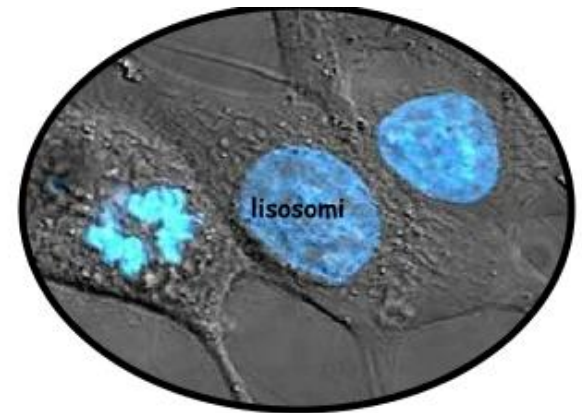


# LSD: Malattie da accumulo lisosomiale

# I Lisosomi

- Organelli citoplasmatici con il compito di digerire le sostanze endogene che se accumulate diventano tossiche.
- Delimitati da membrana
- Contengono enzimi, detti IDROLASI ACIDE, in grado di degradare:
  - Proteine
  - Acidi nucleici
  - Lipidi
  - Polisaccaridi
- Funzione di “sistema digestivo” della cellula



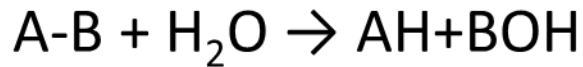
**SPAZZINI DELLA CELLULA**



**ENZIMI DIGESTIVI**

# IDROLASI ACIDE

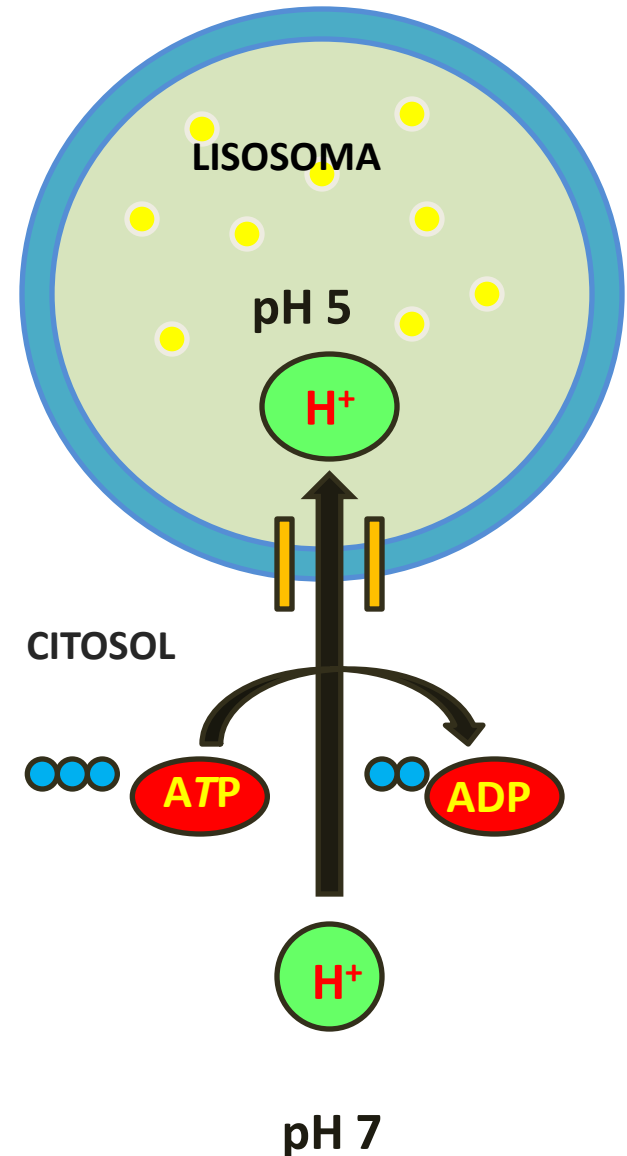
- catalizzano la reazione:



