje neobvyklý membránový lysosomální enzym, N-acetyltransferázu, která je představitelem nové rodiny proteinů. Jejimi jedinými známými členy jsou kromě N-acetyltransferázy pouze bakteriální proteiny nesoucí doménu COG4299.

Kromě přínosu pro poznání lysosomálních nemocí tyto práce měly bezprostřední praktický přínos díky zlepšené genetické péči o rodiny, včetně přesné diagnostiky přenašečů a prenatální diagnostiky.

5 Poděkování

Děkuji svému školiteli, profesorovi Ellederovi a všem spolupracovníkům a studentům, bez nichž by tyto a další práce nevznikly. Veliký dík patří také pacientům s metabolickými chorobami a jejich rodinám.

6 Literatura

1. Gille, L. & Nohl, H. The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 347-54(2000).
2. De Duve, C. & Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435-92(1966).
3. Houghton, P.B., James, E.M., Williams, W.J. & Henderson, W.J. The fine structure of dense lysosomes isolated from rat spleen. *Beitr Pathol* 157, 244-50(1976).
4. Eskelinen, E., Tanaka, Y. & Saftig, P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13, 137-45(2003).
5. Sun-Wada, G., Wada, Y. & Futai, M. Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase. *Cell Struct. Funct.* 28, 455-63(2003).
6. Neufeld, E.F. The uptake of enzymes into lysosomes: an overview. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 16, 77-84(1980).
7. Ghosh, P., Dahms, N.M. & Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 202-12(2003).
8. Rohrer, J. & Kornfeld, R. Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* 12, 1623-31(2001).
9. Kudo, M., Brem, M.S. & Canfield, W.M. Mucopolidosis II (I-cell disease) and mucopolidosis IIIA (classical pseudo-hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase alpha / beta -subunits precursor gene. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 451-63(2006).
10. Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S. & Riezman, H. Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 488-95(1997).
11. Höning, S., Sandoval, I.V. & von Figura, K. A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* 17, 1304-14(1998).

12. Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X. et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131, 770-83(2007).
13. Gamp, A., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Wittke, D., D'Hooge, R., De Deyn, P.P. et al. LIMP-2/LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12, 631-46(2003).
14. Balreira, A., Gaspar, P., Caiola, D., Chaves, J., Beirão, I., Lopes Lima, J. et al. A nonsense mutation in the LIMP-2 gene associated with progressive myoclonic epilepsy and nephrotic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* , (2008).
15. Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M. & Morales, C.R. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J.* 22, 6430-7(2003).
16. Ni, X. & Morales, C.R. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* 7, 889-902(2006).
17. Pfeffer, S.R. Membrane transport: retromer to the rescue. *Curr. Biol.* 11, R109-11(2001).
18. Burda, P., Padilla, S.M., Sarkar, S. & Emr, S.D. Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *J. Cell. Sci.* 115, 3889-900(2002).
19. Seaman, M.N.J. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J. Cell Biol.* 165, 111-22(2004).
20. Saftig, P. *LYSOSOMES* (ed. ed. Saftig, P.(.) (Landes Bioscience / Eurekah.com, 2005).
21. Mahadevan, S., Dillard, C.J. & Tappel, A.L. Degradation of polysaccharides, mucopolysaccharides, and glycoproteins by lysosomal glycosidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 129, 525-33(1969).
22. Winchester, B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* 15, 1R-15R(2005).
23. Elleder, M. Foamy transformed Gaucher cells. *Zentralbl. Pathol.* 138, 47-50(1992).
24. Mole, S.E. Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL). *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 10, 255-7(2006).
25. Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A. & Desnick, R.J. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273, 1236-8(1996).
26. Fukuda, T., Roberts, A., Plotz, P.H. & Raben, N. Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease). *Curr Neurol Neurosci Rep* 7, 71-7(2007).
27. Leroy, J.G., Spranger, J.W., Feingold, M., Opitz, J.M. & Crocker, A.C. I-cell disease: a clinical picture. *J. Pediatr.* 79, 360-5(1971).