- attive al pH acido dei lisosomi (pH  $\cong$  5.0)
- inattivate al pH neutro del citoplasma
- il pH acido deriva da:

$$[H^+]_{\text{int}} = 10^{-5} \text{M} > [H^+]_{\text{est}} = 10^{-7} \text{M}$$

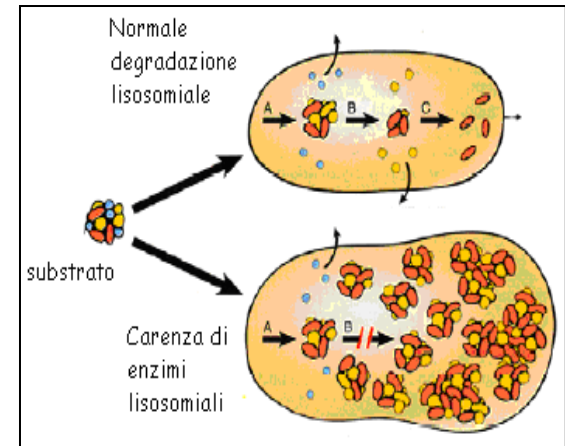
- pompa protonica che idrolizza ATP



# LSD: Lysosomal Storage Disease

- Gruppo di patologie rare, causate da un difetto genetico che conduce carenza o assenza di uno o più enzimi lisosomiali.
- La carenza dell'enzima determina accumulato del substrato nei lisosomi con gravi danni cellulari, in diversi tessuti e organi.
- Sono clinicamente eterogenee, di natura progressiva, con sintomi multisistemici e con gravi conseguenze patologiche, più spesso a livello del Sistema Nervoso.
- La maggior parte delle LSD diagnosticate si presentano in età pediatrica e talvolta non tutti i sintomi sono già presenti.
- Diagnosi

- ➔ anamnesi familiare
- ➔ segni clinici chiave



Classificate in vari gruppi:

- a) *Mucopolisaccaridosi*:** difetto nella degradazione dei mucopolisaccaridi (o GAG), che svolgono importanti funzioni nel tessuto connettivo.
- b) *Sfingolipidosi*:** difetto nella degradazione lisosomiale degli sfingolipidi, che comprendono sfingomieline, cerebrosidi e gangliosidi.
- c) *Oligosaccaridosi*:** accumulo di oligosaccaridi e di glicoproteine. In questa classe rientrano la Fucosidosi, la Sialidosi, la Mucopolipidosi, la Mannosidosi.
- d) *Malattie dovute a trasporto lisosomiale alterato.***
- e) *Malattie dovute al mancato trasporto degli enzimi lisosomiali.***
- f) *Altre malattie lisosomiali (es. Malattia di Pompe, dovuta ad un deficit di  $\alpha$ -glucosidasi).***

## Esempi di MUCOPOLISACCARIDOSI (MPS)

Numero	Malattia	Deficit enzimatico	GAG accumulato
MPS I	Hurler Hurler-Scheie Scheie	$\alpha$ -L-iduronidasi	Dermatansolfato, Eparansolfato
MPS II	Hunter severa lieve	Iduronato solfatasi	Dermatansolfato, Eparansolfato
MPS III	Sanfilippo A Sanfilippo B Sanfilippo C Sanfilippo D	Eparan N-solfatasi $\alpha$ -N acetilglucosaminidasi Acetil-CoA $\alpha$ -glucosaminide-transferasi N-Acetilglucosamino-6-solfatasi	Eparansolfato
MPS IV	Morquio A  Morquio B	N-acetilgalattosamina-6-solfatasi  $\beta$ -galattosidasi	Cheratansolfato, Chondroitin-6-solfato Cheratansolfato
MPS VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilgalattosamina-4-solfatasi (arilsolfatasi B)	Dermatansolfato,
MPS VII	Sly	$\beta$ -glucuronidasi	Dermatan solfato, Eparan solfato Chondroitin solfato
MPS IX	-	ialuronidasi	ialuronato

## Esempi di SFINGOLIPIDOSI (GLICOLIPIDOSI)

Malattia	Deficit enzimatico	Sfingolipide accumulato	SINTOMI
Gaucher	Glucocerebrosidasi	Glucocerebroside	Difetto nel rimodellamento e nell'accrescimento osseo, fratture patologiche; tetraparesi spastica; sintomi neurologici e deterioramento cognitivo
Niemann-Pick	Sfingomielinasi	Sfingomielina	Infiltrati polmonari, pelle brunastra, forma neuropatica dell'infanzia
Leucodistrofia metacromatica	Aril-sulfatasi A	Sulfatide	precoci anomalie della deambulazione della tarda infanzia; neuropatia periferica
<b>Fabry</b>	<b><math>\alpha</math>-galattosidasi A</b>	<b>Globotriaosilceramide</b>	
Fucosidosi	$\alpha$ -fucosidasi	Pentaesosilfucoglicolipide	Deformità facciale, ritardo mentale, aumento degli elettroliti nel sudore, angiocheratoma nei giovani
Farber	Ceramidasi	Ceramide	Artropatia-noduli sottocutanei periarticolari e viscerali
Gangliosidosi generalizzata	GM1 ganglioside: $\beta$ -galattosidasi	Ganglioside GM1	Deformità facciale, edema, macroglossia, cecità precoce nelle forme infantili
Tay-Sachs	Esosaminidasi A	Ganglioside GM2	Macrocefalia, iperacusia nella forma infantile
Sandhoff	Esosaminidasi A e B	Ganglioside GM2	Macrocefalia, degenerazione motoria e mentale progressiva, cecità
Krabbe	$\beta$ -galattosidasi	Galattocerebroside	Sordità, debolezza muscolare, cecità, rigidità, lento sviluppo fisico e mentale

# TERAPIE

- **TERAPIA ENZIMATICA SOSTITUTIVA (ERT)**

la terapia enzimatica sostitutiva (ERT) mediante l'impiego di enzima ricombinante è associata a benefici per i pazienti. Richiede trattamento precoce e per tutta la vita.

- **TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE**

da donatore sano, con effetto di ripopolamento dei tessuti ed effetto di cross-correction.

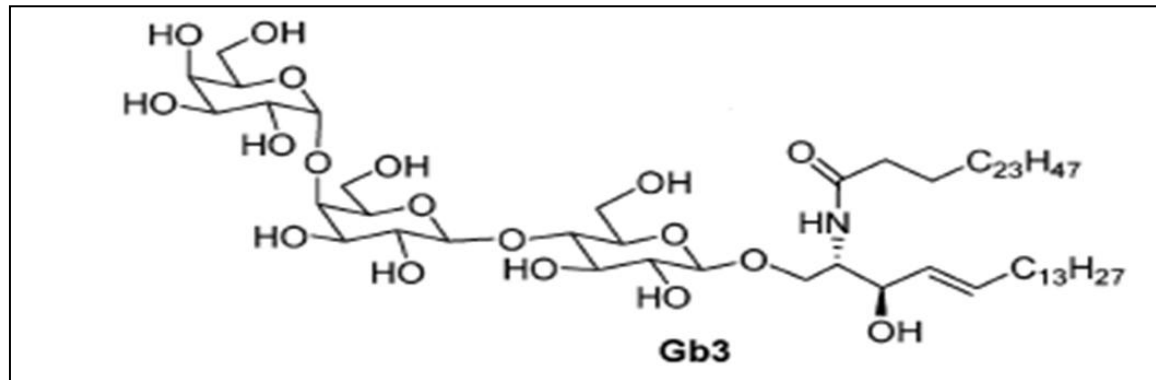
- **TERAPIA FARMACOLOGICA CON MOLECOLE «chaperone»**

- **TERAPIA GENICA**



# MALATTIA DI FABRY

- Malattia ereditaria, recessiva, X-linked;
- Prevalenza 1:40000 maschi (femmine possono essere asintomatiche);
- Dovuta alla mancanza totale o parziale dell'enzima  $\alpha$ -galattosidasi A  $\rightarrow$  accumulo nei tessuti e nel plasma di **globotriasolilceramide** (GL-3 o Gb-3), la cui unità base è il ceramide con legati 3 zuccheri:  $\alpha$ -galattosio,  $\beta$ -galattosio,  $\beta$ -glucosio