28. Landgrebe, J., Dierks, T., Schmidt, B. & von Figura, K. The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene* 316, 47-56(2003).
29. Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L.V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M. et al. Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* 113, 435-44(2003).
30. O'Brien, J.S. & Kishimoto, Y. Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J.* 5, 301-8(1991).
31. Campana, W.M., O'Brien, J.S., Hiraiwa, M. & Patton, S. Secretion of prosaposin, a multifunctional protein, by breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1427, 392-400(1999).
32. Sadeghlar, F., Rimmel, N., Breiden, B., Klingenstein, R., Schwarzmann, G. & Sandhoff, K. Physiological relevance of sphingolipid activator proteins in cultured human fibroblasts. *Biochimie* 85, 439-48(2003).
33. Chu, Z., Sun, Y., Kuan, C.Y., Grabowski, G.A. & Qi, X. Saposin C: neuronal effect and CNS delivery by liposomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1053, 237-46(2005).
34. Diaz-Font, A., Cormand, B., Santamaria, R., Vilageliu, L., Grinberg, D. & Chabás, A. A mutation within the saposin D domain in a Gaucher disease patient with normal glucocerebrosidase activity. *Hum. Genet.* 117, 275-7(2005).
35. Spiegel, R., Bach, G., Sury, V., Mengistu, G., Meidan, B., Shalev, S. et al. A mutation in the saposin A coding region of the prosaposin gene in an infant presenting as Krabbe disease: first report of saposin A deficiency in humans. *Mol. Genet. Metab.* 84, 160-6(2005).
36. Sikora, J., Harzer, K. & Elleder, M. Neurolysosomal pathology in human prosaposin deficiency suggests essential neurotrophic function of prosaposin. *Acta Neuropathol* 113, 163-75(2007).
37. Sun, Y., Witte, D.P., Ran, H., Zamzow, M., Barnes, S., Cheng, H. et al. Neurological deficits and glycosphingolipid accumulation in Saposin B deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* , (2008).
38. Matsuda, J., Kido, M., Tadano-Aritomi, K., Ishizuka, I., Tominaga, K., Toida, K. et al. Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2709-23(2004).
39. Mahuran, D.J. The GM2 activator protein, its roles as a co-factor in GM2 hydrolysis and as a general glycolipid transport protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1393, 1-18(1998).
40. Bach, G. Mucopolidosis type IV. *Mol. Genet. Metab.* 73, 197-203(2001).

41. Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T. et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406, 906-10(2000).
42. Kleijer, W.J., Geilen, G.C., Janse, H.C., van Diggelen, O.P., Zhou, X.Y., Galjart, N.J. et al. Cathepsin A deficiency in galactosialidosis: studies of patients and carriers in 16 families. *Pediatr. Res.* 39, 1067-71(1996).
43. Hiraiwa, M. Cathepsin A/protective protein: an unusual lysosomal multifunctional protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 894-907(1999).
44. Soyombo, A.A., Tjon-Kon-Sang, S., Rbaibi, Y., Bashllari, E., Bisceglia, J., Muallem, S. et al. TRP-ML1 regulates lysosomal pH and acidic lysosomal lipid hydrolytic activity. *J. Biol. Chem.* 281, 7294-301(2006).
45. Siintola, E., Lehesjoki, A. & Mole, S.E. Molecular genetics of the NCLs -- status and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 857-64(2006).
46. Réthy, L.A. Growth regulation, acid sphingomyelinase gene and genomic imprinting: lessons from an experiment of nature. *Pathol. Oncol. Res.* 6, 298-300(2000).
47. Simonaro, C.M., Park, J., Eliyahu, E., Shtraizent, N., McGovern, M.M. & Schuchman, E.H. Imprinting at the SMPD1 locus: implications for acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 865-70(2006).
48. Blom, D., Speijer, D., Linthorst, G.E., Donker-Koopman, W.G., Strijland, A. & Aerts, J.M.F.G. Recombinant enzyme therapy for Fabry disease: absence of editing of human alpha-galactosidase A mRNA. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 23-31(2003).
49. Barone, R., Sotgiu, S. & Musumeci, S. Plasma chitotriosidase in health and pathology. *Clin. Lab.* 53, 321-33(2007).
50. Boot, R.G., Renkema, G.H., Verhoek, M., Strijland, A., Blik, J., de Meulemeester, T.M. et al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J. Biol. Chem.* 273, 25680-5(1998).
51. Renkema, G.H., Boot, R.G., Muijsers, A.O., Donker-Koopman, W.E. & Aerts, J.M. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 2198-202(1995).
52. Boot, R.G., Blommaart, E.F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C. et al. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J. Biol. Chem.* 276, 6770-8(2001).
53. Sun, Y., Jin, P. & Grabowski, G.A. The mouse prosaposin locus: promoter organization. *DNA Cell Biol.* 16, 23-34(1997).