Gli organi e i sistemi più colpiti sono:

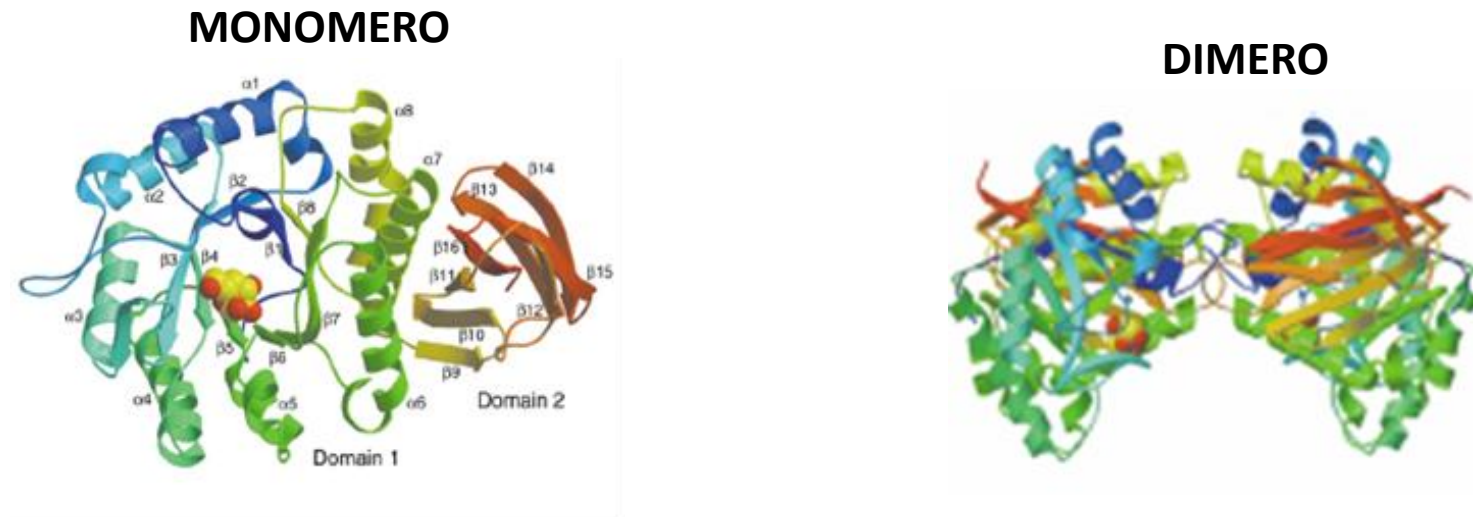
Terminazioni nervose periferiche, SNC e il sistema cerebrovascolare, Reni, Cuore, Cute, Occhio, Apparato gastrointestinale, Apparato respiratorio

# QUADRO CLINICO della MALATTIA

- Gli organi e i sistemi più colpiti sono:
- **Terminazioni nervose periferiche, il SNC e il sistema cerebrovascolare** con dolore acuto o cronico alle estremità, rischio di ictus precoce, emiparesi, vertigini, cefalea e demenza, attacchi ischemici transitori (TIA);
- **Reni** con alterazione del riassorbimento, della secrezione e dell'escrezione tubulare;
- **Cuore** con aritmie e infarto;
- **Cute** con formazione di angiocheratomi;
- **Occhio** con opacità corneale;
- **Apparato gastrointestinale** con dolore addominale, nausea e vomito;
- **Apparato respiratorio** con ostruzione delle vie aeree, dispnea

# $\alpha$ -GALATTOSIDASI A: struttura e funzione

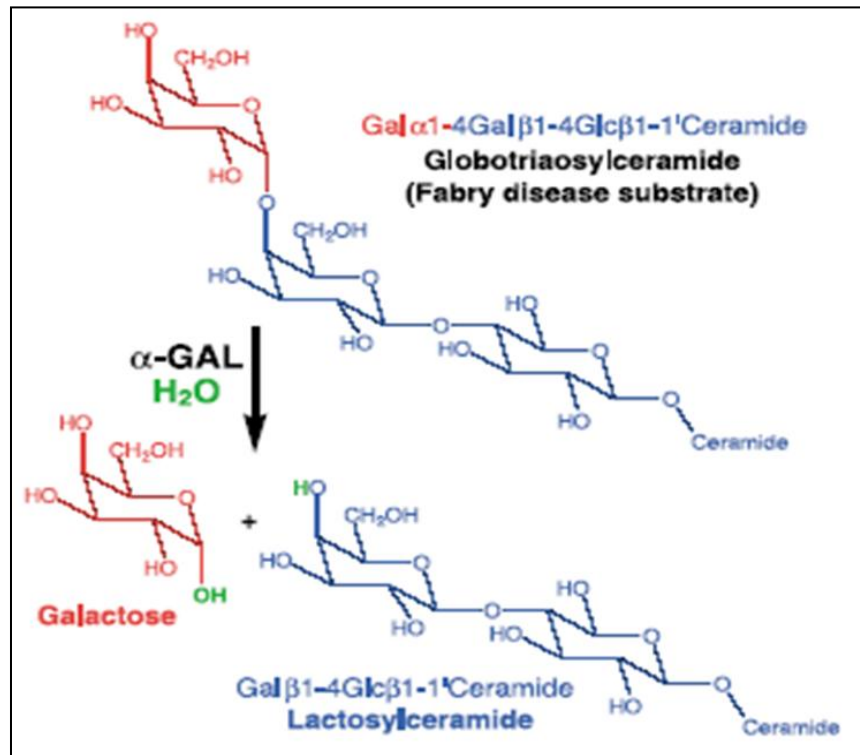
- L' $\alpha$ -Galattosidasi A è codificata dal gene GAL-A localizzato sul braccio lungo del cromosoma X.
- E' una glicoproteina omodimerica di 101 kDa.



Ogni monomero è costituito da 2 domini: il dominio 1 contiene il sito attivo.

# Reazione enzimatica

Catalizza la rimozione del galattosio dagli oligosaccaridi, glicoproteine e glicolipidi durante il catabolismo delle macromolecole. In condizioni normali il GL-3 viene tagliato in lattosilceramide e galattosio.

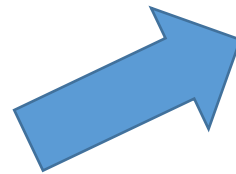


# Dosaggio Enzimi coinvolti in LSD

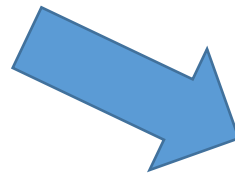
La diagnosi della malattia è difficile → variabilità di sintomi e «poco conosciuta».

Un aiuto può venire dall'analisi dell'attività enzimatica della  $\alpha$ -Gal A, che può indirizzare verso la successiva indagine genetica.

## Indagine Biochimica



Dosaggio su lisato  
linfocitario



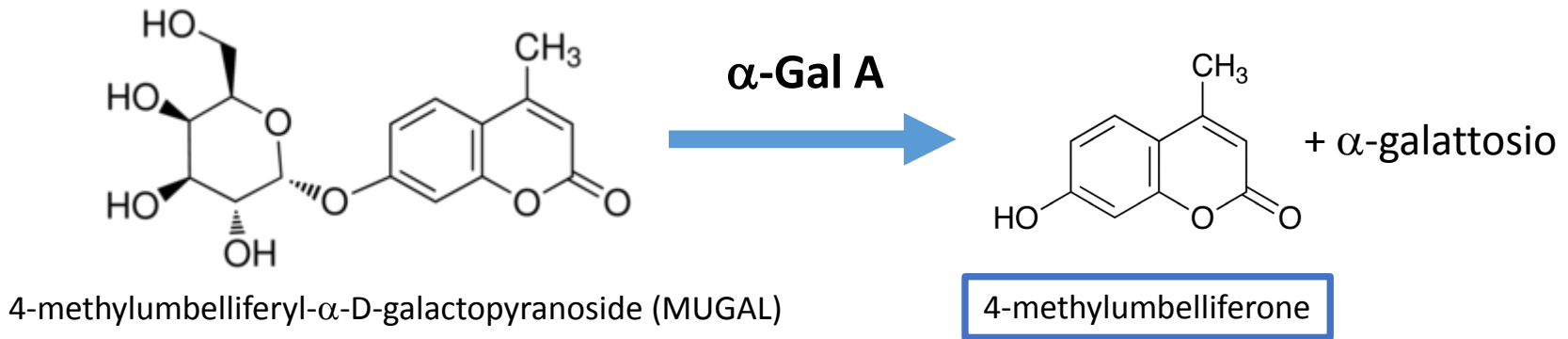
Dosaggio su DBS (Dried  
Blood Spot)