54. Kishimoto, Y., Hiraiwa, M. & O'Brien, J.S. Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J. Lipid Res.* 33, 1255-67(1992).
55. Madar-Shapiro, L., Pasmanik-Chor, M., Vaccaro, A.M., Dinur, T., Dagan, A., Gatt, S. et al. Importance of splicing for prosaposin sorting. *Biochem. J.* 337 (Pt 3), 433-43(1999).
56. Hazkani-Covo, E., Altman, N., Horowitz, M. & Graur, D. The evolutionary history of prosaposin: two successive tandem-duplication events gave rise to the four saposin domains in vertebrates. *J. Mol. Evol.* 54, 30-4(2002).
57. Vaccaro, A.M., Salvioli, R., Barca, A., Tatti, M., Ciaffoni, F., Maras, B. et al. Structural analysis of saposin C and B. Complete localization of disulfide bridges. *J. Biol. Chem.* 270, 9953-60(1995).
58. Morita, F., Wen, T.C., Tanaka, J., Hata, R., Desaki, J., Sato, K. et al. Protective effect of a prosaposin-derived, 18-mer peptide on slowly progressive neuronal degeneration after brief ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1295-302(2001).
59. Lapchak, P.A., Araujo, D.M., Shackelford, D.A. & Zivin, J.A. Prosaptide exacerbates ischemia-induced behavioral deficits in vivo; an effect that does not involve mitogen-activated protein kinase activation. *Neuroscience* 101, 811-4(2000).
60. Suzuki, K. Globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease): update. *J. Child Neurol.* 18, 595-603(2003).
61. Deconinck, N., Messaoui, A., Ziereisen, F., Kadhim, H., Sznajer, Y., Pelc, K. et al. Metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase A deficiency: a new case of saposin-B deficiency. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 12, 46-50(2008).
62. Schnabel, D., Schröder, M. & Sandhoff, K. Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett.* 284, 57-9(1991).
63. Bradová, V., Smíd, F., Ulrich-Bott, B., Roggendorf, W., Paton, B.C. & Harzer, K. Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevations (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolipid storage disease. *Hum. Genet.* 92, 143-52(1993).
64. Elleder, M., Jirásek, A., Smíd, F., Ledvinová, J., Besley, G.T. & Stopeková, M. Niemann-Pick disease type C with enhanced glycolipid storage. Report on further case of so-called lactosylceramidosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 402, 307-17(1984).
65. Desnick, R.J., Astrin, K.H. & Bishop, D.F. Fabry disease: molecular genetics of the inherited nephropathy. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* 18, 113-27(1989).
66. Desnick, R.J. & Wang, A.M. Schindler disease: an inherited neuroaxonal dystrophy due to alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 13, 549-59(1990).