Abbiamo utilizzato il metodo del lisato linfocitario perché:

- 1) Metodo comprovato
- 2) Possibilità di ripetere il saggio con un campione
- 3) L'enzima non si inattiva.

# Principio del metodo

Dosaggio di attività enzimatica effettuato in fluorescenza: l'idrolisi del substrato sintetico (MUGAL) causa la formazione di un prodotto fluorescente (4-metilumbelliferone o MUMB).



Però....l'indagine biochimica dell'attività dell' $\alpha$ -Gal A in individui normali ed affetti da malattia di Fabry hanno evidenziato la presenza di due isoenzimi:  $\alpha$ -Gal A ed  $\alpha$ -Gal B.

Entrambi hanno attività catalitica verso il substrato sintetico!!!

# Come distinguerli?!?!?

## $\alpha$ -Galattosidasi A

- Termolabile.
- Rappresenta la maggior attività nei tessuti ed è carente nei pazienti malati

## $\alpha$ -Galattosidasi B

- Stabile al calore.
- Rappresenta la maggior parte dell'attività residua nei pazienti malati

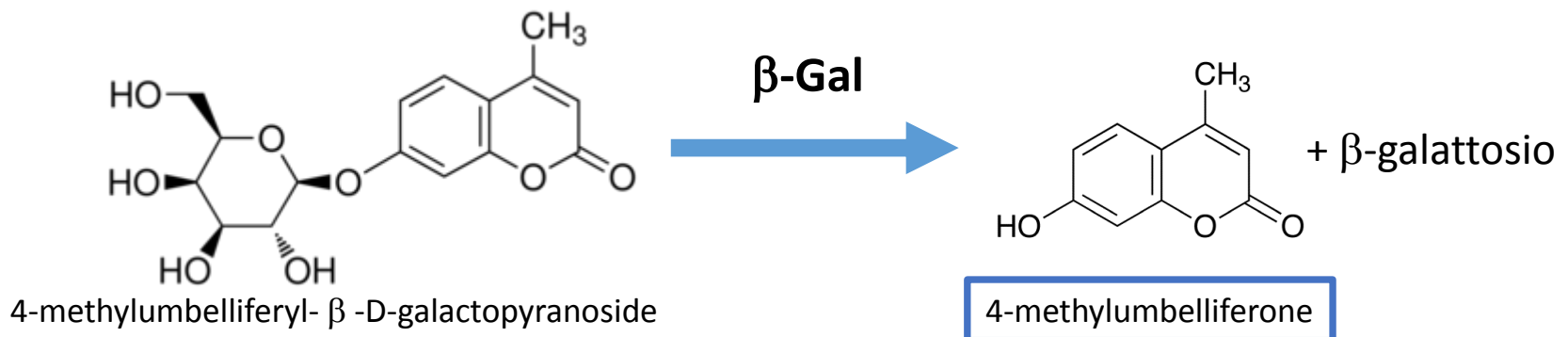
- Gli enzimi purificati hanno proprietà chimico fisiche simili, ma possono essere separati per IEF.
- Anticorpi contro un enzima non riconoscono l'altra isoforma: questo suggerisce che sono geneticamente differenti.
- $\alpha$ -Gal B è una  $\alpha$ -N-acetilgalattosaminidasi che agisce su substrati con residui di  $\alpha$ -N-acetilgalattosamina terminale.
- **Usando un inibitore, la  $\alpha$ -N-acetilgalattosamina** possiamo inibire la  $\alpha$ -Gal B e dosare la sola attività della  $\alpha$ -Gal A!



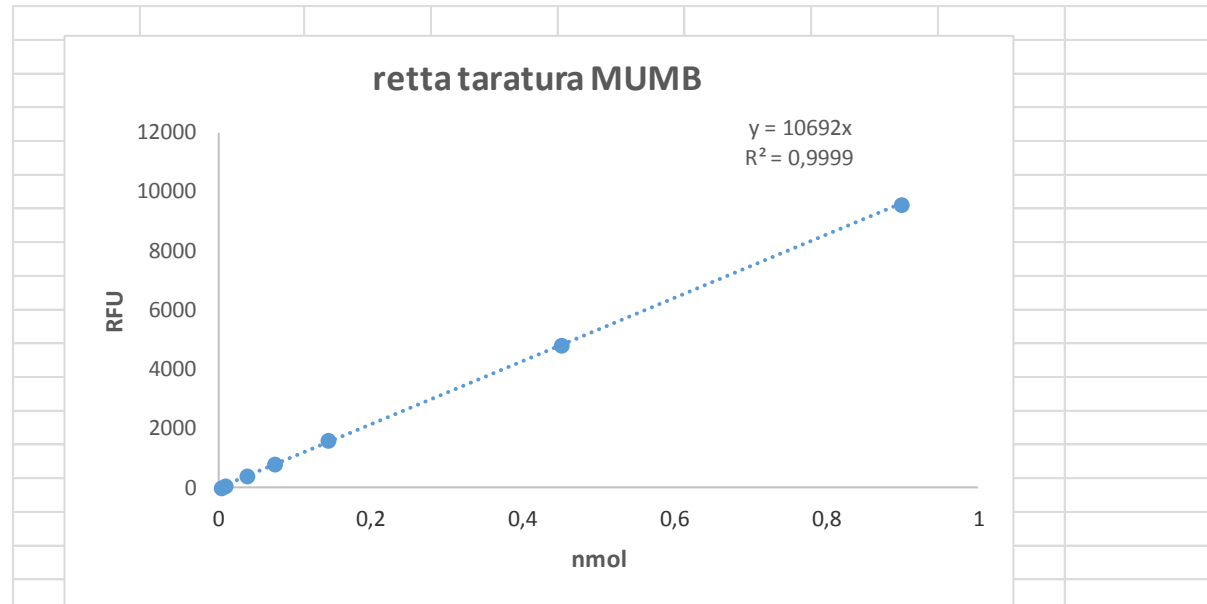
Perciò, nella mix di reazione sono presenti sia il substrato (MUGAL) della  $\alpha$ -Gal A, che l'inibitore ( $\alpha$ -N-acetilgalattosamina) della  $\alpha$ -Gal B.

## Perchè abbiamo dosato la $\beta$ -galattosidasi?

Assieme al dosaggio dell'attività della  $\alpha$ -Gal A è buona norma saggiare anche l'attività di almeno un'altro enzima lisosomiale nello stesso estratto  $\rightarrow$  indica l'utilizzabilità del campione (stato di degradazione).



# Calcolo dei risultati



Valori normali

$\alpha$ -Gal A: 20-65  
nmol/mg/h

$\beta$ -Gal: 90-300  
nmol/mg/h

Mix nuova	RFU			media	netti	nmol/h	a-Gal A nmol/mg/h
B+I	169	155	159	161			
C1	3041	3028	3015	3028	2867	0,268144	26,814441
C2	2870	2840	2838	2849,333	2688,333	0,251434	25,143409
C3	5995	5865	6113	5991	5830	0,545267	54,526749
beta gal	RFU			media	netti	nmol/h	b-Gal nmol/mg/h
B	98	116	106	106,6667			
C1	6230	6295	6257	6260,667	6154	0,575571	191,85684
C2	5577	5545	5839	5653,667	5547	0,518799	172,93303
C3	9416	9598	9219	9411	9304,333	0,870214	290,0715