67. Hujová, J., Sikora, J., Dobrovolný, R., Poupetová, H., Ledvinová, J., Kostrouchová, M. et al. Characterization of *gana-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a single ortholog of vertebrate alpha-galactosidase and alpha-N-acetylgalactosaminidase. *BMC Cell Biol.* 6, 5(2005).
68. Bishop, D.F., Kornreich, R. & Desnick, R.J. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3903-7(1988).
69. Novo, F.J., Kruszewski, A., MacDermot, K.D., Goldspink, G. & Górecki, D.C. Editing of human alpha-galactosidase RNA resulting in a pyrimidine to purine conversion. *Nucleic Acids Res.* 23, 2636-40(1995).
70. Eng, C.M., Fletcher, J., Wilcox, W.R., Waldek, S., Scott, C.R., Sillence, D.O. et al. Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inher Metab Dis* 30, 184-92(2007).
71. Amos-Landgraf, J.M., Cottle, A., Plenge, R.M., Friez, M., Schwartz, C.E., Longshore, J. et al. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 493-9(2006).
72. Puck, J.M., Nussbaum, R.L. & Conley, M.E. Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J. Clin. Invest.* 79, 1395-400(1987).
73. Redonnet-Vernhet, I., Ploos van Amstel, J.K., Jansen, R.P., Wevers, R.A., Salvayre, R. & Levade, T. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *J. Med. Genet.* 33, 682-8(1996).
74. Ropers, H.H., Wienker, T.F., Grimm, T., Schroetter, K. & Bender, K. Evidence for preferential X-chromosome inactivation in a family with Fabry disease. *Am. J. Hum. Genet.* 29, 361-70(1977).
75. Whybra, C., Kampmann, C., Krummenauer, F., Ries, M., Mengel, E., Miebach, E. et al. The Mainz Severity Score Index: a new instrument for quantifying the Anderson-Fabry disease phenotype, and the response of patients to enzyme replacement therapy. *Clin. Genet.* 65, 299-307(2004).
76. Kubota, T., Nonoyama, S., Tonoki, H., Masuno, M., Imaizumi, K., Kojima, M. et al. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum. Genet.* 104, 49-55(1999).

77. Allen, R.C., Zoghbi, H.Y., Moseley, A.B., Rosenblatt, H.M. & Belmont, J.W. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 1229-39(1992).
78. Zlotogora, J. Germ line mosaicism. *Hum. Genet.* 102, 381-6(1998).
79. Bakker, E., Veenema, H., Den Dunnen, J.T., van Broeckhoven, C., Grootsholten, P.M., Bonten, E.J. et al. Germinal mosaicism increases the recurrence risk for 'new' Duchenne muscular dystrophy mutations. *J. Med. Genet.* 26, 553-9(1989).
80. Bui, T.H., Anvret, M., Dahl, N., Garoff, L., Sjöblom, P. & Hillensjö, T. Complex genetic counseling and exclusion of Duchenne muscular dystrophy in a twin pregnancy after in vitro fertilization (IVF). *J. Assist. Reprod. Genet.* 11, 144-8(1994).
81. Bartsocas, C., Gröbe, H., van de Kamp, J.J., von Figura, K., Kresse, H., Klein, U. et al. Sanfilippo type C disease: clinical findings in four patients with a new variant of mucopolysaccharidosis III. *Eur. J. Pediatr.* 130, 251-8(1979).
82. 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.* 75, 5185-9(1978).
83. Bame, K.J. & Rome, L.H. Acetyl coenzyme A: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for a transmembrane acetylation mechanism. *J. Biol. Chem.* 260, 11293-9(1985).
84. Bame, K.J. & Rome, L.H. Acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for an active site histidine residue. *J. Biol. Chem.* 261, 10127-32(1986).
85. Bame, K.J. & Rome, L.H. Genetic evidence for transmembrane acetylation by lysosomes. *Science* 233, 1087-9(1986).
86. Bame, K.J. & Rome, L.H. Acetyl-CoA: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase from rat liver. *Meth. Enzymol.* 138, 607-11(1987).
87. Meikle, P.J., Whittle, A.M. & Hopwood, J.J. Human acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Kinetic characterization and mechanistic interpretation. *Biochem. J.* 308 (Pt 1), 327-33(1995).
88. Freeman, C., Clements, P.R. & Hopwood, J.J. Acetyl CoA:alpha-glucosaminide N-acetyl transferase: partial purification from human liver. *Biochem. Int.* 6, 663-71(1983).
89. Ausseil, J., Landry, K., Seyrantepe, V., Trudel, S., Mazur, A., Lapointe, F. et al. An acetylated 120-kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC fibroblasts: a candidate molecule for MPS IIIC. *Mol. Genet. Metab.* 87, 22-31(2006).
90. Fan, X., Zhang, H., Zhang, S., Bagshaw, R.D., Tropak, M.B., Callahan, J.W. et al. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am. J. Hum. Genet.* 79, 738-44(2006).

91. Ruijter, G.J.G., Valstar, M.J., van de Kamp, J.M., van der Helm, R.M., Durand, S., van Diggelen, O.P. et al. Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Mol. Genet. Metab.* 93, 104-11(2008).